

博士論文

妊娠高血圧症候群モデルラットへの漢方処方  
の影響に関する機能形態学的研究

2008

竹井久人



博士論文

妊娠高血圧症候群モデルラットへの漢方処方  
の影響に関する機能形態学的研究

2008

竹井久人

# 目次

	ページ
緒論	1
第1章 当帰芍薬散の妊娠高血圧症候群モデルに対する影響	5
第1節 材料と方法	5
第2節 実験結果	9
第3節 考察	10
第4節 小括	12
第2章 当帰芍薬散の妊娠および分娩後高血圧に対する抑制機序	14
第1節 材料と方法	14
第2節 実験結果	17
第3節 考察	19
第4節 小括	21
第3章 柴苓湯および防己黄耆湯の妊娠高血圧症候群モデルに対する影響	23
第1節 材料と方法	23
第2節 実験結果	26
第3節 考察	28
第4節 小括	30

第4章 当帰芍薬散の子宮内胎子発育遅延の抑制機序	32
第1節 材料と方法	33
第2節 実験結果	35
第3節 考 察	38
第4節 小 括	42
結 語	44
要 約	46
謝 辞	51
参考文献	52
図 表	62
Abstract	90



## 緒 論

妊娠高血圧症候群は、ヒトの妊娠における主要な合併症で、妊婦全体の4-8%に発症し、高血圧、浮腫および蛋白尿の三主徴からなる我が国の妊産婦死亡原因の第一位の疾患である。また妊娠高血圧症候群は、早産や母体の病気に関連する胎子の発育遅延、新生児の罹病率および死亡率上昇の原因となる (Brown, 1995)。多胎妊娠、極端な母体の年齢、家族歴、本態性高血圧および腎疾患のような危険因子は、妊娠高血圧症候群の発生を大幅に増加させることが知られているが、その病態生理は未だ完全に解明されていない。さらにこの妊娠高血圧症候群の患者の一部は、分娩後も引き続き高血圧を発症する。

妊娠高血圧症候群の治療は、安静、食事療法（塩分制限、カロリー制限、高蛋白食）が原則である。薬物療法としては今のところ対症療法しかなく、Ca拮抗薬やアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬などの血圧降下剤の処方が中心である。しかし、妊娠中に無理に血圧を下げれば子宮・胎盤血流量が減少し、胎子の発育に多大な影響を与える可能性も考えられ、母体および胎子を同時に治療することは極めて困難であると考えられている。また、臨床および動物実験において、プロスタサイクリン（ $\text{PGI}_2$ ）の不足やトロンボキサン  $\text{A}_2$ （ $\text{TXA}_2$ ）の増加の結果（ $\text{PGI}_2$  :  $\text{TXA}_2$  比率の変化）は、妊娠高血圧症候群での選択的な血小板破壊、子宮・胎盤血流量の縮小および胎盤梗塞によるものと考えられ、 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$  の不均衡の補正が、妊娠高血圧症候群を改善する可能性から、実験が試みられている (Dekker, 1995)。さらに低用量アスピリン、 $\text{PGI}_2$  類似化合物および  $\text{TXA}_2$  合成酵素阻害剤が治療薬として使用されたが、どれも明確な効果を示すことはできていない。

ヒトと動物の両者における正常な妊娠では生理的な血管の調節機構が存在し、血液量および心拍出量を増加させ、血管抵抗を減少させる。これらの変化の一

部は、内在的に産生される一酸化窒素 (NO) によって調節されることがわかっている。最近、ラットを用いた実験において、NO 合成を慢性的に抑制する NO 合成酵素阻害剤である N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を妊娠中に連続投与すると、高血圧、胎子発育遅延および蛋白尿など妊娠高血圧症候群に類似した臨床症状を誘発することが報告された (Yallampalli and Garfield, 1993; Diket et al., 1994; Salas et al., 1995)。この L-NAME を用いた長期的な処置が誘発する症状は、正常妊婦および妊娠高血圧症候群の患者において、NO 産生と血管の変化との間に直接的な関わりの存在を示唆する。さらに、血管の弛緩収縮因子である calcitonin gene-related peptide (CGRP) や endothelin を含む様々な物質が L-NAME 処置した妊娠ラットを用いて多数実験されている (Richer et al., 1996; Yallampalli et al., 1996; Gangula et al., 1997a; Wight et al., 1998; Wimalawansa and Yallampalli, 1998; Makino et al., 1999; Olson et al., 1999; Zlatnik et al., 1999)。

近年我が国において、漢方処方はその成分の量と品質が標準化され、一般用医薬品および医療用医薬品として広く使用されている。なかでも妊娠高血圧症候群に関しては、当帰芍薬散、柴苓湯および防己黄耆湯が臨床的に使用される頻度が高い。当帰芍薬散は、臨床では主に閉経期の苦痛症状を軽くし (Koyama, 1993)、分娩前の治療薬 (安胎薬) として使われている (Noguchi, 1985; Kano et al., 1991)。また動物実験において当帰芍薬散は、卵巣の endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system (Usuki et al., 1992) を調節し、静脈内投与は血清中または排卵前の卵胞での 17 $\beta$ -エストラジオール、プロジェステロンおよびテストステロン・レベルを増加させるとの報告がある (Usuki, 1990)。柴苓湯は、その主たる作用である利尿作用によって、臨床での浮腫や蛋白尿 (Ito et al., 1996; Ushiroyama, 2003) および腎疾患に対する治療効果が期待される漢方処方である (Senaga and Kawashima, 1986)。実験的には、柴苓湯はラットにおいて puromycin aminonucleoside によって誘発される尿蛋白およ

び血漿中コレステロールを減少させる、蛋白尿の予防効果が報告されている (Abe et al., 1986)。防已黄耆湯は、臨床では主に変形性膝関節症 (Otani et al., 1997; Noguchi et al., 2004)、蛋白尿、膝の浮腫、慢性関節リウマチ患者における腎障害の治療 (Takahama, 1995) に使われている漢方処方である。動物実験では、防已黄耆湯は puromycin aminonucleoside ネフローゼラットの蛋白尿を抑制し、その作用機序は腎臓での 6-keto-prostaglandin  $F_{1\alpha}$ /thromboxane $B_2$  比のバランスを改善することが報告されている (Nagasawa, 2001)。これらの漢方処方の報告は、臨床での妊娠高血圧症候群の改善と関係する可能性が考えられるが、当帰芍薬散、柴苓湯および防已黄耆湯に関して妊娠高血圧症候群の動物モデルを用いての詳細な研究報告は未だない。

以上の研究報告を背景に、本論文では L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群モデルラットにおける各漢方処方の薬理効果、特に母体および胎子の両者に対する治療効果を確認し、さらにその作用メカニズムを解明することを目的とし、次の様な実験を試みた。

第 1 に、ラットに L-NAME 処置して作製した妊娠高血圧症候群モデルを用いて、高血圧および子宮内胎子発育遅延 (intrauterine growth retardation: IUGR) に対する当帰芍薬散の影響を胎子大脳の形態学的研究を含めて検討した。

第 2 に、L-NAME を用いて分娩後も引き続き高血圧を引き起こす妊娠高血圧症候群モデルを作製し、当帰芍薬散の抗高血圧作用およびその作用メカニズムを検討するため、血管作用因子について調べた。また、第 1 の実験において当帰芍薬散の抗高血圧作用が、妊娠動物に限定して有効であったことから、ステロイドホルモンとの関連性についても検討した。

第 3 に、第 1 の実験と同様に L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群モデルに対する柴苓湯および防已黄耆湯の影響を検討した。

第 4 に、妊娠高血圧症候群モデルを用いて当帰芍薬散の IUGR 改善作用のメ



カニズムを母体の胎盤および胎子下垂体に焦点をあて、これらを機能形態学的に検討した。

## 第1章 当帰芍薬散の妊娠高血圧症候群モデルに対する影響

緒論で述べたように、妊娠高血圧症候群に対する有効な治療薬は未だ開発されておらず、臨床では主に血圧降下剤のような対症療法に頼っている現状である。当帰芍薬散は妊婦に対する安胎薬として広く使用されている漢方処方であり (Noguchi, 1985; Kano et al., 1991)、妊娠高血圧症候群の治療に大いに期待できる薬剤である。しかし、妊娠高血圧症候群の治療における臨床での当帰芍薬散の報告は学会報告ぐらいしかなく、さらに動物実験での報告は今までまったくないといえる。

以上のことから、本章ではラットに NO 合成酵素阻害剤である L-NAME を処置して作製した妊娠高血圧症候群モデルを用いて、高血圧および IUGR に対する当帰芍薬散の影響を胎子大脳の形態学的研究を含めて検討した。

### 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 CrI : CD (SD) ラット 8 週齢の雌動物を、また交配用に同系統の 9 週齢の雄動物を日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) より購入し、1 週間檢疫馴化させた後、実験に使用した。動物は室温  $23 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 10$  %、換気回数 10-15 回/時間、オールエアーフレッシュ方式、照明 1 日 12 時間 (午前 7 時-午後 7 時) に設定された株式会社ツムラ中央研究所動物棟 2F 動物飼育 5 室の自動飼育装置 (岡崎産業(株), 東京) で金属製の金網床ケージ (260×380×200 mm、(株)東京技研サービス, 東京) に個体毎に 1 匹ずつ収容して飼育した。飼料および飲料水は固形飼料 (MF、(株)オリエンタルバイオサービス, 京都) およびフィルターを介した茨城県阿見町水道事業企業の一般上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、翌日膈スミ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。従って、妊娠満期は21日となる。その他のいくつかの実験で非妊娠動物を使用した。妊娠動物の週齢に合わせて10週齢の雌ラットを購入し、1週間検疫馴化後実験に使用した。全ての実験は研究所における実験動物の管理と使用のための株式会社ツムラのガイドラインに則って行われた。

## 2. 試料の調製

(株)ツムラ（東京）で製造され、日本の厚生労働省によって医療用漢方製剤として認可された当帰芍薬散は、以下に記載された割合の混合生薬の乾燥エキスを使用した。4.0 g 芍薬 (roots of *Paeonia lactiflora* PALLAS) ,4.0 g 蒼朮 (rhizome of *Atractylodes lancea* DE CANDOLLE) ,4.0 g 沢瀉 (rhizome of *Alisma orientale* JUZEP CZUK) ,4.0 g 茯苓 (sclerotium of *Poria cocos* WOLF) ,3.0 g 川芎 (rhizome of *Cnidium officinale* MAKINO) ,3.0 g 当帰 (roots of *Angelica acutiloba* KITAGAWA)。また、これらの生薬標本は、株式会社ツムラ中央研究所生薬保管庫で貯蔵されていたものを使用した。上記の割合で混合した生薬に水を加え、煮沸、フィルターで濾過したものを乾燥することにより、抽出物（乾燥エキス末）を得た。抽出効率は約18.2%であった。この当帰芍薬散の乾燥エキス末を注射用蒸留水（DW；ワッサー「フソー」-PL、扶桑薬品工業(株)、大阪）に溶解し、100 mg/mL および200 mg/mL の溶液を調製した。L-NAME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) は生理食塩液（saline; 大塚生食注、大塚製薬(株)、徳島）に溶解し、250 mg/mL の溶液を調製した。さらに L(+)-Arginine hydrochloride (L-arginine: Sigma Chemical Co.) は、当帰芍薬散 100 mg/mL および200 mg/mL に含有される L-arginine 量に相当する 1.7 mg/mL および 3.4 mg/mL をそれぞれ DW（扶桑薬品工業(株)）に溶解した。調製は全て用時調製で行った。



### 3. 実験方法

#### 3-1. 当帰芍薬散の3D HPLC フィンガープリントの分析

当帰芍薬散は HPLC により化学的特徴づけを行った。ポンプ (LC-10AD; 島津製作所, 京都)、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10A<sub>VP</sub>; 島津製作所) およびカラムオーブン (CTO-10A; 島津製作所) から構成される HPLC に ODS カラム (TSK-GEL ODS-80Ts 4.6 mm i.d.×250 mm; 東ソー株式会社, 東京) を取り付けた。流速とカラム温度は 1.0 mL/min および 40°C に設定した。移動相は A; 50 mM AcONH<sub>4</sub>-AcOH buffer (pH 3.6) および B; CH<sub>3</sub>CN を使用した。これらの分析時の組成は以下の通りである。分析開始時の移動相 A の 90 % および移動相 B の 10 % 混合比率を 60 分間で直線的に変化させ、移動相 A の 0 % および移動相 B の 100 % になるように調整した。吸光度 200-400 nm までの連続した UV データを収集し、ピークの分析と同定には解析ソフト (CLASS-LC10; 島津製作所) を使用した。当帰芍薬散のメタノール溶液の 3 次元 HPLC チャートは Fig. 1 で示した。

#### 3-2. 実験計画

妊娠 14 日に動物は軽度のエーテル麻酔下で浸透圧ミニポンプ (model 2 ML1, ポンプ流量; 10  $\mu$ L/hr : Alzet Corporation, Palo Alto, CA, USA) をラット背部皮下に埋め込んだ。全ての動物は、saline (240  $\mu$ L/day) または L-NAME (60 mg/kg per day) のどちらかを持続注入した。妊娠 14 日から 20 日に DW、当帰芍薬散 (1 g/kg および 2 g/kg) または、L-arginine (17 mg/kg および 34 mg/kg : それぞれ当帰芍薬散の 1 g/kg および 2g/kg に相当する L-arginine 量) は 10 mL/kg の容量でラット胃内に強制経口投与した。

#### 4. 血圧測定

妊娠 19 日および投与 5 日（非妊娠ラット）に収縮期血圧をテールカフ装置（TK-350 Rat Mouse Manometer-Tachometer: UNICOM Inc., 千葉）で、測定 20 分前に 35 °C に設定したチャンバー内に動物を入れて測定した。血圧は 5 回測定し、平均値をラット 1 匹の値として記録した。

#### 5. NO 濃度の測定

母体を断頭屠殺後、採取した血液を  $1400\times g$ , 10 min, 4 °C の条件で遠心分離し、得られた血清をその後の分析までの間 -80 °C で保存した。血清中 NO 濃度の測定はアッセイキット（Total Nitric Oxide Assay Kit: Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA）を使用して行った。

NO はその濃度と直接の化学環境によって数秒から数分間で生理的な半減期をむかえる。NO の濃度がより高い場合は、NO が  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}_3^-$  のような他の反応酸化窒素中間生成物か、より高い酸化窒素 ( $\text{NO}_x$ ) に素早く変換する。しかし、NO の大部分は 2 つの安定した崩壊産物、亜硝酸塩/硝酸塩に酸化することが解っている。従って、これらの負イオン濃度を NO 産生物の定量分析の手段として本実験で使用した。

#### 6. 胎子、胎盤および胎子大脳重量の測定と胎子死亡率および胎子大脳皮質の厚さの測定

妊娠 20 日に母体を断頭屠殺後、子宮を腹腔内より摘出し、生存胎子および胎盤を子宮より分離した。その後それぞれの数を計測し、重量を測定した。さらに雌雄各 3 匹の胎子が無作為に選び、大脳を摘出して重量を測定した。摘出した大脳は 15 %ホルマリン溶液で固定し、パラフィンで包埋した。包埋した組織は、海馬前屈端に近い前額断の領域をマイクロトームにより 4  $\mu\text{m}$  の切片とし、

ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。胎子大脳の組織切片は発達分化の指標として頭頂部の新皮質の領域における皮質の厚さの測定を実施した。また、胎子死亡率は死亡胚・胎子数を数え、着床数を基に（死亡胚・胎子数／着床数）×100で算出した。

## 7. 統計学的処理方法

統計学的検定は Dunnet test により実施した。P<0.05 の場合、各群間で統計学的に有意差があると判断した。Figure と Table のデータは、平均値±標準偏差として表記した。

### 第2節 実験結果

#### 1. 血圧の影響

結果を Fig. 2, 3, 4 および 5 に示した。

L-NAME 処置によるラットの高血圧は当帰芍薬散の投与（1 g/kg, 2 g/kg）によって統計学的有意に抑制された。当帰芍薬散は L-NAME による昇圧効果を元に戻すことで知られる L-arginine を含んでいるが、当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg に含まれる L-arginine 濃度に相当する 17 mg/kg および 34 mg/kg の用量では当帰芍薬散で見られた降圧効果は認められなかった。当帰芍薬散による高血圧の抑制は、Fig. 3 で示されるように L-NAME 処置非妊娠ラットでは観察されなかった。また L-NAME 無処置妊娠および非妊娠ラットでは、当帰芍薬散はそれぞれの動物の血圧に全く影響を及ぼさなかった。

#### 2. NO 濃度の影響

結果を Table 1 に示した。

血清中 NO 濃度は非妊娠ラットより妊娠ラットで高い値を示しており、



L-NAME 処置妊娠または非妊娠ラットの両方で減少した。そして妊娠ラットの血清中 NO 濃度は非妊娠ラットより減少していた。当帰芍薬散はいくつかの場合、例えば、妊娠または非妊娠の L-NAME 処置ラットにおいて、血清中 NO 濃度を統計学的有意に増加したが、その効果は用量に依存した変化ではなかった。当帰芍薬散が L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧に対して、統計学的に有意な降圧効果を示した 2 g/kg の用量で血清中 NO 濃度の変化は認められなかった。

### 3. 胎子、胎盤および胎子大脳重量と胎児死亡率および胎子大脳皮質の厚さについて

結果を Table 2 および Fig. 6 に示した。

当帰芍薬散の 2 g/kg 用量は L-NAME 処置によって引き起こされた胎子重量と胎子大脳重量の減少を改善した。その上、L-NAME 処置によって薄くなった胎子大脳皮質の厚さを用量依存的に厚くした。しかし、当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg に含まれる L-arginine 濃度に相当する 17 mg/kg および 34 mg/kg の用量は L-NAME 処置による胎子重量の減少を元に戻さなかった。また L-NAME 処置によるものと思われるどの様な異常も胎子大脳組織に観察されなかった。さらに胎子死亡率および胎盤重量も統計学的に有意な差は認められなかった。

### 第3節 考察

本章の実験結果から、当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧および IUGR を改善した。さらに IUGR において胎子大脳重量および胎子大脳の発達分化の指標とした大脳皮質の厚さは減少するが、当帰芍薬散はこの減少を改善した。しかし、L-NAME 処置の非妊娠ラットの高血圧は当帰芍薬散投与によって改善されなかった。さらに妊娠および非妊娠ラットの正常血圧

に対しても当帰芍薬散は影響を及ぼさなかった。これらのことは当帰芍薬散が直接的な降圧作用を有しているのではないことを示唆する。その上、当帰芍薬散の降圧効果は本実験の投与用量では用量依存による変化を捉えることはできなかったが、IUGRの改善効果は用量に依存した変化を示した。これらのデータは、当帰芍薬散が高血圧に対する改善作用によってIUGRを改善したのではないことを示した。すなわちIUGRへの当帰芍薬散の効果は抗高血圧作用以外の作用メカニズムを伴うかもしれない。L-arginine (NOSの基質)は、21 mg/kg から70mg/kgの用量の範囲でL-NAME誘発性のIUGRを改善するという報告がある (Buhimschi et al., 1995; Helmbrecht et al., 1996)。当帰芍薬散の1 g/kgと2 g/kgの用量は、それぞれ17 mg/kgおよび34 mg/kgの用量のL-arginineを含んでいる。しかしながら、本実験設定における高血圧およびIUGRはL-arginine 17 mg/kg および34 mg/kgの用量の投与によって改善されず、当帰芍薬散の効果が内在するL-arginine含量による影響とは考えられなかった。さらに当帰芍薬散は血清中NO濃度において軽度な変化を引き起こしたが、非妊娠ラットでのL-NAME誘発性の高血圧は抑制しなかった。これらの結果は、L-NAMEによって引き起こされた妊娠高血圧症候群への当帰芍薬散の降圧効果がNO産生調節によるものではないことを示唆した。

Molsidomine、CGRP、adrenomedulin、endothelin受容体拮抗薬BQ123、プロスタサイクリン、プロジェステロン作用薬promogesteroneおよびエストラジオールを含む様々な物質はL-NAME誘発性妊娠高血圧症候群モデルに対する有用性を研究され、その中でCGRPだけが高血圧とIUGRの両方を改善することが報告された (Buhimschi et al., 1995; Richer et al., 1996; Wimalawansa and Yallampalli, 1998; Makino et al., 1999; Olson et al., 1999; Zlatnik et al., 1999)。興味深いことにL-NAME誘発性の高血圧に対してCGRPの降圧効果は妊娠中に限定され、分娩後においては効果が見られなかった。しかし、プロジェステロンの分泌が分娩

にともなって激減し、その後暫くしてプロジェステロンの分泌が増加したとき、高血圧に対する CGRP の降圧効果は再び認められた (Wimalawansa and Yallampalli, 1998)。これらの報告は、CGRP が NO に依存せず、プロジェステロンと協力して血圧を調節することを意味した。さらに CGRP と当帰芍薬散の両方とも L-NAME 処置妊娠ラットにだけ降圧効果が認められたので、当帰芍薬散の降圧効果は CGRP と同様の可能性がある。従って当帰芍薬散と CGRP を比較して、CGRP が当帰芍薬散の降圧効果に関わるかどうかを検討することは意義があるものと思われる。

#### 第4節 小 括

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧および IUGR に対する当帰芍薬散の影響を検討した。

妊娠 14 日にラットの背部皮下に L-NAME 60 mg/kg/day を浸透圧ミニポンプで埋め込み、妊娠高血圧症候群ラットを作製した。同時に DW および当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg を 10 mL/kg の容量でラットに経口投与した。妊娠 19 日にテールカフ装置にて血圧を測定し、妊娠 20 日に帝王切開して胎子を得た。得られた胎子は重量を測定し、頭部から大脳を摘出し、大脳重量を測定して組織学的検索のために 15 %ホルマリン溶液に保存した。その後、胎子大脳をパラフィンで包埋し、ミクロトームで組織切片とし、HE 染色を施して大脳皮質の厚さを測定した。その結果、当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を改善し IUGR を改善した。さらに IUGR において胎子大脳重量および大脳皮質の厚さは減少するが、当帰芍薬散はこの減少を改善した。当帰芍薬散の抗高血圧作用は妊娠ラットにおいてのみ認められ、L-NAME 処置非妊娠ラットでは認められなかった。さらに妊娠および非妊娠ラットの正常血圧に対しても当帰芍薬散は何ら影響を及ぼさなかった。当帰芍薬散の降圧効果は用量に依存し

た変化ではなかったが、IUGR に対する効果は用量依存性の変化だった。当帰芍薬散に含有する同等量の L-arginine を投与したが、高血圧および IUGR の改善効果は見られなかった。また、当帰芍薬散の投与用量での血清中 NO 濃度は軽度な変化が認められたのみであった。

以上のことから、1) 当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの血圧および IUGR を改善する。2) 当帰芍薬散の抗高血圧作用は直接の降圧作用によるものではなく、また NO 産生調節も関与していない。3) IUGR において胎子大脳重量および大脳皮質の厚さは減少するが、当帰芍薬散はこの減少を改善する。4) 当帰芍薬散の抗高血圧作用は妊娠動物に限定される。5) 当帰芍薬散の IUGR の改善作用は、抗高血圧作用とは別のメカニズムである可能性が高いことなどが明らかとなった。

## 第2章 当帰芍薬散の妊娠および分娩後高血圧に対する抑制機序

緒論で述べたように、妊娠高血圧症候群の患者の一部は、分娩後も引き続き高血圧を発症する。第1章において当帰芍薬散の抗高血圧作用は、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧以外は全く影響を及ぼさず、また NO 産生調節も関与していないことが明らかとなった。また、この当帰芍薬散の降圧効果は CGRP の作用に非常に類似していた (Wimalawansa and Yallampalli, 1998)。

以上のことから、本章では L-NAME を用いて分娩後も引き続き高血圧を引き起こす妊娠高血圧症候群モデルを作製し、当帰芍薬散の抗高血圧作用およびその作用メカニズムを検討するため、血管作用因子について検討した。また、第1章で当帰芍薬散の抗高血圧作用が、妊娠動物に限定して有効であったことから、ステロイドホルモンとの関連性についても検討した。

### 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。但し、妊娠0日から分娩後7日までの間の飼育には TPX (ポリイソペンテン) 製ラットケージ (292×440×200 mm、日本チャールス・リバー(株)、神奈川) に床敷きとしてペパークリーン (日本エスエルシー株式会社、静岡) を入れたものを用い、個体毎に1匹ずつ収容して飼育した。

#### 2. 試料の調製

第1章に記したものとほぼ同一であるが、加えてプロジェステロン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) および mifepristone (RU-486; progesterone antagonist: BIOMOL Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) はオリ



ーブオイルに懸濁し、それぞれ 10 mg/mL および 15 mg/mL の溶液を調製した。調製は全て用時調製で行った。

### 3. 実験方法

#### 3-1. 実験計画

妊娠 16 日に動物は軽度のエーテル麻酔下で、浸透圧ミニポンプ (model 2ML2, ポンプ流量; 5  $\mu$ L/hr : Alzet Corporation) をラット背部皮下に埋め込んだ。全ての動物は、saline (120  $\mu$ L/day) または L-NAME (60 mg/kg per day) のどちらかを持続注入した。妊娠 16 日から分娩後 7 日まで DW および当帰芍薬散 (1 g/kg および 2 g/kg) は 10 mL/kg の容量でラット胃内に強制経口投与した。さらに分娩後 0 日から 7 日までプロジェステロン (2 mg/rat, twice daily) および RU-486 (30 mg/kg) はラット背部に皮下投与した。

#### 4. 血圧測定

妊娠 19 日、分娩後 1 日および 6 日に収縮期血圧をテールカフ装置 (TK-350 Rat Mouse Manometer-Tachometer: UNICOM Inc.) を使用して、第 1 章と同一条件で測定した。

#### 5. NO 濃度の測定

第 1 章に記したものと同様に測定した。

#### 6. プロジェステロン、 $17\beta$ -エストラジオールおよびテストステロン・レベルの測定

母体を断頭屠殺後、採取した血液を  $1400\times g$ , 10 min, 4  $^{\circ}$ C の条件で遠心分離し、得られた血清をその後の分析までの間 -80  $^{\circ}$ C で保存した。血清中プロジェステ

ロンレベルの測定は Progesterone enzyme immunoassay kit (Assay Design, Inc.) を使用し、血清中  $17\beta$ -エストラジオールレベルの測定は  $^{125}\text{I}$ -estradiol radioimmunoassay kit (Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA) をそれぞれ使用して行った。さらに血清中テストステロンレベルは Testosterone radioimmunoassay kit (Immunotech, Marseille, France) を使用して測定した。

### 7. CGRP および endothelin-1 濃度の測定

軽度のエーテル麻酔下で母体の後大静脈からアプロニチン (WAKO, Osaka) 添加 EDTA-2K (ethylenediamine tetraacetic acid: WAKO) 処理を施したシリンジで採取した血液を、 $1600\times g$ , 15 min,  $0^\circ\text{C}$  の条件で遠心分離し、得られた血漿をその後の分析までの間  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。さらに血漿は、C-18 reverse phase cartridge (Sep-Pak Cartridges: Waters, Milford, MA, USA) を使用して測定前に抽出過程を施した。血漿中 CGRP 濃度の測定は Rat CGRP enzyme immunoassay kit (SPI-BIO, Massy, France) を使用し、血漿中 endothelin-1 濃度の測定は Endothelin-1, human/porcine/canine/rat/mouse/bovine, EIA high sensitivity kit (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, CA, USA) をそれぞれ使用して行った。

### 8. 統計学的処理方法

統計学的検定は血清中の sex steroids レベルを除いて Dunnet のパラメトリックの多重比較テスト、または Bonferroni 補正の Student's *t*-test により実施した。血清中 sex steroids レベルの差は Steel のノンパラメトリックの多重比較テストで解析した。P<0.05 の場合、各群間で統計学的に有意差があると判断した。Figure と Table のデータは、平均値±標準偏差として表記した。

## 第2節 実験結果

### 1. 血圧の影響

結果を Fig. 7, 8 および 9 に示した。

血圧は妊娠 19 日、分娩後 1 日および 6 日で L-NAME 処置によって上昇した。当帰芍薬散の投与は第 1 章の実験結果と同様にラットの妊娠 19 日における L-NAME 誘発性の高血圧を抑制した。さらに当帰芍薬散は分娩後 6 日の高血圧を抑制したが、分娩後 1 日は血圧を下げなかった。

さらに sex steroids レベルの測定の結果から、当帰芍薬散が降圧効果を示した妊娠 19 日および分娩後 7 日と効果を示さなかった分娩後 1 日の間では、プロジェステロンレベルに明らかな違いがあることが解った (G19 vs. P1,  $p < 0.01$ ; P1 vs. P7,  $p < 0.01$ )。従って、当帰芍薬散が一定レベルのプロジェステロンと共存することで有効な効果を持つ可能性があるかと仮定した。この仮説を実証するために DW または当帰芍薬散を投与したラットの分娩後 0 日および 1 日にプロジェステロンを、また分娩後 0 日から 7 日にプロジェステロン拮抗薬 RU-486 を処置した実験を行った。RU-486 の同時処置は分娩後 6 日において当帰芍薬散の効果を無効にしたが、プロジェステロンの同時処置は分娩後 1 日において当帰芍薬散の降圧効果を再現した。L-NAME 処置ラットへの当帰芍薬散とプロジェステロンの併用投与でのプロジェステロンレベルは分娩後 1 日において、DW または当帰芍薬散単独投与した L-NAME 処置ラットと比較して統計学的に有意に増加していた。このプロジェステロンレベルの増加は、プロジェステロンの外因性投与の結果であると思われた。L-NAME 処置ラットにおける当帰芍薬散単独投与と当帰芍薬散および RU-486 処置との間には、プロジェステロンレベルにおいて統計学的有意差は見られなかったが、当帰芍薬散および RU-486 と併用投与した L-NAME 処置ラットのプロジェステロンレベルは、DW 投与した L-NAME 処置ラットと比較して有意に減少した。これらの結果は、当帰芍薬散においてある

一定レベルのプロジェステロンが存在したときにだけ降圧効果が認められたことを証明した。

## 2. NO 濃度の影響

結果を Fig. 10-C に示した。

L-NAME 処置によって減少した血清中 NO 濃度は、妊娠 19 日と分娩後 7 日において当帰芍薬散投与で統計学的有意に増加した。

## 3. プロジェステロン、 $17\beta$ -エストラジオールおよびテストステロンレベルの影響

結果を Table 3 に示した。

血圧の結果から、当帰芍薬散の降圧効果は妊娠または非妊娠状態、分娩前または分娩後の期間に依存しているかもしれないことが示唆された。さらに sex steroids レベルは、妊娠および授乳期までの間、非常に変動が激しいことが知られているので (Taya and Greenwald, 1981;1982)、妊娠 19 日、分娩後 1 日および 7 日に DW または当帰芍薬散を投与した動物の血清中プロジェステロン、 $17\beta$ -エストラジオールおよびテストステロン・レベルを測定した。Taya and Greenwald (1981) によって報告された結果と同様に、血清中  $17\beta$ -エストラジオールレベルは妊娠 19 日に高いレベルを示し、分娩後 1 日と 7 日の両方で減少していた。血清中プロジェステロンレベルは、 $17\beta$ -エストラジオールレベルと同様に妊娠 19 日に高いレベルを示し、分娩後 1 日で一時減少したが、分娩後 7 日には妊娠 19 日より高いレベルまで増加した。また、血清中テストステロンレベルは全体を通して比較的低い値を示しており、妊娠 19 日から分娩後 7 日までの間の変化はごく僅かだった。L-NAME 処置および当帰芍薬散投与は妊娠 19 日、分娩後 1 日および 7 日の時点で、これらの血清中 sex steroids レベルに明らかな影響を与

えなかった。

#### 4. CGRP および endothelin-1 濃度の影響

結果を Fig. 10-A, B に示した。

血漿中 CGRP 濃度は、当帰芍薬散とプロジェステロンを併用投与したラットの分娩後1日で統計学的有意に増加した。一方、血漿中 endothelin-1 濃度は、妊娠19日、分娩後1日および7日において統計学的に明らかな差は認められなかった。

### 第3節 考察

本章の実験結果から、当帰芍薬散は L-NAME によって引き起こされたラットの妊娠19日および分娩後7日の高血圧を抑制したが、分娩後1日の高血圧を抑制することはできなかった。そしてこれらの結果は、当帰芍薬散の降圧効果が母体の状態によって著しく影響を受ける可能性を示した。ラットの妊娠から分娩後しばらくの間における sex steroids の血中レベルの非常に大きな変動のあることは以前に報告された (Taya and Greenwald, 1981; 1982)。従って、本実験ではプロジェステロン、 $17\beta$ -エストラジオールおよびテストステロンの血清中レベルを測定した。当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの妊娠19日、分娩後1日および7日における血清中プロジェステロン、 $17\beta$ -エストラジオールおよびテストステロン・レベルに著しい影響を及ぼさなかった。しかし、当帰芍薬散が *in vitro* で、妊娠ラットの黄体からプロジェステロンおよび  $17\beta$ -エストラジオールの分泌を促進するという報告がある (Usuki, 1988; 1990; Irahara et al., 2000)。けれども実際、当帰芍薬散が現在の *in vivo* の研究で、これらの sex steroids の血清中レベルの調節によって降圧効果を示した可能性は低かった。本章の実験結果から、当帰芍薬散の効果があるとき (妊娠19日および分娩後7日) および効果のないとき (分娩後1日) の血清中 sex steroids レベルの比較では、

最も際立った違いがプロジェステロンレベルにあることが明らかとなった。このことから当帰芍薬散の抗高血圧作用は、ある一定レベルのプロジェステロンとの共存に依存するのではないかと仮定した。この仮説は以下の研究結果によって強くサポートされた。①分娩後 7 日での当帰芍薬散の抗高血圧作用はプロジェステロン拮抗薬の RU-486 (Kalimi, 1987; Liao, 1996) 併用投与で打ち消された。②分娩後 1 日での当帰芍薬散の抗高血圧作用はプロジェステロンとの併用投与で効果が認められた。

次に当帰芍薬散の抗高血圧作用メカニズムに対する証拠を得るために、血中 NO、CGRP および endothelin-1 濃度を測定した。これら全ては本実験モデルの血圧に影響を及ぼすことが知られている (Tippins, 1986; Diket et al., 1994; Buhimschi et al., 1995; Wimalawansa and Yallampalli, 1998)。当帰芍薬散の抗高血圧作用が有効な妊娠 19 日と分娩後 7 日で当帰芍薬散は血清中 NO 濃度の低下を改善したように見えるが、第 1 章の実験結果において当帰芍薬散は妊娠 19 日の血清中 NO 濃度を増加しない状態で降圧効果を示した。同様に本章の実験において、分娩後 1 日における当帰芍薬散とプロジェステロンの併用投与は血清中 NO 濃度を増加しないで高血圧を抑制した。当帰芍薬散がこれら二つの実験で、全く同様の作用メカニズムによって抗高血圧作用を示したと考えるなら、当帰芍薬散が NO 産生調節以外の作用メカニズムで効果が発揮されたと仮定することは最も適切だと思われる。しかしながら、これは少なくともいくつかの条件で、当帰芍薬散が NO の影響で L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットにおける降圧効果を産生する可能性を完全に除くことはできない。今後このポイントを明らかにするためにさらなる広範囲な研究の必要性を痛感する。

CGRP および endothelin-1 は、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの血圧を調節することが既に報告されている (Edwards et al., 1996; Gangula et al., 1997a; Wimalawansa and Yallampalli, 1998; Olson et al., 1999)。しかしながら、本章の実験

では CGRP と endothelin-1 の血漿中濃度と当帰芍薬散の降圧効果との関係を明らかにすることはできなかった。従って、当帰芍薬散が CGRP と endothelin-1 産生を調節することによって効果を発揮すると結論を下すことは難しいだろう。当帰芍薬散は血漿中 CGRP 濃度に影響を及ぼすようには見えないが、血圧への当帰芍薬散の効果はプロジェステロンとの組み合わせで CGRP の降圧効果といくつかの類似性を持つ。Gangula ら (1997b) は最近 37 のアミノ酸神経ペプチドでできている CGRP (Rosenfeld et al., 1983; Wimalawansa, 1996) が非常に強力な内在性の血管拡張剤であり (Tippins, 1986)、妊娠ラットでの L-NAME 誘発性の高血圧を抑制するが、分娩後 1 日および 7 日、または卵巣摘出非妊娠ラットで高血圧を抑制するというわけではなく、さらにそのようなラットに対してプロジェステロンの併用投与は CGRP の降圧効果を再現すると報告した。これらの報告は CGRP が一定レベルのプロジェステロンと共存することにおいてのみ、少なくとも妊娠中と分娩後の期間に血圧を下げることを示している。CGRP の血管拡張作用がプロジェステロンによって調節され、当帰芍薬散が CGRP 産生に影響を及ぼさないという概念を受け入れるなら、当帰芍薬散自身に CGRP のような効果があると仮定できるかもしれない。当帰芍薬散の CGRP のような活性は今まで報告されたことはないが、生薬が通常、多くのペプチドを含んでいることはよく知られているので、当帰芍薬散においても CGRP への相同の (同種の) ペプチドが含まれているかもしれない。しかしながら、慎重で大規模な比較実験が CGRP と当帰芍薬散による効果の明らかな類似性について議論するためには必要であると思われる。

#### 第4節 小括

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの妊娠中および分娩後の高血圧に対する当帰芍薬散の影響を検討した。



妊娠 16 日から分娩後 7 日までラットの背部皮下に L-NAME 60 mg/kg/day を浸透圧ミニポンプで埋め込み、妊娠高血圧症候群ラットを作製した。同時に DW および当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg を 10 mL/kg の容量でラットに経口投与した。そして妊娠 19 日、分娩後 1 日および 6 日にテールカフ装置にて血圧を測定した。その結果、当帰芍薬散は妊娠 19 日および分娩後 7 日で L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制したが、分娩後 1 日の高血圧は抑制しなかった。さらに血清中 sex steroids レベルの測定の結果から、当帰芍薬散の降圧効果は一定レベルのプロジェステロンと共存することで有効性を持つと考えられたので、抗高血圧作用が見られなかった分娩後 1 日において、プロジェステロンを分娩後 0 日および 1 日に処置した結果、当帰芍薬散の降圧効果は再び認められた。また抗高血圧作用の見られた分娩後 6 日において、プロジェステロン拮抗薬の RU-486 を分娩後 0 から 7 日に処置した結果、当帰芍薬散の降圧効果は無効にした。さらに当帰芍薬散の抗高血圧作用のメカニズム解明のため血管弛緩収縮因子である血中 NO、CGRP および endothelin-1 濃度を測定したが、これらの因子の血中濃度は当帰芍薬散の降圧効果に関連すると思われる変化は認められなかった。

以上のことから、1) 当帰芍薬散は妊娠 19 日および分娩後 7 日の L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制するが、分娩後 1 日の高血圧は抑制しない。2) 当帰芍薬散の抗高血圧作用はある一定レベルのプロジェステロンとの共存に依存する可能性がある。3) 当帰芍薬散の抗高血圧作用は血管弛緩収縮因子である NO、CGRP および endothelin-1 の血中濃度に依存しないことなどが明らかとなった。

### 第3章 柴苓湯および防已黄耆湯の妊娠高血圧症候群モデルに対する影響

緒論で述べたように、妊娠高血圧症候群に対する治療薬は未だ開発されておらず、臨床では主に血圧降下剤のような対症療法に頼っている現状である。柴苓湯は、その主たる作用である利尿作用によって、臨床での浮腫や蛋白尿 (Ito et al., 1996; Ushiroyama, 2003) および腎疾患に対する治療効果が期待される漢方処方である (Senaga and Kawashima, 1986)。一方、防已黄耆湯は、臨床では主に変形性膝関節症 (Otani et al., 1997; Noguchi et al., 2004)、蛋白尿、膝の浮腫、慢性関節リウマチ患者における腎障害の治療 (Takahama, 1995) に使われている漢方処方である。これらの漢方処方の報告は、臨床での妊娠高血圧症候群の改善と関係する可能性が考えられるが、柴苓湯および防已黄耆湯に関して妊娠高血圧症候群の動物モデルを用いての詳細な研究報告は今までまったくないといえる。

以上のことから、本章では当帰芍薬散と同様にラットを用いた NO 合成酵素阻害剤である L-NAME で誘発された妊娠高血圧症候群モデルの高血圧および IUGR に対する柴苓湯および防已黄耆湯の影響を検討した。

#### 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じである。

##### 2. 試料の調製

(株)ツムラ (東京) で製造され、日本の厚生労働省によって医療用漢方製剤として認可された柴苓湯および防已黄耆湯は、以下に記載された割合の混合生薬の乾燥エキスをを使用した。柴苓湯 : 7.0 g 柴胡 (roots of *Bupleurum falcatum*

LINNÉ) ,5.0 g 沢瀉 (rhizomes of *Alisma orientale* JUZEPCZUK) ,5.0 g 半夏 (rhizomes of *Pinellia ternata* BREITENBACH) ,3.0 g 黄芩 (roots of *Scutellaria baicalensis* GEORGI) ,3.0 g 蒼朮 (rhizomes of *Atractylodes lancea* DE CANDOLLE) ,3.0 g 大棗 (fruits of *Zizyphus jujube* MILLER var. *inermis* REHDER) ,3.0 g 猪苓 (sclerotium of *Polyporus umbellatus* FRIES) ,3.0 g 人參 (roots of *Panax ginseng* C. A. MEYER) ,3.0 g 茯苓 (sclerotium of *Poria cocos* WOLF) ,2.0 g 甘草 (roots of *Glycyrrhiza uralensis* FISCHER) ,2.0 g 桂皮 (stem bark of *Cinnamomum cassia* BLUME) ,1.0 g 生姜 (rhizomes of *Zingiber officinale* ROSCOE)。防已黄耆湯:5.0 g 黄耆 (roots of *Astragalus membranaceus* BUNGE) ,5.0 g 防已 (rhizomes of *Sinomenium acutum* REHDER et WILSON) ,3.0 g 蒼朮 (rhizomes of *Atractylodes lancea* DE CANDOLLE) ,3.0 g 大棗 (fruits of *Zizyphus jujube* MILLER var. *inermis* REHDER) ,1.5 g 甘草 (roots of *Glycyrrhiza uralensis* FISCHER) ,1.0 g 生姜 (rhizomes of *Zingiber officinale* ROSCOE)。また、これらの生薬標本は、株式会社ツムラ中央研究所生薬保管庫で貯蔵されていたものを使用した。上記の割合で混合した生薬に水を加え、煮沸、フィルターで濾過したものを乾燥することにより、抽出物（乾燥エキス末）を得た。抽出効率はそれぞれ、約 15.0 %（柴苓湯）および 20.3 %（防已黄耆湯）であった。これらの柴苓湯および防已黄耆湯の乾燥エキス末を DW（扶桑薬品工業株）に溶解し、100 mg/mL および 200 mg/mL の溶液を調製した。L-NAME（Sigma Chemical Co.）は saline（大塚製薬株）に溶解し、250 mg/mL の溶液を調製した。さらに L-arginine（Sigma Chemical Co.）は、柴苓湯 100 mg/mL および 200 mg/mL に含有される L-arginine 量に相当する 2.9 mg/mL および 5.8 mg/mL をそれぞれ DW（扶桑薬品工業株）に溶解した。調製は全て用時調製で行った。

### 3. 実験方法

#### 3-1. 柴苓湯および防己黄耆湯の3D HPLC フィンガープリントの分析

第1章に記した当帰芍薬散と同様の方法で、柴苓湯および防己黄耆湯は HPLC により化学的特徴づけを行った。柴苓湯および防己黄耆湯のメタノール溶液の3次元 HPLC チャートは Fig. 11 および Fig. 12 に示した。

#### 3-2. 実験計画

第1章に記したものと同様にラットを L-NAME 処置し、妊娠14日から20日に DW、柴苓湯および防己黄耆湯(1 g/kg および 2 g/kg) または L-arginine(29 mg/kg および 58 mg/kg : それぞれ柴苓湯の 1 g/kg および 2 g/kg に相当する L-arginine 量) は 10 mL/kg の容量でラット胃内に強制経口投与した。

### 4. 血圧測定

第1章に記したものと同様に測定した。

### 5. NO 濃度の測定

第1章に記したものと同様に測定した。

### 6. プロジェステロンおよび $17\beta$ -エストラジオール・レベルの測定

第2章に記したものと同様に測定した。

### 7. CGRP および endothelin-1 濃度の測定

第2章に記したものと同様に測定した。

## 8. 胎子および胎盤重量の測定

妊娠 20 日に母体を断頭屠殺後、子宮を腹腔内より摘出し、生存胎子および胎盤を子宮より分離した。その後それぞれの数を計測し、重量を測定した。

## 9. 統計学的処理方法

第 1 章に記したものと同一である。

### 第 2 節 実験結果

#### 1. 血圧の影響

結果を Fig. 13, 14, 15 および 16 に示した。

柴苓湯と防已黄耆湯は、L-NAME による昇圧を抑制することで知られる L-arginine を含んでいる。従って本実験では、柴苓湯の 1 g/kg および 2 g/kg にそれぞれ含有する L-arginine 濃度と同等量の 29 mg/kg および 58 mg/kg の用量を投与した（ただし、防已黄耆湯は含有する L-arginine 量が 2 g/kg 相当で 16 mg/kg と少ないので投与しなかった）。この L-arginine 投与は 58 mg/kg の用量でのみ降圧効果が認められた。L-NAME 処置によるラットの高血圧は、柴苓湯および防已黄耆湯の投与によって統計学的に有意な抑制が認められた。さらに柴苓湯は非妊娠動物の L-NAME 処置によるラットの高血圧を統計学的有意に抑制した。一方、L-NAME 無処置妊娠および非妊娠ラットの血圧に対しては、柴苓湯および防已黄耆湯ともに何ら影響を及ぼさなかった。

#### 2. NO 濃度の影響

結果を Table 4 に示した。

血清中 NO 濃度は、L-NAME 処置/無処置または妊娠/非妊娠に関わらず全ての動物、また柴苓湯および防已黄耆湯の全ての用量で統計学的に有意な増加を示

した。

### 3. プロジェステロンおよび $17\beta$ -エストラジオール・レベルの影響

結果を Table 5 に示した。

柴苓湯 1 g/kg および 2 g/kg の用量は、L-NAME 無処置妊娠ラットの $17\beta$ -エストラジオールの血清中レベルを統計学的有意に減少させた。一方、血清中プロジェステロンレベルは、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットにおける柴苓湯および防已黄耆湯 1 g/kg の用量で有意な増加が認められた。

### 4. CGRP および endothelin-1 濃度の影響

結果を Table 6 に示した。

柴苓湯 2 g/kg の用量は、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの血漿中 CGRP 濃度の統計学的有意な増加が、防已黄耆湯は 1 g/kg および 2 g/kg の用量ともに有意な増加が認められた。さらに防已黄耆湯は、同用量で血漿中 endothelin-1 濃度を有意に減少した。その他 L-NAME 処置非妊娠ラットおよび L-NAME 無処置妊娠および非妊娠ラットにおいて、柴苓湯および防已黄耆湯は血漿中 CGRP および endothelin-1 濃度に対して何ら影響を及ぼさなかった。

### 5. 胎子および胎盤重量について

結果を Table 7 に示した。

柴苓湯および防已黄耆湯の 1 g/kg および 2 g/kg、または L-arginine 29 mg/kg および 58 mg/kg の用量は、L-NAME 処置によって引き起こされた胎子重量の減少に影響を及ぼさなかった。また防已黄耆湯の 1 g/kg の用量で、胎盤重量は統計学的に有意な減少が見られたが、防已黄耆湯の 2 g/kg の用量では認められなかった。

## 第3節 考察

本章の実験結果から、柴苓湯および防已黄耆湯は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を改善した。しかし、柴苓湯および防已黄耆湯ともに IUGR を改善することはできなかった。当帰芍薬散と同様に、防已黄耆湯は L-NAME 処置妊娠ラットでだけ降圧効果が認められたが、柴苓湯は L-NAME 処置妊娠および非妊娠ラットの両方で降圧効果が認められた。さらに当帰芍薬散と共通の作用として、柴苓湯および防已黄耆湯ともに妊娠および非妊娠ラットの正常血圧に何ら影響を認めなかった。この結果は三種の漢方処方が直接的な降圧作用を有しているのではないことを示すと思われる。

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットに対して柴苓湯の 2 g/kg に含有する L-arginine 濃度と同等量の 58 mg/kg の用量を投与したところ、降圧効果が認められた。それ故に柴苓湯は少なくとも一部分で構成成分である L-arginine を介して薬理効果を示すことが可能と考えられた。しかしながら、血圧における L-arginine の影響は血清中 NO 濃度 (L-NAME 処置群:  $12.69 \pm 2.94 \mu\text{Mol/L}$  に対して、L-arginine 29 mg/kg で  $15.30 \pm 5.82 \mu\text{Mol/L}$ ; 58 mg/kg で  $13.13 \pm 2.14 \mu\text{Mol/L}$ ) の変化と一致しなかった。この明らかな矛盾は血清中 NO 濃度が血管内皮の弛緩原因となる NO の正味の量よりも、様々な器官と組織から誘導される蓄積された NO 代謝物 (硝酸塩/亜硝酸塩) の総量を示すという事実によって説明できると思われる。しかし将来、この点をはっきりさせるため、広範囲にわたる研究の必要性を痛感する。

CGRP は非常に強力な内在性の血管拡張薬であること (Tippins, 1986)、および L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制することが報告されている (Gangula et al., 1997a; Wimalawansa and Yallampalli, 1998)。その上、Gangula ら (1997b) は、最近、この 37 アミノ酸神経ペプチド (Rosenfeld et al., 1983; Wimalawansa, 1996) が妊娠ラットでだけ、しかし産後の期間または卵巣摘出非

妊娠ラットではないが、L-NAME によって産生された高血圧を抑制することができることを報告した。また endothelin-1 は血管の内皮細胞由来の血管収縮ペプチドであり、endothelin 拮抗薬が L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制することが報告された (Olson et al., 1999)。本章の実験で防已黄耆湯は血漿中の CGRP と endothelin-1 濃度の両方に、柴苓湯は CGRP にだけ影響を及ぼすことを証明した。第2章の実験で当帰芍薬散が血漿中 CGRP と endothelin-1 濃度に影響を及ぼさなかったことを示した。これらの所見は三種の漢方処方には作用の異なったメカニズムが少なくとも一部あると推定され、これらの薬理作用メカニズムの違いの本質がまだ未解明のまま残っていることを示した。

プロジェステロンとテストステロンの L-NAME 処置ラットにおける高血圧を抑制するメカニズムはよく解っていないが、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制する効果を持つことが報告されている (Buhimschi et al., 1995; Liao et al., 1996)。第2章の実験で当帰芍薬散の降圧効果が、妊娠19日および分娩後7日と分娩後1日で違いがあり、この違いは血清中のプロジェステロンレベルに関係するかもしれないということを証明した。Sex steroids レベル、特にプロジェステロンは出産前および出産後に劇的に変化することが知られているので、測定タイミングは重要になると考えられる。第1章および第2章の実験で、妊娠19日と20日の間の血清中 sex steroids と血圧レベルとの間の本質的に同様の影響を証明した。したがって本章の実験ではこれらの結果を考慮して当帰芍薬散と同様の条件で、柴苓湯および防已黄耆湯の効果を比較する適切な時期として妊娠19日を選択した。さらに血清中 sex steroids レベルを測定したところ、血清中プロジェステロンレベルに対する柴苓湯および防已黄耆湯の統計学的に有意な影響および血清中  $17\beta$ -エストラジオールに対する柴苓湯の有意な影響が認められた。しかしながら、これらの変化は柴苓湯および防已黄耆湯の降圧効果と関連していなかったため、これらの変化が柴苓湯および防已



黄耆湯に対する有益な効果を含むかどうかは現在のところはっきりしないと思われる。

#### 第4節 小 括

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血压および IUGR に対する柴苓湯および防己黄耆湯の影響を検討した。

妊娠 14 日にラットの背部皮下に L-NAME 60 mg/kg を浸透圧ミニポンプで埋め込み、妊娠高血圧症候群ラットを作製した。同時に DW、柴苓湯および防己黄耆湯 1 g/kg および 2 g/kg を 10 mL/kg の容量でラットに経口投与した。妊娠 19 日にテールカフ装置にて血圧を測定し、妊娠 20 日に帝王切開して胎子を得た。得られた胎子は重量を測定した。その結果柴苓湯および防己黄耆湯は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの IUGR を改善しなかったが、高血压は改善した。また防己黄耆湯においては高血压の抑制は妊娠動物においてのみ認められ、L-NAME 処置非妊娠ラットでは認められなかった。しかし、柴苓湯は L-NAME 処置非妊娠ラットの高血压を抑制した。柴苓湯および防己黄耆湯ともに妊娠および非妊娠ラットの正常血圧に対しては何ら影響を及ぼさなかった。また、柴苓湯に内在する同等量の L-arginine を投与した結果、柴苓湯 2 g/kg に相当する 58 mg/kg においてのみ降圧効果が認められた。故に柴苓湯は少なくとも一部分で、構成成分である L-arginine を介してその薬理効果に影響を及ぼすことが可能であると思われたが、血圧における L-arginine の影響は血清中 NO 濃度の変化と一致しなかったのではっきりとしたことは解らなかった。さらに防己黄耆湯は血漿中の CGRP と endothelin-1 濃度の両方に、柴苓湯は CGRP にだけ影響を及ぼすことが判明した。第2章の実験で当帰芍薬散が血漿中 CGRP と endothelin-1 濃度の両方に影響を及ぼさなかったことを示した。従って、これら三種の漢方処方には少なくとも作用の異なったメカニズムが一部分存在すると推定された。

また当帰芍薬散の降圧効果が妊娠中および分娩後で違いがあり、この違いは血清中のプロジェステロンレベルに関係するかもしれないということを第2章の実験で証明したので、本章の実験においても血清中 sex steroids レベルを測定した。しかし、柴苓湯および防己黄耆湯の降圧メカニズムが血清中 sex steroids レベルと関連すると思われる事実は見出せなかった。

以上のことから、1) 柴苓湯および防己黄耆湯は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を改善するが、IUGR に対しては効果がない。2) 柴苓湯は直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は血漿中 CGRP 濃度の増加に基因する。さらにこの柴苓湯の降圧効果は、L-NAME 処置ラットの妊娠/非妊娠状態に関係無く有効である。3) 防己黄耆湯も同様に直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は血漿中 CGRP 濃度の増加および endothelin-1 濃度の減少に基因することなどが明らかとなった。

## 第4章 当帰芍薬散の子宮内胎児発育遅延の抑制機序

第1章ではNO合成酵素阻害剤であるL-NAMEを処置して作製した妊娠高血圧症候群ラットの高血圧およびIUGRを当帰芍薬散は改善した。しかし、このときの当帰芍薬散のIUGR改善効果は抗高血圧作用とNOとはあまり関係がないことが示された。またsex steroidsや血管調節因子などの様々な因子が妊娠高血圧症候群モデルにおける高血圧を抑制するように見える。しかしながら、これらの因子のIUGRへの有益な効果は未だ報告がない。さらにL-NAME誘発性妊娠高血圧症候群ラットにおける降圧効果を持った柴苓湯および防己黄耆湯がIUGRにどんな有益な影響も及ぼさなかったことを第3章で示した。以上に述べたことから、当帰芍薬散のL-NAME誘発性妊娠高血圧症候群ラットにおける抗高血圧作用はIUGRの予防に関連しているとは思えなかった。従って、IUGRへの当帰芍薬散の効果は抗高血圧作用以外の他の作用が存在すると考えられた。

IUGRの発生要因として、母体側の胎盤のアポトーシスの増加など胎盤の器質的障害が原因だと報告されている（Miller, 1996; Axt, 1999; Erel, 2001; Barrio, 2004）。一方、胎子側のIUGRの発生要因として、成長ホルモン（growth hormone: GH）の分泌機能低下がある。GHは下垂体GH産生細胞（somatotrope）から産生されるホルモンで加齢による変化は少ない。GHの分泌調節機構には種差があるが、基本的には視床下部ホルモンであるgrowth hormone releasing hormone（GHRH）による分泌促進作用とソマトスタチン（SRIF）による分泌抑制作用の両方によって制御される（Hartman, 1993; Giustina, 1998）。さらにヒトにおけるIUGRの主な要因は、視床下部および下垂体の器質的障害が原因となっていることが多いと言われている。

以上のことから、本章では第1章で確認した当帰芍薬散のIUGRの改善作用を母体の胎盤および胎子下垂体に焦点をあて、これらを機能形態学的に検討す

ることを目的とした。

## 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

第1章に記したものと同一であるが、但し、アルギニンは使用しなかった。

### 3. 実験方法

#### 3-1. 実験計画

第1章に記したものと同一であるが、但し、アルギニンは使用しなかった。

### 4. 胎子および胎盤重量の測定

第3章に記したものと同様に測定した。

### 5. 血糖値、NO、GH および IGF- I レベルの測定

母体および胎子を断頭屠殺後、採取した血液を  $1400 \times g$ , 10 min, 4 °C の条件で遠心分離し、得られた血清をその後の分析までの間 -80 °C で保存した。

血糖値の測定は得られた血清を biochemical analyzer (model TBA-20FR: TOSHIBA, 東京) を使用して測定し、血清中 NO 濃度の測定はアッセイキット (Total Nitric Oxide Assay Kit: Assay Designs Inc.) を使用して測定した。また、血清中 GH レベルは EIA キット (rat growth hormone enzyme immunoassay kit: SPI-BIO) を使用し、Insulin-like growth factor I (IGF- I) レベルは ELISA キット (IGF- I, mouse, ELISA kit, Quantikine (96well) : R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を使用してそれぞれ測定した。

## 6. GHRH レベルの測定

母体および胎子からアプロチニン (Wako, Osaka) 添加 EDTA-2K (ethylenediamine tetraacetic acid: Wako) 処理を施したシリンジで採血し、1600 ×g, 15 min, 0°C の条件で遠心分離し、得られた血漿をその後の分析までの間 -80 °C で保存した。血漿中 GHRH レベルは EIA キット (growth hormone releasing factor, Rat, enzyme immunoassay kit: Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA) を使用して測定した。

## 7. 胎盤の組織標本および免疫組織化学染色標本の作製法

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラット母体の胎盤は 15 %ホルマリン溶液で固定し、常法に従いパラフィンで包埋して滑走式マイクロトームを用いて厚さ 3 μm に薄切した。薄切した切片は組織学的検討のために HE 染色を施した。一方、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 deoxyuridine triphosphate nick end labeling method, Gavrieli et al., 1992) を用いた。TUNEL 陽性細胞 (アポトーシス) は免疫組織化学的手法で局在化し、絨毛膜の基底層と迷路部のアポトーシスは、栄養膜細胞層、巨細胞および血管の内皮細胞で主に観察された。

### 7-1. 胎盤の組織学的検討

胎盤の器質的変化を検討するために光学顕微鏡下で対照群、L-NAME 処置群および当帰芍薬散 2 g/kg 投与群について胎盤組織を観察した。

### 7-2. アポトーシスの計測

胎盤のアポトーシスは光学顕微鏡下で観察し、一切片中の全ての胎盤細胞からアポトーシスの指標として、TUNEL 陽性細胞数を計測した。

## 8. 胎子下垂体の免疫組織化学染色標本の作製法

胎子重量を測定後、得られた胎子はブアン固定液で固定し、下垂体を摘出してパラフィンで包埋した。滑走式マイクロトームで組織切片を作製した後、脱パラフィン処理し、内因性酵素除去処理として 0.3 %H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MeOH に室温で 10 分間浸した。さらに 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) で 3 分間 3 回洗浄し、非特異蛋白吸収処理として、PBA (protein blocking agent) で 10 分間処理し、一次抗体 Anti-Growth Hormone Rabbit polyclonal antibody (Biogenesis Inc., Kingston, NH, USA) を 20000 倍に希釈したものに 4 °C で一晩放置した。次の日、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) で 3 分間 3 回洗浄し、二次抗体として、Goat Anti-Rabbit immunoglobulins (Ig) conjugated to peroxidase labelled -dextran polymer in Tris-HCl buffer に室温で 30 分間処理し、再び 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) で 3 分間 3 回洗浄した。発色剤として 3-3'-Diaminobezidine-4HCl (DAB: DAKO, Glostrup, Denmark) を、対比染色として Mayer ヘマトキシリンをそれぞれ室温で 1 分間処理した後、脱水・透徹および封入した。

### 8-1. Somatotrope 数の計測

胎子下垂体の somatotrope は光学顕微鏡下で観察し、免疫陽性染色細胞の染色強度にかかわらず、各々の組織切片における面積 0.064 mm<sup>2</sup> の四角形内の somatotrope として、免疫活性細胞数 (GH 陽性細胞数) を測定した。

## 9. 統計学的処理方法

第1章に記したものと同一である。

### 第2節 実験結果

#### 1. 胎子および胎盤重量について

結果を Table 8 に示した。

当帰芍薬散は胎子重量および胎盤重量を統計学的有意に増加させた。しかし、

胎盤重量の増加は対照群と L-NAME 処置群との間に差は認められなかった。

## 2. 血糖値の影響

結果を Fig. 17 に示した。

母体の血糖値は全ての群で明らかな変化は認められなかった。しかし、胎子の血糖値は L-NAME 処置で明らかに減少し、当帰芍薬散投与によって統計学的有意に増加した。また胎子の血糖値は、母体の血糖値より明らかに低い値を示していた。

## 3. GH および IGF- I レベルの影響

結果を Fig. 18 および Fig. 20 に示した。

胎子の血清中 GH レベルは L-NAME 処置によって減少したが、当帰芍薬散 2 g/kg 投与によって有意に上昇した。また GH レベルは母体と胎子の間で同様のレベルであった。一方、血清中 IGF- I レベルは L-NAME 処置によって減少したが、当帰芍薬散 1 g/kg の用量で有意に増加した。また母体 IGF- I レベルは胎子より約 4 倍高い値だった。

## 4. GHRH レベルの影響

結果を Fig. 19 に示した。

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの母体および胎子の血漿中 GHRH レベルには明らかな変化は認められなかった。そして、母体の GHRH レベルは胎子より約 10 倍高かった。

## 5. NO 濃度の影響

結果を Fig. 21 に示した。

胎子の血清中 NO 濃度は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットより、当帰芍薬散 1 g/kg と 2 g/kg 用量の投与によって統計学的有意に減少したが、母体の血清中 NO 濃度の変化は認められなかった。

#### 6. 胎盤の組織学的所見について

結果を Table 9 に示した。

胎盤は L-NAME 処置によって基底脱落膜における細胞残渣の軽度な蓄積（細胞壊死）および合胞体性栄養膜細胞の軽度の空胞変性（退行性変化）が認められたが、当帰芍薬散 2 g/kg 用量の投与によってこれらの器質的な傷害の改善は認められなかった。

#### 7. 胎盤のアポトーシスについて

結果を Table 10 に示した。

胎盤で認められた TUNEL 陽性細胞数を絨毛膜の基底層と迷路部で分けて測定した結果、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの胎盤における TUNEL 陽性細胞数に明らかな変化は認められなかった。

#### 8. 胎子下垂体の somatotrope 数について

結果を Table 11 に示した。

胎子下垂体の somatotrope 数は L-NAME 処置によって明らかに減少したが、当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg 用量の投与によって統計学的に有意に細胞数が増加し、そしてそれらの免疫反応の強度も明らかに高まっていた。この胎子下垂体の somatotrope の組織写真を Fig. 22 に示した。



### 第3節 考察

本実験の結果から、当帰芍薬散が L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットにおける IUGR を改善する作用は、GH 分泌が増加したことによるものであり、これは胎子の下垂体における somatotrope が増加したためであることが示唆された。

GH は出生から思春期が完了するまでの間に、体の成長に対して中心的な役割を果たしている。しかし、GH は長い間、妊娠後期の胎子の成長にはあまり影響していないと考えられていた。最近の研究は、GH と somatotrophic 軸が、特に妊娠後期の子宮内の胎子成長に重要であり、結果として体長と体型を変化させることを示唆している (Nogami et al., 1995a; Harding et al., 1997)。先天的な GH 欠乏は、出生時の体長を減少させ (Gluckman et al., 1992)、GH 受容体は肝臓を含む胎子組織に存在している (Hill et al., 1992; Klempt et al., 1993)。自然発生矮小ラット (dr/dr 発現型) の下垂体での GH 欠損は、妊娠 20 日の胎子成長の遅れを誘発する (Nogami et al., 1995a)。この様に、GH レベルの回復は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群モデルにおける IUGR に対する当帰芍薬散の有益な作用を伴う可能性がある。GH は IGF-I 合成を直接的及び間接的に促進することによって成長を促す。以前の研究は IGF-I 処置がヒツジの IUGR に対して有効であるかについて検討している (Harding et al., 1994; Lok et al., 1996)。胎子 IGF-I レベルの緩やかな増加は、当帰芍薬散の作用も増強する可能性がある。しかしながら、その作用は、当帰芍薬散の作用によって増加した GH によって起きるごく僅かな二次的現象であると思われる。

当帰芍薬散は母体ではなく胎子血糖濃度をも増加させる。血糖は胎子成長には重要な栄養素であるので、当帰芍薬散は胎子の GH 分泌量を増加させるだけでなく、他のメカニズムを介して、胎子体重を増加させる作用を有する可能性がある (Murphy et al., 2006)。胎子は最小限のグルコースしか産生しないので、母体からのグルコース輸送を必要とする。胎盤でのグルコース消費もまた胎子

へのグルコース供給に影響する。胎生期に発育が遅れた小さい胎子が低血糖症であるのは、グルコースの供給及び胎盤経由のグルコースの移行が少ないためであると考えられている (Economides and Nicolaides, 1989)。IUGR 胎盤での基礎的なグルコース消費が増加することも報告されている (Challis et al., 2000)。胎子血糖に対する L-NAME 投与の効果はあまり報告されていないが、L-NAME 処置が胎子血糖を減少させたという本研究の結果は、上述の研究報告と良く一致している。しかし、L-NAME に誘発されてアポトーシスが増加するという報告を含む本研究の胎盤の組織学的観察の結果は、当帰芍薬散を処置しても、胎盤は明らかに組織学的に何ら変化していないことを示した。そのため、胎盤に対する当帰芍薬散の作用を明らかにするために、胎子成長に臨床的に重要である胎盤でのラクトゲン産生と胎子/胎盤関門の状態を含めた、胎盤機能の詳細な検討が必要であると思われる。

本研究のモデルは、母体及び誘発された IUGR における NO 合成を阻害したシステムであるので、胎子血清中の NO 濃度を測定した。当帰芍薬散の投与なしで妊娠母体に L-NAME 処置すると、胎子血清中の NO 濃度は増加したが、母体血清中 NO 濃度は変化しなかった。L-NAME は胎盤関門を通過すると考えられていたので、これは予想し得ない結果であった (Diket et al., 1994; Fantel et al., 1997)。しかしながら、この L-NAME の胎盤関門通過率が低いと思われる、母体の NO 濃度が L-NAME の投与によって減少するようなさらに厳しい条件下でさえ、胎子での NO 濃度の変化は報告されていない (Thaete et al., 2005)。さらに、妊娠高血圧症候群の患者から用意された胎子 (臍静脈) 内皮細胞は、NO によって誘導されることが知られている、細胞内サイクリック・グアノシンリン酸を大量に蓄積させることが可能である (Parra et al., 2001)。子宮及び胎盤を虚血状態にしたラット胎子脳においても、NO 産生が促進されることが報告されている (Asakura et al., 1999)。このように妊娠高血圧症候群の胎子組織はより

多くの NO を産生し、母体からの栄養素と酸素の供給が減少することに対応する可能性がある。

胎盤の異常、特にアポトーシスの増加が IUGR の原因であるという報告が多数存在する (Miller et al., 1996; Axt et al., 1999; Erel et al., 2001; Barrio et al., 2004)。しかし、当帰芍薬散は母体胎盤の L-MANE 誘導による組織学的な異常及び胎盤で起きるアポトーシスに影響しなかった。対照的に、当帰芍薬散は胎子下垂体での somatotrope 数を増加させた。Somatotrope 及び GH 分泌の主な促進因子である視床下部ホルモン、GHRH の胎子血漿中レベルは、当帰芍薬散処置によって有意な影響を受けなかった。これらの結果は、当帰芍薬散処置後の胎子血清中 GH レベルの増加は、GHRH に依存しない方法で、胎子下垂体 somatotrope 数の増加を促進させている可能性がある。in vitro において、ヒト胎子下垂体の GHRH に対する反応性は、妊娠期間中には成熟しない、この事実は下垂体からの GH 分泌が、少なくとも胎生期の一定の時期まで視床下部 GHRH の能力に依存しないことを示唆する (Kaplan and Grumbach, 1976)。ラットにおいて、GH 分泌と GHRH 及び GHRH 受容体の発現は、ほぼ同時期 (胎齢 19 日) であると報告されている (Nogami et al., 1995b; 1999)。本実験において、当帰芍薬散は胎齢 (妊娠) 14 日に投与したので、視床下部の GHRH 分泌の促進することによって起きるメカニズムとは異なる経路を通じて、さらに早い時期に当帰芍薬散 が somatotrope 数の増加を促進したと考えることは可能である。

IUGR 胎子に対する現代の最適な処置は、継続的に子宮内に留置することと未成熟のリスクのバランスを考慮しながら、可能な限り最善の状態での出産を目指すことを目的としている。最近、ヒト遺伝子組換えによって合成された GH が、IUGR 及び関連する異常に対する処方として広く使用されている (Mehta and Hindmarsh, 2002; Bajpai and Menon, 2005)。しかしながら、この処置は、生後に GH を投与して、IUGR が原因で小さく産まれた子の成長を促進することを目

的としている。IUGR の影響を受けた胎子への出生前の処置は効果が無い；しかしながら、多くの的を得たアプローチが現在開発されつつある。IUGR 胎子は低栄養であり、栄養補助を IUGR に処置する多くの試みが存在しているが、ほとんどの研究は成功していない (Harding et al., 1997)。さらに選択すべきアプローチはホルモン療法である、なぜなら IUGR 胎子は循環しているインスリン、インスリン様成長因子(IGF)、甲状腺ホルモン並びに胎盤ラクトゲン濃度が減少しているからである (Owens, 1991; Harding et al., 1985; Falconer et al., 1985; Thorpe-Beeston et al., 1991; Langford et al., 1994; Economides et al., 1989; Hubinont et al., 1991)。動物モデルとしてヒツジを用いて、インスリン、IGF-I、GH 等を胎子に処置するという有効な方法が報告されている；しかし、これらのどれもが最適な処置であるという結論は出ていない (Harding and Bloomfield, 2004)。従って、母体への GH あるいは IGF-I の投与は、今のところ IUGR の影響を受けた胎子の発育を改善しないと結論付けられる。

母親の給餌制限が、結果として母体への栄養素供給の欠乏につながるような実験設定において、母体への GH 投与は、明らかに胎子を犠牲にして母体へ好都合に働く (Woodall et al., 1999)。さらにまた、胎盤を経由して妊娠ラットから胎子へ移動する GH は、もし存在するとしてもごく少量である。しかしながら、本研究において、子宮内の胎子の成長を改善するために投与された当帰芍薬散は、胎子血中グルコース濃度と GH を上昇させ、高血圧を改善した。当帰芍薬散が妊娠高血圧症候群の母体および胎子に対して治療効果がある、あるいは予防的な処方としてユニークな候補である可能性はあるものの、当帰芍薬散が L-NAME によって誘発された IUGR を改善するメカニズムを解明する必要がある。特に、胎子血中グルコース濃度と GH レベルの増加が当帰芍薬散の有効な作用に付随するものであるかを確かめるために、今後、広範囲にわたる研究が必要とされるであろう。

## 第4節 小 括

L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの IUGR に対する当帰芍薬散の改善作用を母体の胎盤および胎子下垂体に焦点をあて、これらを機能形態学的に検討した。

妊娠 14 日にラットの背部皮下に L-NAME 60 mg/kg/day を浸透圧ミニポンプで埋め込み、妊娠高血圧症候群ラットを作製した。同時に DW および当帰芍薬散 1 g/kg および 2 g/kg を 10 mL/kg の容量でラットに経口投与した。妊娠 19 日にテールカフ装置にて血圧を測定し、妊娠 20 日に帝王切開して胎子を得た。胎盤および胎子は重量を測定し、得られた胎盤は 15 %ホルマリン溶液で固定し、胎子はブアン固定液で保存した。その後胎子の下垂体を摘出し、胎盤および胎子下垂体をパラフィンで包埋し、ミクロトームで組織切片化して HE 染色および免疫組織化学染色を施した。胎盤の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 法を用いた。胎子下垂体の somatotrope の免疫組織化学染色には、一次抗体として Anti-Growth Hormone Rabbit polyclonal antibody を、二次抗体として Goat Anti-Rabbit immunoglobulins (Ig) conjugated to peroxidase labelled -dextran polymer in Tris-HCl buffer を使用した。当帰芍薬散は L-NAME 処置による胎盤の器質的な傷害の改善を認めず、また L-NAME 処置では胎盤のアポトーシスによる変化が認められなかった。しかしながら、当帰芍薬散は胎子下垂体における somatotrope の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果、胎子の発育を促すことが明らかとなった。この当帰芍薬散の IUGR 改善作用は IGF-I の分泌および視床下部の GHRH 分泌に影響を及ぼさず、GH 分泌への直接作用であることが明らかとなった。

以上のことから、1) 当帰芍薬散は L-NAME 処置による胎盤の器質的な傷害を改善しない。2) 当帰芍薬散は妊娠高血圧症候群ラットの IUGR の下垂体の

somatotrope の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値を増加させた結果、胎子の発育を促す。3) 当帰芍薬散の IUGR 改善作用は、視床下部の GHRH 分泌の増加によるものではない。4) 当帰芍薬散の IUGR 改善作用は、IGF- I を介した間接作用ではなく、GH 分泌の直接作用であることなどが明らかとなった。

## 結 語

以上、本研究の結果から、

1) 当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧および IUGR を改善する。その抗高血圧作用は直接の降圧作用によるものではなく、また NO 産生調節も関与していない。さらに IUGR において胎子大脳重量および大脳皮質の厚さは減少するが、当帰芍薬散はこの減少を改善する。当帰芍薬散の抗高血圧作用は妊娠動物に限定されており、当帰芍薬散の IUGR の改善作用は、抗高血圧作用とは別のメカニズムである可能性が高い。

2) 当帰芍薬散は妊娠 19 日および分娩後 7 日の妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制するが、分娩後 1 日の高血圧は抑制しない。当帰芍薬散の抗高血圧作用は、ある一定レベルのプロゲステロンとの共存に依存する可能性がある。またこの抗高血圧作用は、血管弛緩あるいは収縮因子である NO, CGRP および endothelin-1 の血中濃度に依存しない。

3) 柴苓湯および防己黄耆湯は妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を改善するが IUGR に対しては効果がない。柴苓湯は直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は血管弛緩因子である CGRP 濃度の増加に基因する。さらにこの柴苓湯の降圧効果は、L-NAME 処置したラットの妊娠/非妊娠状態に関係無く有効である。防己黄耆湯も同様に直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は CGRP 濃度の増加および血管収縮因子である endothelin-1 濃度の減少に基因する。

4) L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの IUGR の発生要因は、胎盤の器質的な傷害によるものではなく、胎子の GH 分泌の低下によることがあきらかとなり、当帰芍薬散は、胎子下垂体の somatotrope の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果、胎子の発育を促す可能性が示唆される。

これらを一括すれば、NO 合成酵素阻害剤である L-NAME は、妊娠ラットに

ヒト妊娠高血圧症候群様状態として高血圧および IUGR を引き起した。このモデルに臨床で妊娠高血圧症候群に使用される頻度の高い当帰芍薬散、柴苓湯および防已黄耆湯を投与した結果、当帰芍薬散は高血圧および IUGR を、柴苓湯および防已黄耆湯は高血圧をそれぞれ改善した。これら三種の漢方処方は、既存の血圧降下剤のような直接的な降圧作用を有しないことが明らかとなったが、その抗高血圧作用には大きな違いが認められた。当帰芍薬散の抗高血圧作用のメカニズムは、ある一定レベルのプロジェステロンとの共存に依存する可能性があった。柴苓湯の抗高血圧作用は血中 CGRP 濃度の増加に基因するものであった。さらにこの柴苓湯の降圧効果は、L-NAME 処置したラットの妊娠/非妊娠状態に関係なく有効であった。防已黄耆湯の抗高血圧作用は血中 CGRP 濃度の増加および endothelin-1 濃度の減少に基因するものであった。また当帰芍薬散において認められた IUGR の改善作用は、胎子下垂体の somatotrope の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果、胎子の発育を促したことが明らかとなった。



## 要約

妊娠高血圧症候群は、ヒトの妊娠における主要な合併症で、妊婦全体の4-8%に発症し、高血圧、浮腫および蛋白尿の三主徴からなる我が国の妊産婦死亡原因の第一位の疾患である。また妊娠高血圧症候群は、早産や母体の病気に関連する胎子の発育遅延、新生児の罹病率および死亡率上昇の原因となる (Brown, 1995)。多胎妊娠、極端な母体の年齢、家族歴、本態性高血圧および腎疾患のような危険因子は、妊娠高血圧症候群の発生を大幅に増加させることが知られているが、その病態生理は未だ完全に解明されていない。さらにこの妊娠高血圧症候群の患者の一部は、分娩後も引き続き高血圧を発症する。

妊娠高血圧症候群の治療は、安静、食事療法（塩分制限、カロリー制限、高蛋白食）が原則である。薬物療法としては今のところ対症療法しかなく、Ca拮抗薬やアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬などの血圧降下剤の処方が中心である。しかし、妊娠中に無理に血圧を下げれば子宮・胎盤血流量が減少し、胎子の発育に多大な影響を与える可能性も考えられ、母体および胎子を同時に治療することは極めて困難であると考えられている。また、臨床および動物実験において、プロスタサイクリン ( $PGI_2$ ) の不足やトロンボキサン  $A_2$  ( $TXA_2$ ) の増加の結果 ( $PGI_2$  :  $TXA_2$  比率の変化) は、妊娠高血圧症候群での選択的な血小板破壊、子宮・胎盤血流量の縮小および胎盤梗塞によるものと考えられ、 $PGI_2$ / $TXA_2$  の不均衡の補正が、妊娠高血圧症候群を改善する可能性から、実験が試みられている (Dekker, 1995)。さらに低用量アスピリン、 $PGI_2$  類似化合物および  $TXA_2$  合成酵素阻害剤が治療薬として使用されたが、どれも明確な効果を示すことはできていない。

ヒトと動物の両者における正常な妊娠では生理的な血管の調節機構が存在し、血液量および心拍出量を増加させ、血管抵抗を減少させる。これらの変化の一

部は、内在的に産生される一酸化窒素 (NO) によって調節されることがわかっている。最近、ラットを用いた実験において、NO 合成を慢性的に抑制する NO 合成酵素阻害剤である *N*<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を妊娠中に連続投与すると、高血圧、胎子発育遅延および蛋白尿など妊娠高血圧症候群に類似した臨床症状を誘発することが報告された (Yallampalli and Garfield, 1993; Diket et al., 1994; Salas et al., 1995)。この L-NAME を用いた長期的な処置が誘発する症状は、正常妊婦および妊娠高血圧症候群の患者において、NO 産生と血管の変化との間に直接的な関わりの存在を示唆する。さらに、血管の弛緩収縮因子である calcitonin gene-related peptide (CGRP) や endothelin を含む様々な物質が L-NAME 処置した妊娠ラットを用いて多数実験されている (Richer et al., 1996; Yallampalli et al., 1996; Gangula et al., 1997a; Wight et al., 1998; Wimalawansa and Yallampalli, 1998; Makino et al., 1999; Olson et al., 1999; Zlatnik et al., 1999)。

近年我が国において、漢方処方はその成分の量と品質が標準化され、一般用医薬品および医療用医薬品として広く使用されている。なかでも妊娠高血圧症候群に関しては、当帰芍薬散、柴苓湯および防己黄耆湯が臨床的に使用される頻度が高い。当帰芍薬散は、臨床では主に閉経期の苦痛症状を軽くし (Koyama, 1993)、分娩前の治療薬 (安胎薬) として使われている (Noguchi, 1985; Kano et al., 1991)。また動物実験において当帰芍薬散は、卵巣の endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system (Usuki et al., 1992) を調節し、静脈内投与は血清中または排卵前の卵胞での  $17\beta$ -エストラジオール、プロジェステロンおよびテストステロン・レベルを増加させるとの報告がある (Usuki, 1990)。柴苓湯は、その主たる作用である利尿作用によって、臨床での浮腫や蛋白尿 (Ito et al., 1996; Ushiroyama, 2003) および腎疾患に対する治療効果が期待される漢方処方である (Senaga and Kawashima, 1986)。実験的には、柴苓湯はラットにおいて puromycin aminonucleoside によって誘発される尿蛋白お

よび血漿中コレステロールを減少させる、蛋白尿の予防効果が報告されている (Abe, 1986)。防已黄耆湯は、臨床では主に変形性膝関節症 (Otani et al., 1997; Noguchi et al., 2004)、蛋白尿、膝の浮腫、慢性関節リウマチ患者における腎障害の治療 (Takahama, 1995) に使われている漢方処方である。動物実験では、防已黄耆湯は puromycin aminonucleoside ネフローゼラットの蛋白尿を抑制し、その作用機序は腎臓での 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ /thromboxane $B_2$  比のバランスを改善することが報告されている (Nagasawa, 2001)。これらの漢方処方の報告は、臨床での妊娠高血圧症候群の改善と関係する可能性が考えられるが、当帰芍薬散、柴苓湯および防已黄耆湯に関して妊娠高血圧症候群の動物モデルを用いての詳細な研究報告は未だない。

以上の研究報告を背景に、本論文では L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群モデルラットにおける各漢方処方の薬理効果、特に母体および胎子の両者に対する治療効果を確認し、さらにその作用メカニズムを解明することを目的とし、次のような実験を試みた。

第 1 章においては、ラットに L-NAME 処置して作製した妊娠高血圧症候群モデルを用いて、高血圧および子宮内胎子発育遅延 (IUGR) に対する当帰芍薬散の影響を検討した。当帰芍薬散は L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの高血圧および IUGR を改善したが、その抗高血圧作用は直接の降圧作用によるものではなく、また NO 産生調節も関与していなかった。さらに IUGR において胎子大脳重量および大脳皮質の厚さは減少するが、当帰芍薬散はこの減少を改善した。当帰芍薬散の抗高血圧作用は妊娠動物に限定されており、当帰芍薬散の IUGR の改善作用は、抗高血圧作用とは別のメカニズムである可能性が高いことなどが明らかとなった。

第 2 章においては、L-NAME を用いて分娩後も引き続き高血圧を引き起こす妊娠高血圧症候群モデルを作製し、当帰芍薬散の抗高血圧作用およびその作用メカニズムを検討するため、血管作用因子について調べた。また、第 1 章において当帰芍薬散の抗高血圧作用が、妊娠動物に限定して有効であったことから、ステロイドホルモンとの関連性についても検討した。

当帰芍薬散は妊娠 19 日および分娩後 7 日の妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制したが、分娩後 1 日の高血圧は抑制しなかった。当帰芍薬散の抗高血圧作用は、ある一定レベルのプロジェステロンとの共存に依存する可能性があった。またこの抗高血圧作用は、血管弛緩あるいは収縮因子である NO, CGRP および endothelin-1 の血中濃度に依存しないことなどが明らかとなった。

第 3 章においては、L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群モデルに対する柴苓湯および防己黄耆湯の影響を検討した。

柴苓湯および防己黄耆湯は妊娠高血圧症候群ラットの高血圧を抑制するが、IUGR に対しては効果がなかった。柴苓湯は直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は血管弛緩因子である CGRP 濃度の増加に基因するものであった。さらにこの柴苓湯の降圧効果は、L-NAME 処置したラットの妊娠/非妊娠状態に関係無く有効であった。防己黄耆湯も同様に直接的な降圧作用を有しておらず、その作用は CGRP 濃度の増加および血管収縮因子である endothelin-1 濃度の減少に基因することが示された。

第 4 章においては、妊娠高血圧症候群モデルを用いて当帰芍薬散の IUGR 改善作用のメカニズムを検討した。L-NAME 誘発性妊娠高血圧症候群ラットの IUGR の発生要因は、胎盤の器質的な傷害によるものではなく、胎子の GH 分泌の低下によることが明らかとなった。当帰芍薬散は、胎子下垂体の somatotrope

の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果、胎子の発育を促した可能性が示唆された。

これらの結果から、NO 合成酵素阻害剤である L-NAME によって引き起こされたラットの高血圧および子宮内胎子発育遅延 (IUGR) に対する漢方処方として当帰芍薬散、柴苓湯および防己黄耆湯を処置した結果、当帰芍薬散は高血圧および IUGR を、柴苓湯および防己黄耆湯は高血圧をそれぞれ改善した。これら三種の漢方処方は、既存の血圧降下剤のような直接的な降圧作用を有しないことが明らかとなったが、その抗高血圧作用には大きな違いが認められた。当帰芍薬散の抗高血圧作用メカニズムは、ある一定レベルのプロジェステロンとの共存に依存する可能性があった。柴苓湯の抗高血圧作用は血中 CGRP 濃度の増加作用に基因するものであった。さらにこの抗高血圧作用は L-NAME 処置したラットの妊娠/非妊娠状態に関係無く有効であった。また、防己黄耆湯の抗高血圧作用は、血中 CGRP 濃度の増加および endothelin-1 濃度の減少に基因するものであった。当帰芍薬散において認められた IUGR の改善作用は、胎子下垂体の somatotrope の増加および GH 分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果であることが明らかとなった。これらの漢方処方は、臨床における妊娠高血圧症候群の予防および治療に有効である可能性が示され、なかでも当帰芍薬散は母体および胎子両者の治療に対する効果が最も期待できる処方であることが証明された。

## 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研究室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します。

また、獣医学科薬理学研究室教授浅井史敏博士、同研究室准教授白井明志博士ならびに解剖学第一研究室教授浅利昌男博士には、論文の取りまとめに際し、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。さらに論文の取りまとめに関して、御校閲と貴重な御助言を賜りました麻布大学学長政岡俊夫博士ならびに京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座（形態形成機構学）教授塩田浩平博士に対して衷心より深謝申し上げます。

最後に、長きに渡って本研究の遂行および論文の執筆にあたり深い理解と激励を与えてくれた、母 竹井愛子、並びに本論文作成のおり、英文の校閲および助言を与えてくれた姉 竹井万里に感謝します。また、最後まで私の身を案じ、深い理解と慈愛を示してくれた、今は亡き、父 竹井忠の御霊に本学位論文を捧げます。

## 参考文献

- Abe, H., Orita, M., Konishi, H. and Arichi S. (1986): Effects of Sairei-tô on aminonucleoside nephrosis in the rats. *Wakan-Yaku*. 3(1): 24-30. (text in Japanese with English abstract)
- Asakura, H., Nakai, A., Yokota, A., Sekiguchi, A., Koshino, T. and Araki, T. (1999): Continuous observation of nitric oxide production in the fetal rat brain during uteroplacental ischemia. *Fetal Diagn Ther*. 14: 354-359.
- Axt, R., Kordina, A. C., Meyberg, R., Reitnauer, K., Mink, D. and Schmidt, W. (1999): Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 26(3-4): 195-198.
- Bajpai, A. and Menon, P.S. (2005): Growth hormone therapy. *Indian J Pediatr*. 72(2): 139-144.
- Barrio, E., Calvo, M. T., Romo, A., Alvarez, R., Gutierrez, J. I., Naval, J. and Ferrández Longás, A. (2004): Intrauterine growth retardation: study of placental apoptosis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 17: 451-456.
- Brown, M. A. (1995): The physiology of pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 22: 781-791.
- Buhimschi, I., Yallampalli, C., Chwalisz, K. and Garfield, R. E. (1995): Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Hum Reprod*. 10(10): 2723-2730.
- Challis, D. E., Pfarrer, C. D., Ritchie, J. W., Koren, G. and Adamson, S. L. (2000):

- Glucose metabolism is elevated and vascular resistance and maternofetal transfer is normal in perfused placental cotyledons from severely growth-restricted fetuses. *Pediatr Res.* 47(3): 309-315.
- Dekker, G. A. (1995): The pharmacological prevention of preeclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 9(3): 509-528.
- Diket, A. L., Pierce, M. R., Munshi, U. K., Voelker, C. A., Eloby-Childress, S., Greenberg, S. S., Zang, X. J., Clark, D. A. and Miller, M. J. S. (1994): Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 171(5): 1243-1250.
- Economides, D. L., Proudler, A. and Nicolaides, K. H. (1989): Plasma insulin in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 160(5): 1091-1094.
- Edwards, D. L., Arora, C. P., Bui, D. T. and Castro, L. C. (1996): Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: Effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1. *Am J Obstet Gynecol.* 175(2): 484-488.
- Erel, C. T., Dane, B., Calay, Z., Kaleli, S. and Aydinli, K. (2001): Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynecol Obstet.* 73: 229-235.
- Fantel, A. G., Nekahi, N., Shepard, T. H., Cornel, L. M., Unis, A. S. and Lemire, R. J. (1997): The teratogenicity of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, in rats. *Reprod Toxicol.* 11(5): 709-717.
- Falconer, J., Owens, J. A., Allotta, E. and Robinson, J. S. (1985): Effect of restriction of placental growth on the concentrations of insulin, glucose and placental lactogen in the plasma of sheep. *J Endocrinol.* 106: 7-11.
- Gangula, P. R. R., Supowit, S. C., Wimalawansa, S. J., Zhao, H., Hallman, D. M.,



- DiPette, D. J. and Yallampalli, C. (1997a): Calcitonin gene-related peptide is a depressor in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension during pregnancy. *Hypertension* 29(1): 248-253.
- Gangula, P. R. R., Wimalawansa, S. J. and Yallampalli, C. (1997b): Progesterone up-regulates vasodilator effects of calcitonin gene-related peptide in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 176(4): 894-900.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119(3): 493-501.
- Giustina, A. and Veldhuis, J. D. (1998): Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev.* 19(6): 717-797.
- Gluckman, P. D., Gunn, A. J., Wray, A., Cutfield, W. S., Chatelain, P. G., Guilbaud, O., Ambler, G. R., Wilton, P. and Albertsson-Wikland, K. (1992): Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. *J Pediatr.* 121(6): 920-923.
- Harding, J. E., Bauer, M. K. and Kimble, R. M. (1997): Antenatal therapy for intrauterine growth retardation. *Acta Paediatr Suppl.* 423; 196-200.
- Harding, J. E. and Bloomfield, F. H. (2004): Prenatal treatment of intrauterine growth restriction: lessons from the sheep model. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2(2): 182-192.
- Harding, J. E., Jones, C. T. and Robinson, J. S. (1985): Studies on experimental growth retardation in sheep. The effects of a small placenta in restricting transport to and growth of the fetus. *J Dev Physiol.* 7: 427-442.
- Harding, J. E., Liu, L., Evans, P. C. and Gluckman, P. D. (1994): Insulin-like growth

- factor 1 alters fetoplacental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinology*. 134(3): 1509-1514.
- Hartman, M. L., Veldhuis, J. D. and Thorner, M. O. (1993): Normal control of growth hormone secretion. *Horm Res*. 40: 37-47.
- Helmbrecht, G. D., Farhat, M. Y., Lochbaum, L., Brown, H. E., Yadgarova, K. T., Eglinton, G. S. and Ramwell, P. W. (1996): L-Arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Am J Obstet Gynecol*. 175(4): 800-805.
- Hill, D. J., Riley, S. C., Bassett, N. S. and Waters, M. J. (1992): Localization of the growth hormone receptor, identified by immunocytochemistry, in second trimester human fetal tissues and in placenta throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 75(2): 646-650.
- Hubinont, C., Nicolini, U., Fisk, N. M., Tannirandorn, Y. and Rodeck, C. H. (1991): Endocrine pancreatic function in growth-retarded fetuses. *Obstet Gynecol*. 77(4): 541-544.
- Irahara, M., Yasui, T., Tezuka, M., Ushigoe, K., Yamano, S., Kamada, M. and Aono, T. (2000): Evidence that Toki-shakuyaku-san and its ingredients enhance the secretion of a cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC/gro) in the ovulatory process. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 22(10): 725-730.
- Ito, K., Itani, Y. and Tamori, N. (1996) The effects of treatment with Sairei-to on toxemia of pregnancy, as evaluated by measurement of umbilical arterial blood flow. *Nihon Toyo Igaku Zasshi* 46(4): 555-560. (text in Japanese with English abstract)
- Kalimi, M. (1987): Receptor-mediated antiprogesterone action of RU 486. In: Agarwal MK, editor. *Receptor Mediated Antisteroid Action New York*: de

Gruyter; p.121-137.

- Kano, T., Ito, C., Kasamatsu, H. and Miyawaki, Y. (1991): Clinical study of prognosis of 200 deliveries after Kampo-treatment for ovarian dysfunctional infertilities and tocolysis. *Jpn J Fertil Steril.* 36(3): 612-620. (text in Japanese with English abstract)
- Kaplan, S. L. and Grumbach, M. M. (1976): Development of hormonal secretion by the human fetal pituitary gland. In: Martini L, Ganong WF, editors. *Frontiers in neuroendocrinology. Academic Press.* San Diego. CA; p 255-276.
- Klempt, M., Bingham, B., Breier, B. H., Baumbach, W. R. and Gluckman, P. D. (1993): Tissue distribution and ontogeny of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and ligand binding to hepatic tissue in the midgestation sheep fetus. *Endocrinology.* 132(3): 1071-1077.
- Koyama, T. (1993): Role of Kampo (herbal) medicine for management in postmenopausal women in Japan. *J Jpn Menopause Soc.* 1(1): 75-79.
- Langford, K., Blum, W., Nicolaidis, K., Jones, J., McGregor, A. and Miell, J. (1994): The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by undernutrition? *Eur J Clin Invest.* 24: 851-856.
- Liao, Q. P., Buhimschi, I. A., Saade, G., Chwalisz, K. and Garfield, R. E. (1996): Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Hum Reprod.* 11(12): 2777-2784.
- Lok, F., Owens, J. A., Mundy, L., Robinson, J. S. and Owens, P. C. (1996): Insulin-like growth factor I promotes growth selectively in fetal sheep in late gestation. *Am J Physiol.* 270: R1148-R1155.
- Makino, I., Shibata, K., Makino, Y., Kanagawa, K. and Kawarabayashi, T. (1999): Adrenomedullin attenuates the hypertension in hypertensive pregnant rats

- induced by  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol.* 371: 159-167.
- Mehta, A. and Hindmarsh, P. C. (2002): The use of somatropin (recombinant growth hormone) in children of short stature. *Paediatr Drugs.* 4(1): 37-47.
- Miller, M. J. S., Voelker, C. A., Olistter, S., Thompson, J. H., Zhang, X. J., Rivera, D., Eloby-Childress, S., Liu, X., Clark, D. A. and Pierce, M. R. (1996): Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 21(5): 619-629.
- Murphy, V. E., Smith, R., Giles, W. B. and Clifton, V. L. (2006): Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev.* 27(2): 141-169.
- Nagasawa, K., Suzuki, J., Suzuki, S., Kawasaki, Y. and Suzuki, H. (2001): Traditional Chinese medicine (Bouyougi-to) reduces urinary protein excretion in rats with puromycin-aminonucleoside-induced nephrosis. *Nippon Shonika Gakkai Zasshi* 105(6): 681-688. (text in Japanese with English abstract)
- Nogami, H., Inoue, K., Moriya, H., Ishida, A., Kobayashi, S., Hisano, S., Katayama, M. and Kawamura K. (1999): Regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression by glucocorticoids in MtT-S cells and in the pituitary gland of fetal rats. *Endocrinology.* 140(6): 2763-2770.
- Nogami, H., Tachibana, T. and Ishikawa, H. (1995a): Intrauterine growth retardation due to growth hormone deficiency in rats. *Biol Neonate.* 68: 412-418.
- Nogami, H., Yokose, T. and Tachibana, T. (1995b): Regulation of growth hormone expression in fetal rat pituitary gland by thyroid or glucocorticoid hormone. *Am J Physiol.* 268: E262-E267.
- Noguchi, K. (1985): Study on gestosis cases for the past decade – Effect of

- Tokishakuyakusan and holding of mothers' class. *Jap J Prim Care*. 8(2): 131-133.  
(text in Japanese with English abstract)
- Noguchi, J., Shudo, T. and Nagata, K. (2004): Efficacy of Boi-ogi-to for ethical use for osteoarthritis of the knee with joint fluid. *Seikei Saigai Geka* 47: 999-1005. (text in Japanese with English abstract)
- Olson, G. L., Saade, G. R., Buhimschi, I., Chwalisz, K. and Garfield, R. E. (1999): The effect of an endothelin antagonist on blood pressure in a rat model of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 181(3): 638-641.
- Otani, T., Matsumoto, H., Kawakubo, M., Takeda, T. and Yamauchi, H. (1997): Clinical effect of Boi-ogi-to (Kampo medicine) on knee osteoarthritis. *Tokyo Hiza Kansetsu Gakkai Kaishi* 18: 31-33. (text in Japanese with English abstract)
- Owens, J. A. (1991): Endocrine and substrate control of fetal growth: placental and maternal influences and insulin-like growth factors. *Reprod Fertil Dev*. 3: 501-517.
- Parra, M. C., Lees, C., Mann, G. E., Pearson, J. D. and Nicolaides, K. H. (2001): Vasoactive mediator release by fetal endothelial cells in intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 184(3): 497-502.
- Richer, C., Boulanger, H., Es-Slami, S. and Giudicelli, J. F. (1996): Lack of beneficial effects of the NO-donor, molsidomine, in the L-NAME-induced pre-eclamptic syndrome in pregnant rats. *Br J Pharmacol*. 119: 1642-1648.
- Rosenfeld, M. G., Mermod, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. and Evans, R. M. (1983): Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304(14): 129-135.

- Salas, S. P., Altermatt, F., Campos, M., Giacaman, A. and Rosso, P. (1995): Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. *Hypertension* 26(6): 1019-1023.
- Senaga, R. and Kawashima, S. (1986): Clinical influences of Sairei-tô (Chai-Ling-Tang) on renal diseases in children. *Wakan-Yaku*. 3(1): 45-50. (text in Japanese with English abstract)
- Takahama, M. (1995): Efficacy of Boi-ogi-to in the treatment of rheumatoid arthritis. *Nihon Toyo Igaku Zasshi* 45(3): 569-574. (text in Japanese with English abstract)
- Taya, K. and Greenwald, G. S. (1981): In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biol Reprod*. 25: 683-691.
- Taya, K. and Greenwald, G. S. (1982): Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Jpn*. 29(4): 453-459.
- Thaete, L. G., Kushner, D. M., Dewey, E. R. and Neerhof, M. G. (2005): Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta*. 26: 242-250.
- Thorpe-Beeston, J. G., Nicolaides, K. H., Snijders, R. J. M., Felton, C. V. and McGregor, A. M. (1991): Thyroid function in small for gestational age fetuses. *Obstet Gynecol*. 77(5): 701-706.
- Tippins, J. R. (1986): CGRP: A novel neuropeptide from the calcitonin gene is the most potent vasodilator known. *J Hypertens*. 4(5): S102-S105.
- Ushiroyama, T. (2003): Practical use of traditional herbal preparations in perinatal medicine. *Adv Obstet Gynecol*. 55(3): 299-321. (text in Japanese with English abstract)

- Usuki, S. (1988): Effects of Tokishakuyakusan and its components on rat corpus luteum function in vitro. *Am J Chin Med.* 16: 11-19.
- Usuki, S. (1990): Effects of Tokishakuyakusan and Keishibukuryogan on steroidogenesis by rat preovulatory follicles in vivo. *Am J Chin Med.* 18: 149-156.
- Usuki, S., Usuki, Y., Tanaka, J. and Kawakura, Y. (1992): Effects of Tokishakuyakusan, Keishibukuryogan, Shakuyakukanzoto, and Unkeito on ovarian endothelin, rennin and angiotensin II in pregnant mares' serum gonadotropin-treated immature rats. *Am J Chin Med.* 20: 175-179.
- Wight, E., Küng, C. F., Moreau, P., Takase H. and Lüscher, T. F. (1998): Chronic blockade of nitric oxide-synthase and endothelin receptors during pregnancy in the rat: Effect on pregnancy outcome. *J Soc Gynecol Investig.* 5(3): 132-139.
- Wimalawansa, S. J. (1996): Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 17(5): 533-585.
- Wimalawansa, S. J. and Yallampalli, C. (1998): Pre-eclamptic toxemia: potential new therapy based on animal studies. *Ceylon Med J.* 43(3): 138-146.
- Woodall, S. M., Breier, B. H., Johnston, B. M., Bassett, N. S., Barnard, R. and Gluckman, P. D. (1999): Administration of growth hormone or IGF-I to pregnant rats on a reduced diet throughout pregnancy does not prevent fetal intrauterine growth retardation and elevated blood pressure in adult offspring. *J Endocrinol.* 163: 69-77.
- Yallampalli, C., Dong, Y. L. and Wimalawansa, S. J. (1996): Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases the fetal mortality in pre-eclampsia rats induced by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester. *Hum Reprod.*

11(4): 895-899.

Yallampalli, C. and Garfield, R. E. (1993): Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 169(5): 1316-1320.

Zlatnik, M. G., Buhimschi, I., Chwalisz, K., Liao, Q. P., Saade, G. R. and Garfield, R. E. (1999): The effect of indomethacin and prostacyclin agonists on blood pressure in a rat model of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 180(5): 1191-1195.



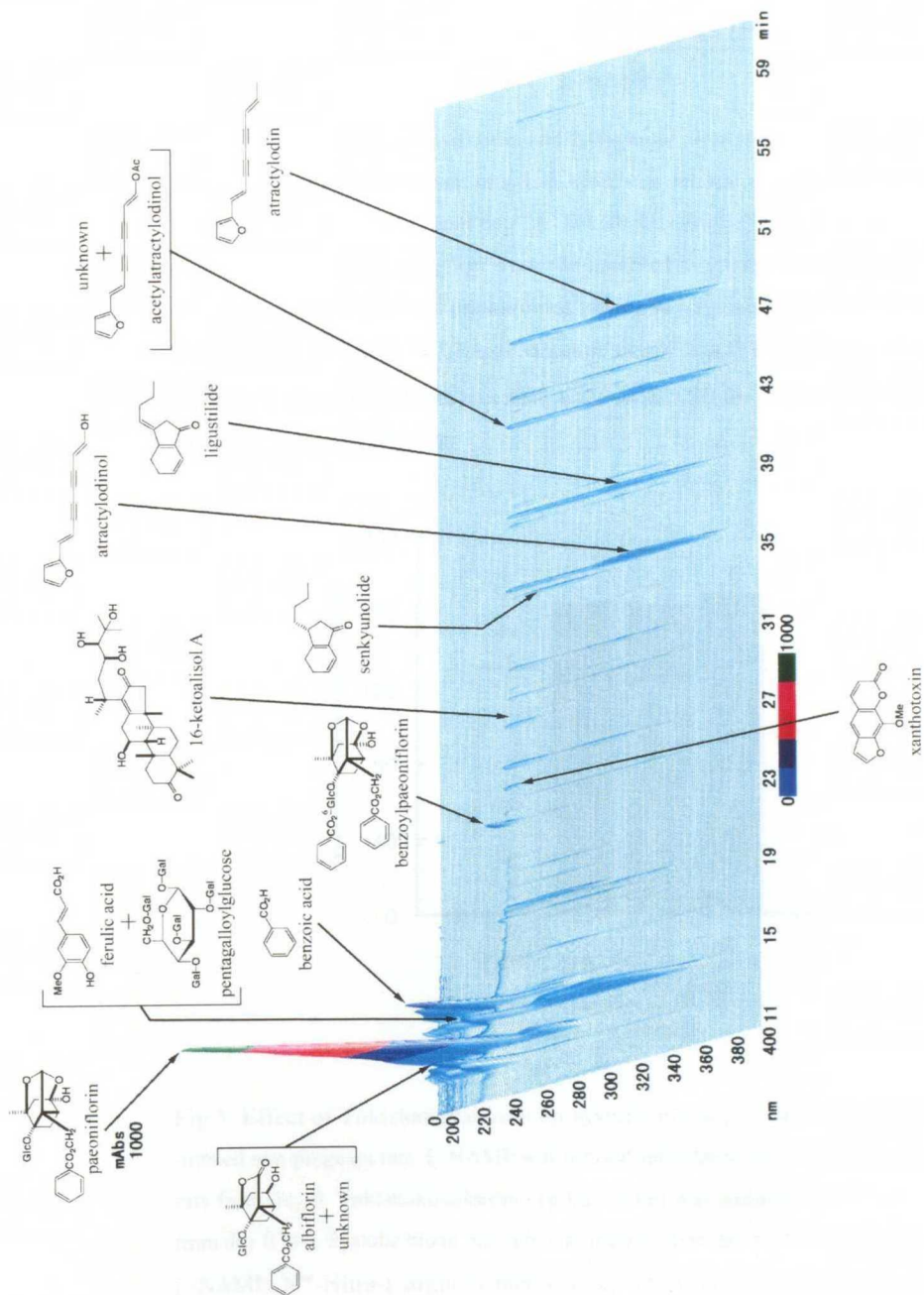


Fig. 1. 3D HPLC profile of Tokishakuyakusan. The peak analysis and assignment were performed using standard samples that had been isolated from raw materials. The chromatographic conditions are described in Materials and Methods. Absorbance (mAbs); Wavelength (nm); Retention time (min)

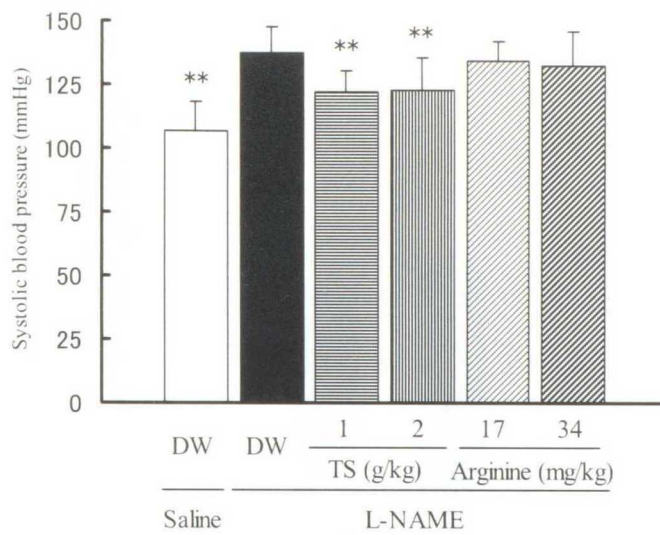


Fig.2. Effect of Tokishakuyakusan and L-arginine on systolic blood pressure of L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) and L-arginine (17mg/kg, 34mg/kg) were administered by gavage from gestational day 14 to 20. Systolic blood pressure was measured on gestational day 19. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Arginine: L-arginine. Data are presented as the mean ± SD for 10 rats in each group. \*\**p*<0.01, vs. L-NAME+DW

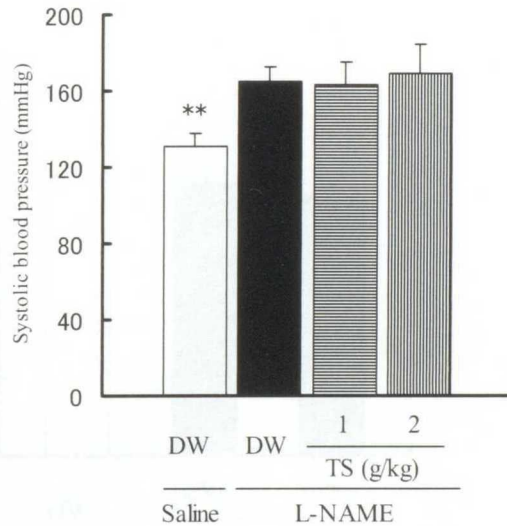


Fig.3. Effect of Tokishakuyakusan on systolic blood pressure of L-NAME-treated non-pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into non-pregnant rats from day 0. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from day 0 to 6. Systolic blood pressure was measured on day 5. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean ± SD for 8 rats in each group. \*\**p*<0.01, vs. L-NAME+DW

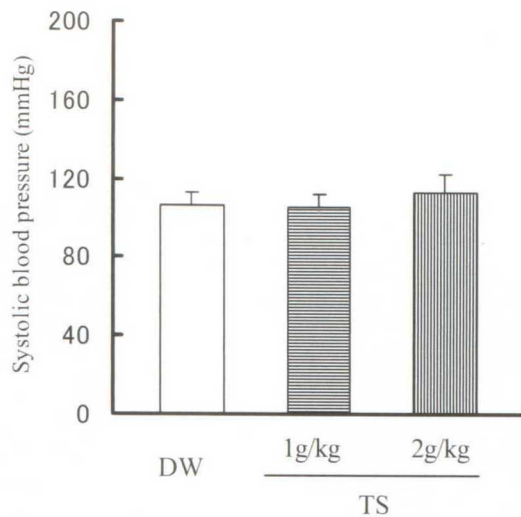


Fig. 4. Effect of Tokishakuyakusan on systolic blood pressure of pregnant rats. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Systolic blood pressure was measured on gestational day 19. DW: distilled water. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 9 rats in each group.

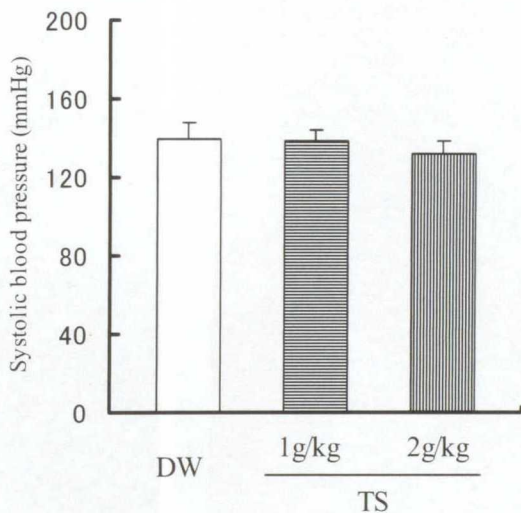


Fig. 5. Effect of Tokishakuyakusan on systolic blood pressure of non-pregnant rats. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from day 0 to 6. Systolic blood pressure was measured on day 5. DW: distilled water. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 6 rats in each group.



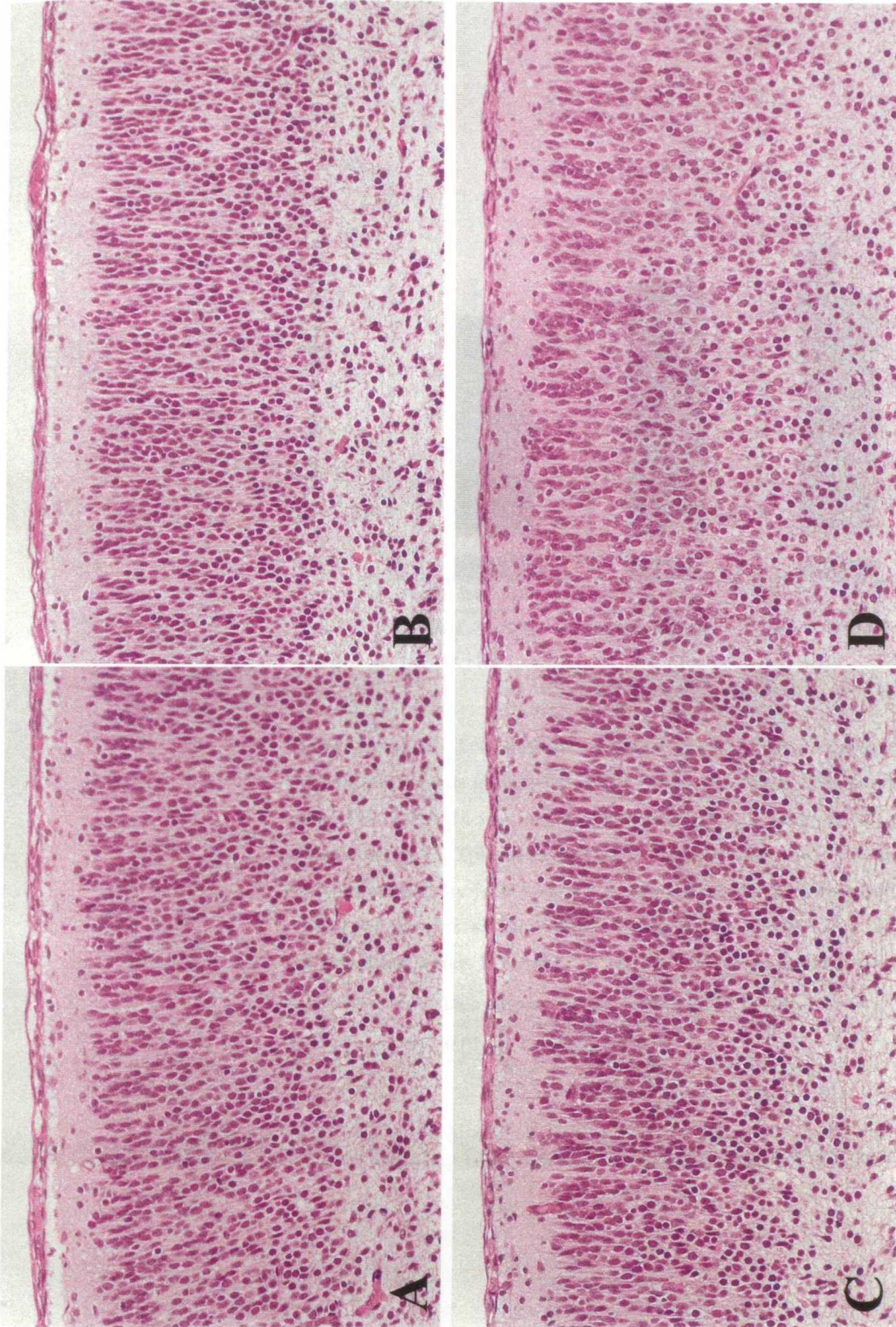


Fig. 6. Representative photomicrographs of cerebral cortex in fetuses. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. The cerebral cortex of fetuses which had become thin with L-NAME+DW treated rats (B) than the Saline+DW treated rats (A), but Tokishakuyakusan reversed the thickness of cerebral cortex (C, D) to the normal level. The values of thickness in cerebral cortex were shown in Table 1. There were no pathological changes in the all cerebra. A, Saline+DW; B, L-NAME+DW; C, L-NAME+Tokishakuyakusan 1g/kg; D, L-NAME+Tokishakuyakusan 2g/kg. The cerebrum was examined under a light microscope with hematoxylin and eosin staining. Original magnification  $\times 33$ .

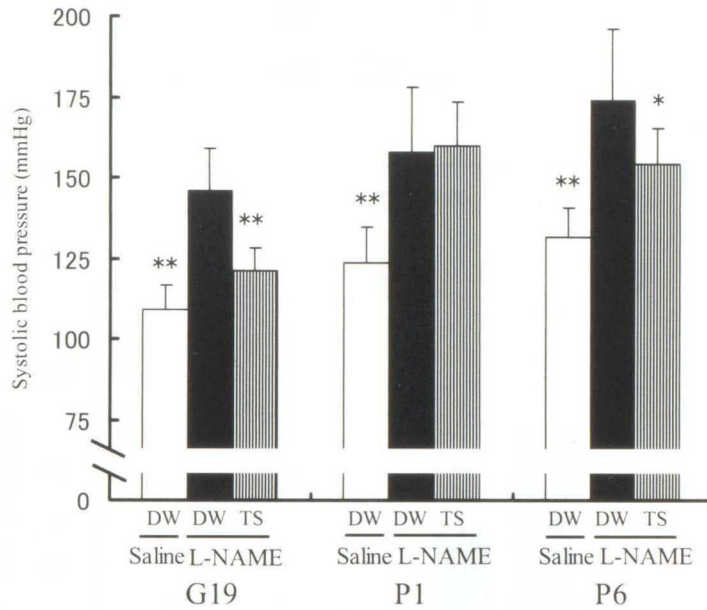


Fig. 7. Effect of Tokishakuyakusan on systolic blood pressure of L-NAME-treated rats for gestational day 19 (G19) and postpartum day 1 (P1) and 6 (P6). L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 16. Tokishakuyakusan (2g/kg) was administered by gavage from gestational day 16 to postpartum day 7. Systolic blood pressure was measured on gestational day 19 and postpartum day 1 and 6. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean ± SD for 10 rats in each group. \*\**p*<0.05 and \*\*\**p*<0.01, vs. L-NAME+DW



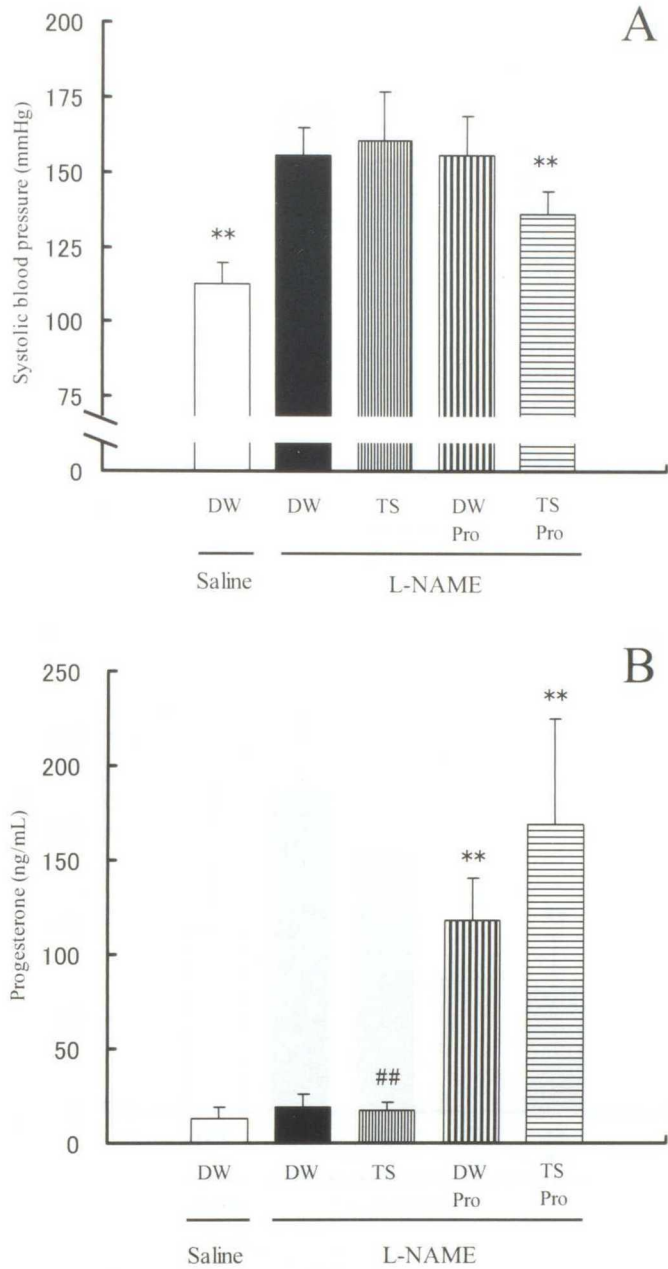


Fig. 8. Effect of Tokishakuyakusan and Tokishakuyakusan+progesterone co-administration on systolic blood pressure (A) and progesterone level (B) of L-NAME-treated rats for postpartum day 1. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 16. Tokishakuyakusan (2g/kg) was administered by gavage from gestational day 16 to postpartum day 7. Progesterone (2mg/rat, twice daily) was administered subcutaneously in a volume of 0.2mL. Systolic blood pressure and progesterone level were measured on postpartum day 1. DW: distilled water. L-NAME:  $N^{\omega}$ -Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Pro: progesterone. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 10 rats in each group. \*\* $p$ <0.01, vs. L-NAME+DW ## $p$ <0.01, vs. TS+Pro

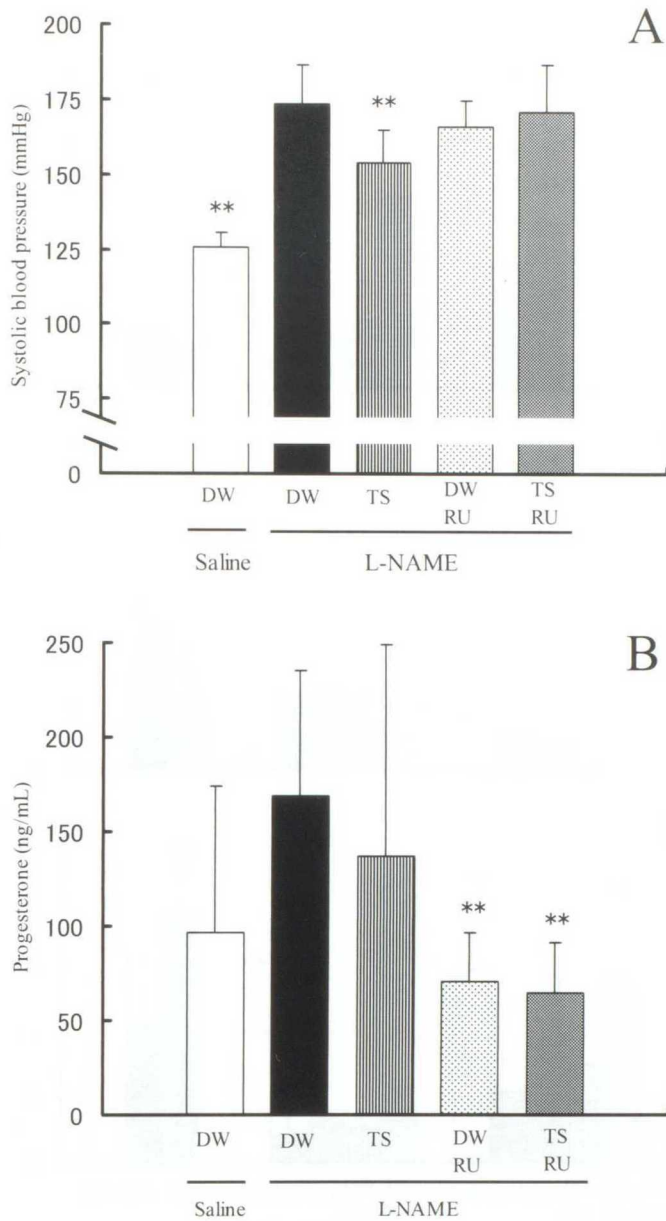


Fig. 9. Effect of Tokishakuyakusan and Tokishakuyakusan+mifepristone (RU-486) co-administration on systolic blood pressure (A) and progesterone level (B) of L-NAME-treated rats for postpartum day 6 or 7. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 16. Tokishakuyakusan (2g/kg) was administered by gavage from gestational day 16 to postpartum day 7. RU-486 (30mg/kg) was administered subcutaneously in a volume of 2mL/kg. Systolic blood pressure and progesterone level were measured on postpartum day 6 or 7. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. RU: RU-486. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 10 rats in each group. \*\* $p$ <0.01, vs. L-NAME+DW

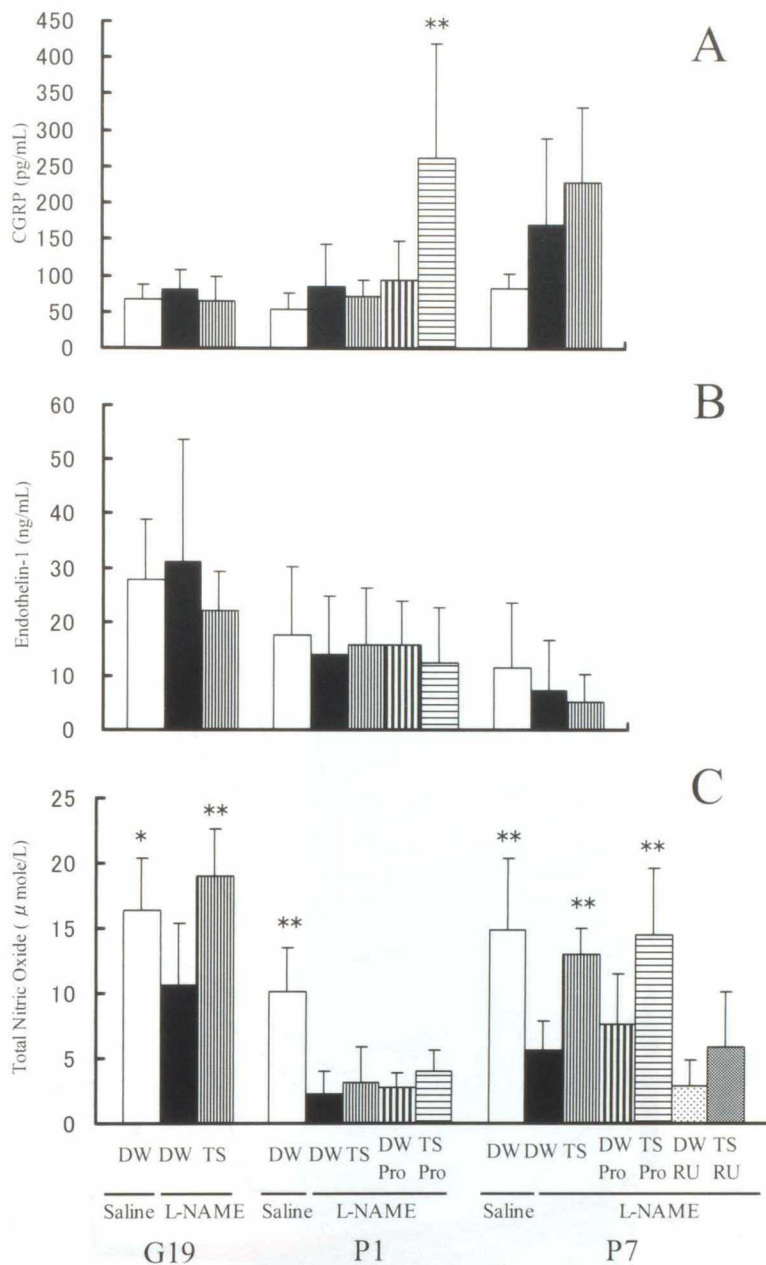


Fig. 10. CGRP (A), endothelin-1 (B), and total nitric oxide (C) concentrations of L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 16. Tokishakuyakusan (2g/kg) was administered by gavage from gestational day 16 to postpartum day 7. Progesterone (2mg/rat, twice daily) and RU-486 (30mg/kg) were administered subcutaneously in a volume of 0.2mL and 2mL/kg, respectively. The concentration was measured on gestational day 19 (G19) and postpartum day 1 (P1) and 7 (P7). DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Pro: progesterone. RU: RU-486. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 8-10 rats in each group. \*\* $p$ <0.05 and \*\*\* $p$ <0.01, vs. L-NAME+DW



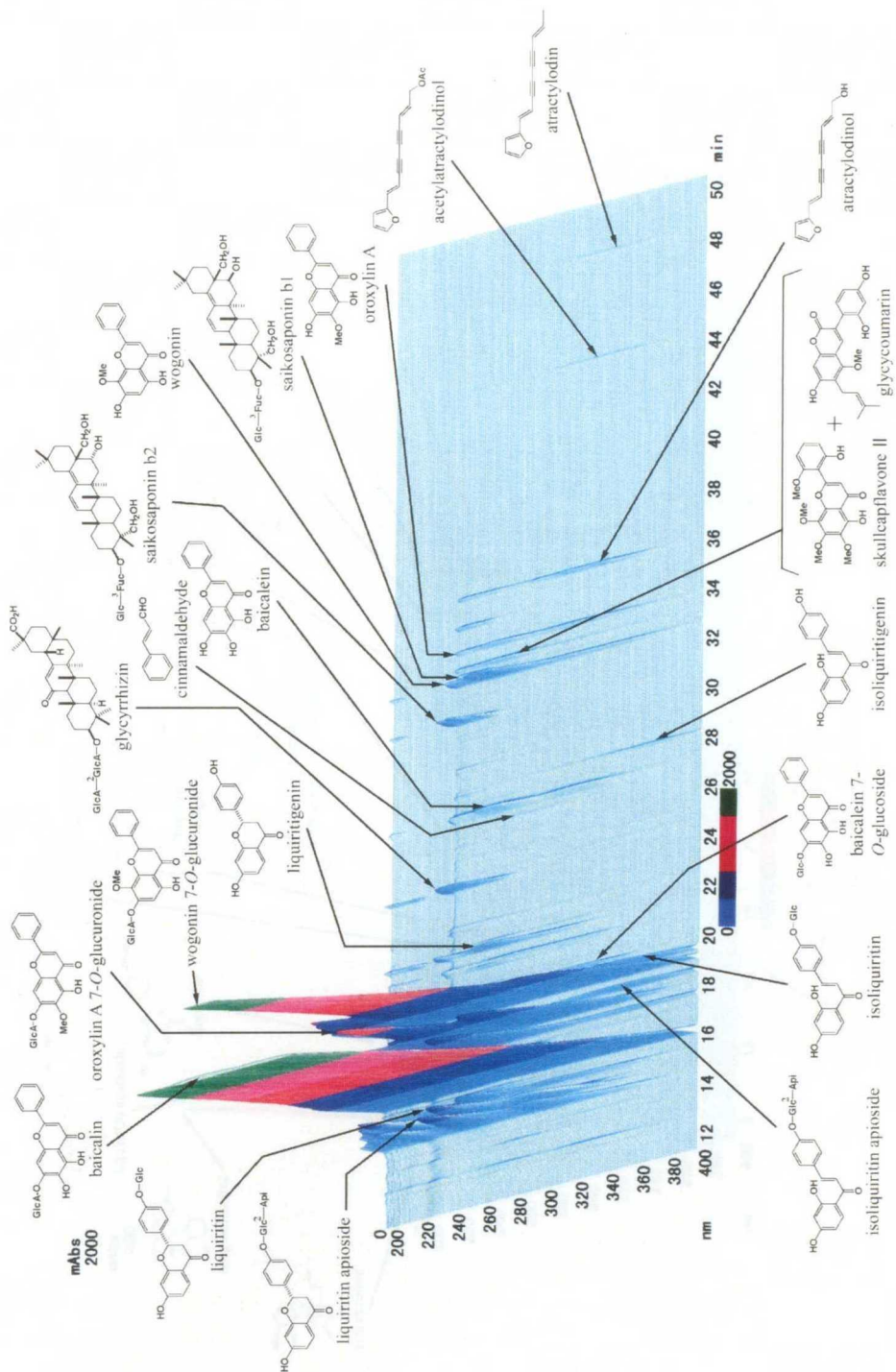


Fig. 11. 3D HPLC profile of Saireito. The peak analysis and assignment were performed using standard samples that had been isolated from raw materials. The chromatographic conditions are described in Materials and Methods.

Absorbance (mAbs); Wavelength (nm); Retention time (min)

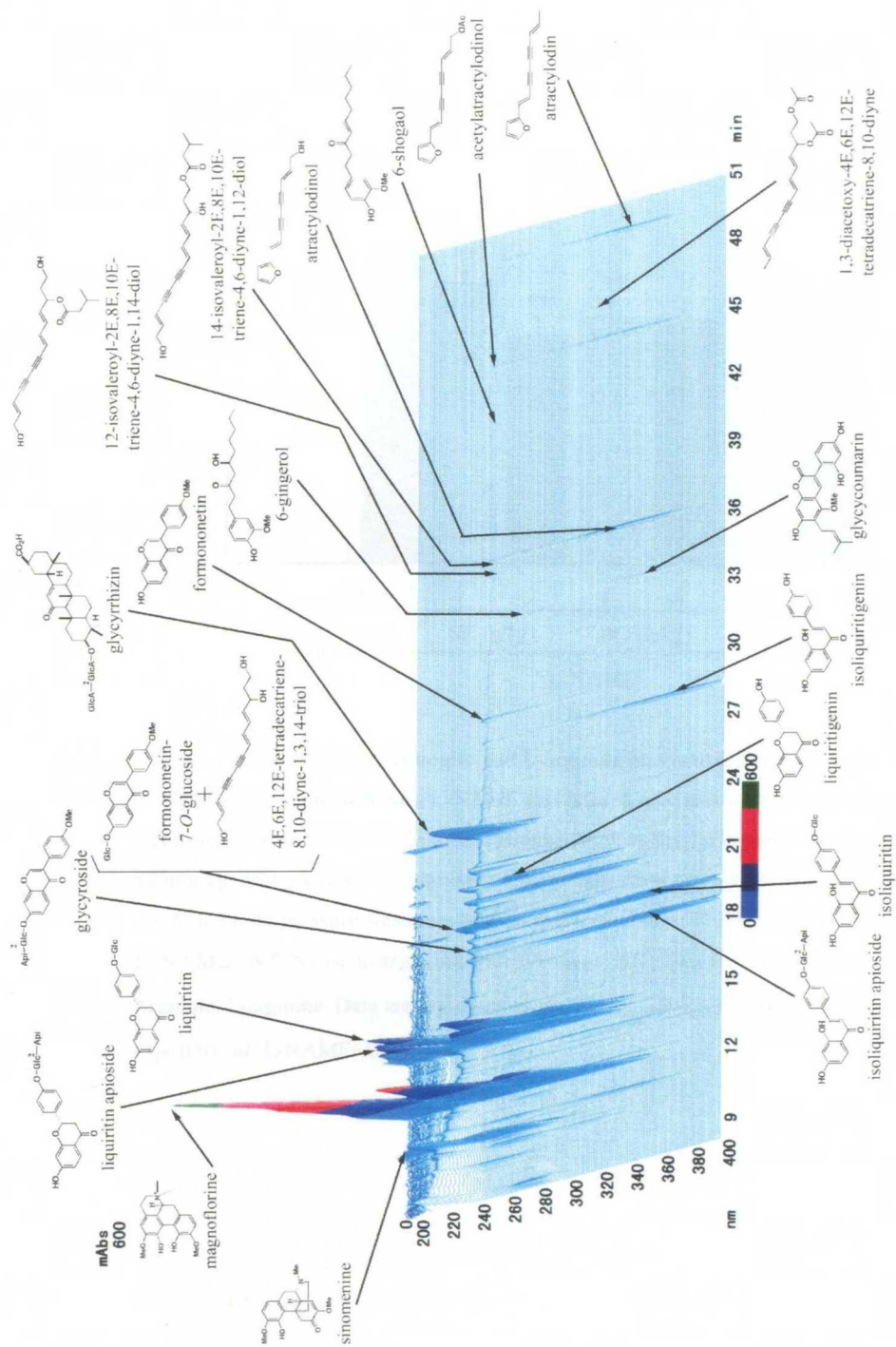


Fig. 12. 3D HPLC profile of Boiogito. The peak analysis and assignment were performed using standard samples that had been isolated from raw materials. The chromatographic conditions are described in Materials and Methods. Absorbance (mAbs); Wavelength (nm); Retention time (min)

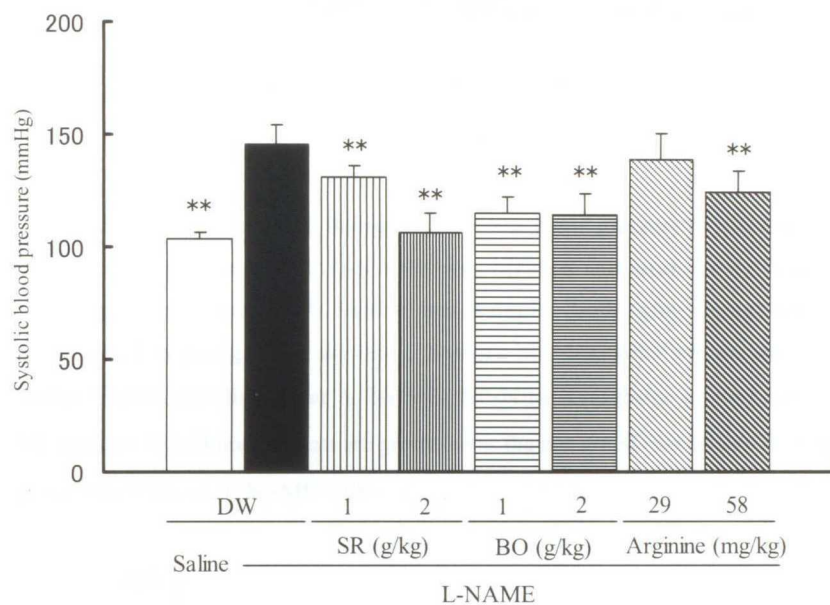


Fig. 13. Effect of Saireito, Boiogito and L-arginine on systolic blood pressure of L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Saireito, Boiogito (both 1g/kg, 2g/kg) and L-arginine (29mg/kg, 58mg/kg) were administered by gavage from gestational day 14 to 20. Systolic blood pressure was measured on gestational day 19. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Arginine: L-arginine. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 10 rats in each group. \*\* $p$  < 0.01, vs. L-NAME+DW

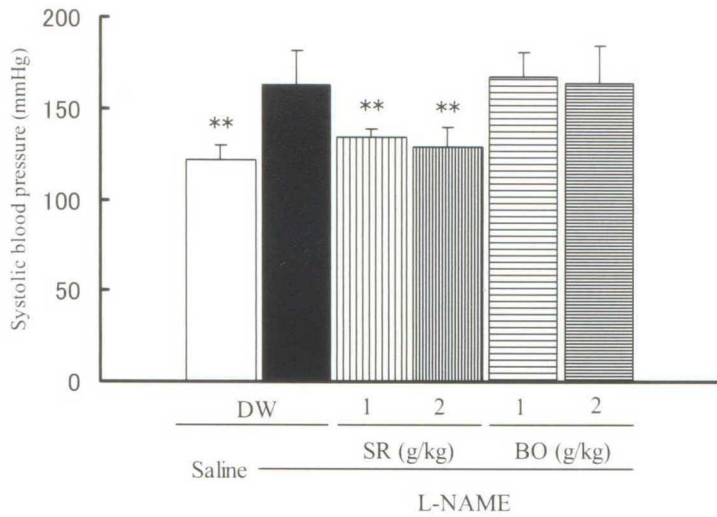


Fig. 14. Effect of Saireito and Boiogito on systolic blood pressure of L-NAME -treated non-pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into non-pregnant rats from day 0. Saireito and Boiogito (both 1g/kg, 2g/kg) were administered by gavage from day 0 to 6. Systolic blood pressure was measured on day 5. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data are presented as the mean ± SD for 10 rats in each group. \*\**p*<0.01, vs. L-NAME+DW

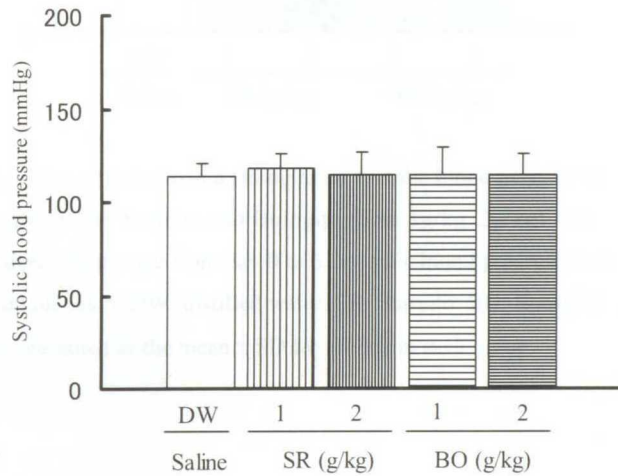


Fig. 15. Effect of Saireito and Boiogito on systolic blood pressure of pregnant rats. Saireito and Boiogito (both 1g/kg, 2g/kg) were administered by gavage from gestational day 14 to 20. Systolic blood pressure was measured on gestational day 19. DW: distilled water. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data are presented as the mean ± SD for 10 rats in each group.

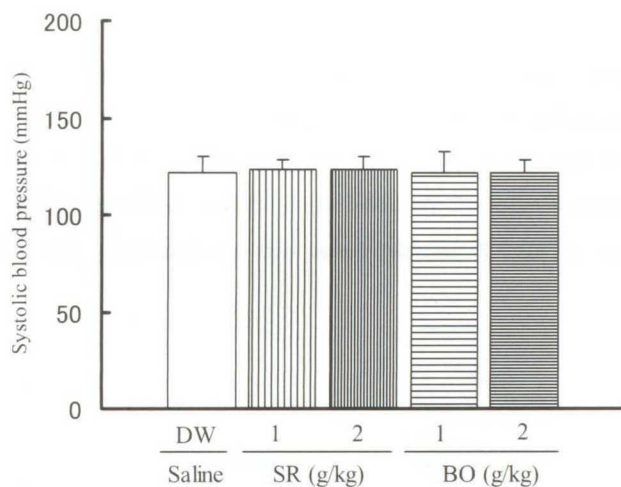


Fig. 16. Effect of Saireito and Boiogito on systolic blood pressure of non-pregnant rats. Saireito and Boiogito (both 1g/kg, 2g/kg) were administered by gavage from day 0 to 6. Systolic blood pressure was measured on day 5. DW: distilled water. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data are presented as the mean  $\pm$  SD for 10 rats in each group.



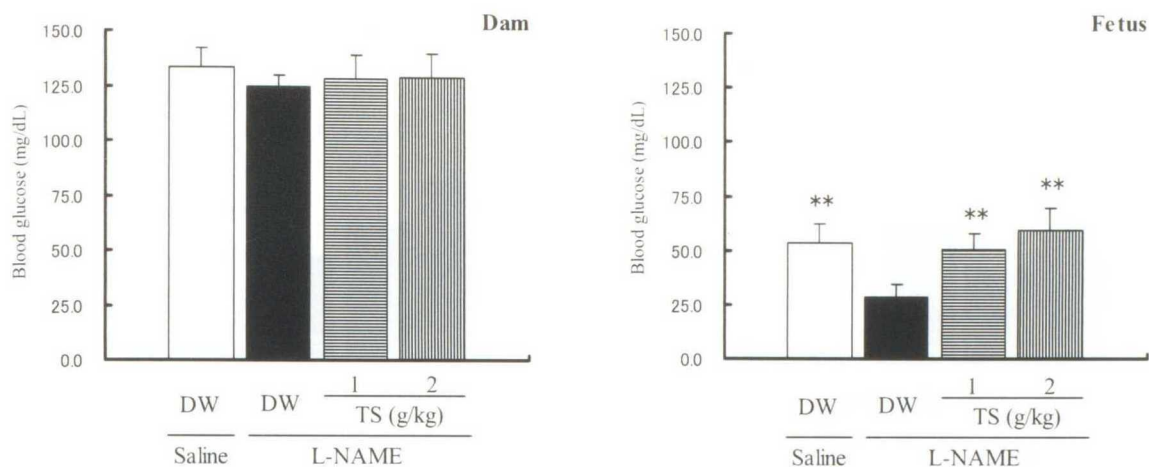


Fig. 17. Blood glucose concentration of dam and fetus in L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Dam and fetus were decapitated on gestational day 20. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean±SD for 8 rats in each group. \*\**P*<0.01, vs L-NAME+DW

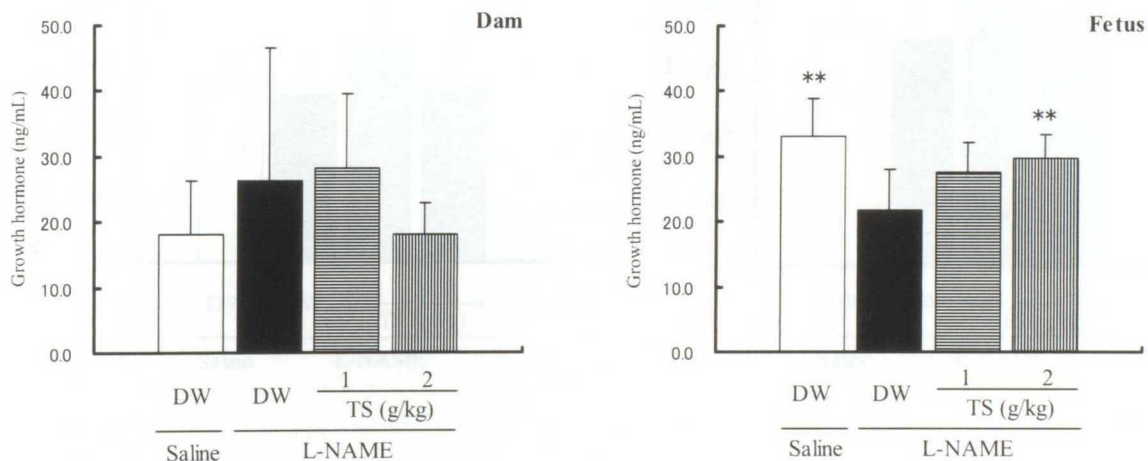


Fig. 18. Growth hormone (GH) level of dam and fetus in L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Dam and fetus were decapitated on gestational day 20. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean±SD for 8 rats in each group. \*\**P*<0.01, vs L-NAME+DW

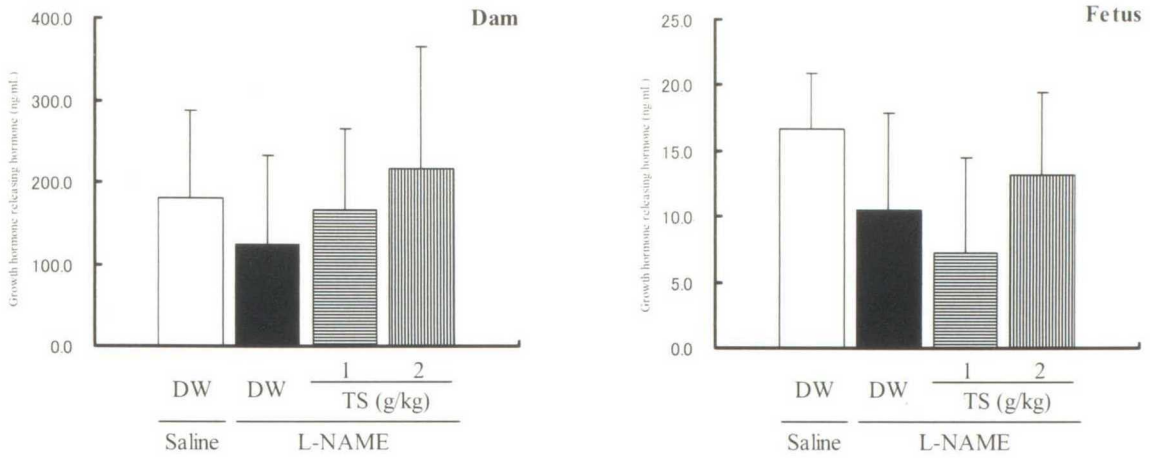


Fig. 19. Growth hormone releasing hormone (GHRH) level of dam and fetus in L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Dam and fetus were decapitated on gestational day 20. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean±SD for 8 rats in each group.

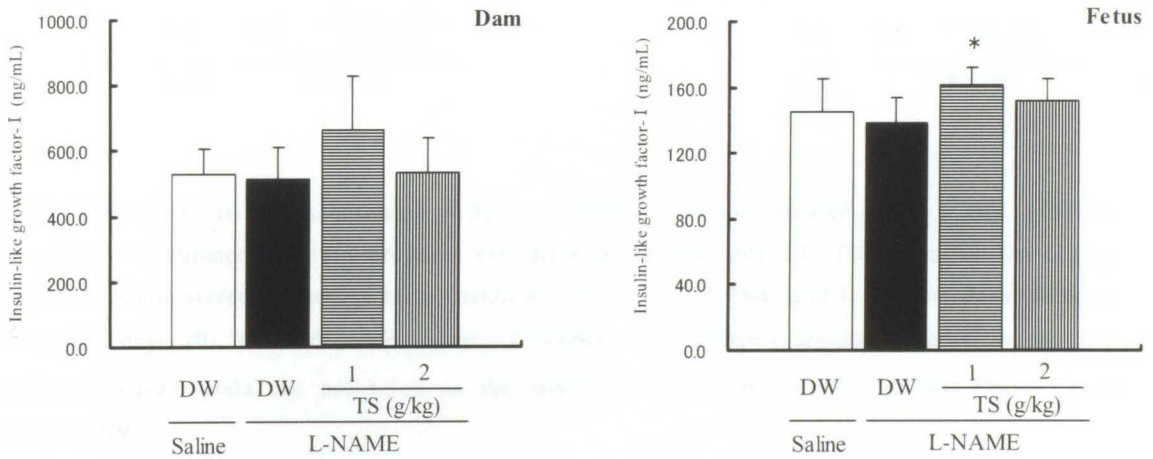


Fig. 20. Insulin-like growth factor- I (IGF- I) level of dam and fetus in L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Dam and fetus were decapitated on gestational day 20. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean±SD for 8 rats in each group. \* $P < 0.05$ , vs L-NAME+DW

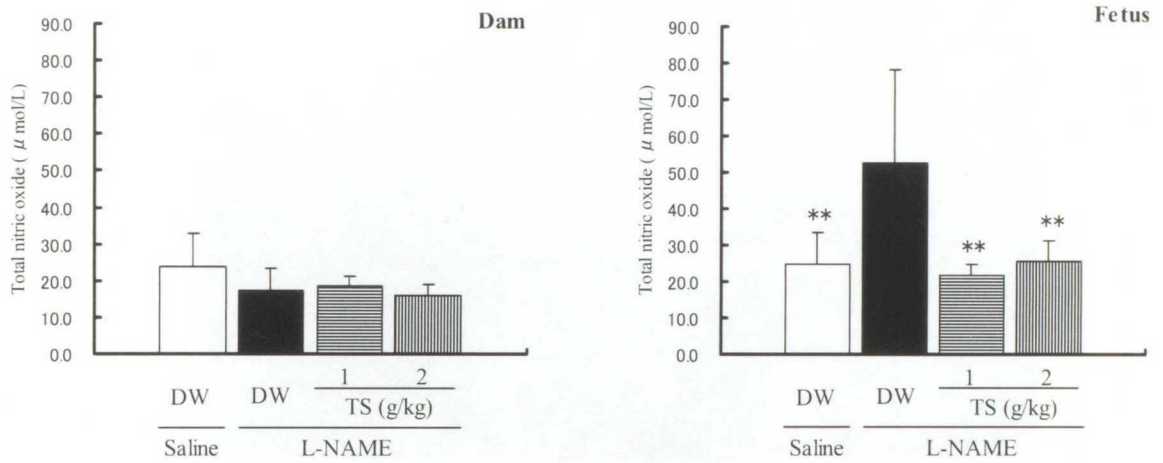


Fig. 21. Total nitric oxide concentration of dam and fetus in L-NAME-treated pregnant rats. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Dam and fetus were decapitated on gestational day 20. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean±SD for 8 rats in each group. \*\* $P < 0.01$ , vs L-NAME+DW



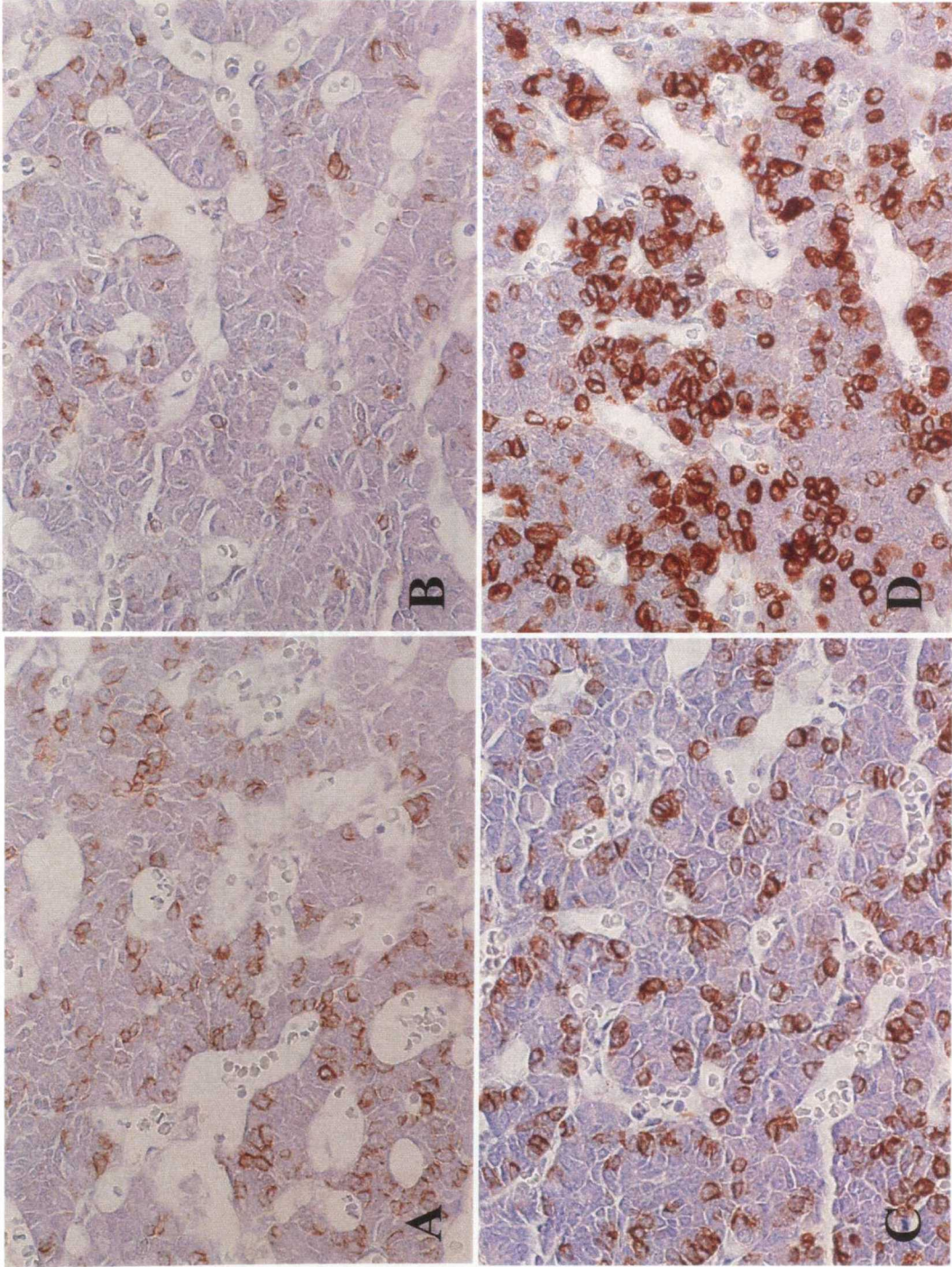


Fig. 22. Representative immunocytochemical staining of growth hormone (GH)-positive cells (somatotrope) in fetal pituitary gland. L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. A; Saline+DW, B; L-NAME+DW, C; L-NAME+Tokishakuyakusan 1g/kg, D; L-NAME+Tokishakuyakusan 2g/kg. The pituitary gland was examined under a light microscope with TUNEL positive staining. Original magnification  $\times 80$ .

Table 1. Total nitric oxide concentration in the serum of L-NAME-treated/non-treated pregnant and non-pregnant rats

L-NAME	Pregnancy	DW	TS 1g/kg	TS 2g/kg
-	-	15.99 ± 2.89	14.20 ± 2.06	15.70 ± 3.74
-	+	21.75 ± 4.73	24.76 ± 3.49	25.16 ± 5.40
+	-	11.25 ± 2.26	14.57 ± 2.45*	13.47 ± 1.75
+	+	10.02 ± 2.61	13.11 ± 2.85*	10.48 ± 1.66

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant or non-pregnant rats, and Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14. Serum NO concentrations were measured as described in Materials and Methods. Pregnancy: -, non-pregnant rat, +; pregnant rat. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data expressed in μ Mole/L and as the mean±SD for 6-10 rats in each group. \*p<0.05: vs. DW

Table 2. Fetal effects of L-NAME-treated pregnant rats

Treatment	Saline	L-NAME 60mg/kg	L-NAME 60mg/kg	L-NAME 60mg/kg	L-NAME 60mg/kg	L-NAME 60mg/kg	L-NAME 60mg/kg
	DW	DW	TS 1g/kg	TS 2g/kg	Arginine 17mg/kg	Arginine 17mg/kg	Arginine 34mg/kg
Fetal mortality (%)	6.3±8.4	10.3±3.8	5.2±6.3	4.7±4.9	3.8±6.4	3.8±6.4	5.0±7.3
Placental weight (g)	0.61±0.06	0.58±0.06	0.54±0.06	0.58±0.08	0.58±0.04	0.58±0.04	0.56±0.05
Fetal body weight (g)	3.80±0.21**	3.25±0.16	3.45±0.31	3.59±0.23**	3.39±0.17	3.39±0.17	3.30±0.24
Fetal cerebrum weight (mg)	132.5±6.3*	125.8±3.1	128.4±4.2	133.2±5.2**	128.3±4.2	128.3±4.2	127.6±5.2
Thickness of cerebral cortex (μm)	209.9±11.2*	195.6±8.5	208.0±12.9*	215.6±9.0**	-	-	-

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 14. Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 to 20. Fetuses were examined as described in Materials and Methods. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Each value represents the mean±SD for 10 rats in each group. Means were calculated using the average placental weight and fetal body weight, and each finding per dam (ten dams in each group). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01: vs. L-NAME+DW

Table 3. The levels of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and testosterone in the sera of L-NAME-treated rats for gestational day 19, postpartum day 1 and 7

Treatment		Saline		L-NAME 60mg/kg	
		DW	DW	DW	TS
17 $\beta$ -estradiol (pg/mL)	G19	23.02 $\pm$ 5.43	28.54 $\pm$ 10.33	22.52 $\pm$ 4.77	
	P1	7.35 $\pm$ 2.32 <sup>##</sup>	8.32 $\pm$ 5.33 <sup>##</sup>	7.70 $\pm$ 5.68 <sup>#</sup>	
	P7	7.44 $\pm$ 1.93 <sup>##</sup>	9.24 $\pm$ 3.91 <sup>##</sup>	6.94 $\pm$ 1.69 <sup>##</sup>	
Progesterone (ng/mL)	G19	47.04 $\pm$ 5.15 <sup>\$\$</sup>	48.46 $\pm$ 18.77	46.39 $\pm$ 7.87 <sup>\$\$</sup>	
	P1	12.90 $\pm$ 6.07	19.12 $\pm$ 6.85	17.10 $\pm$ 4.22	
	P7	96.64 $\pm$ 77.78 <sup>\$\$</sup>	169.38 $\pm$ 65.7 <sup>\$\$</sup>	137.27 $\pm$ 112.18 <sup>\$\$</sup>	
Testosterone (ng/mL)	G19	1.46 $\pm$ 0.41	1.63 $\pm$ 0.46	1.20 $\pm$ 0.37	
	P1	0.53 $\pm$ 0.34 <sup>#</sup>	0.74 $\pm$ 0.68	0.18 $\pm$ 0.17	
	P7	0.99 $\pm$ 0.36	1.38 $\pm$ 1.13	1.04 $\pm$ 0.51 <sup>\$\$</sup>	

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats from gestational day 16. Tokishakuyakusan was administered by gavage from gestational day 16 to postpartum day 7. The levels of sex steroids were evaluated by EIA and RIA. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>w</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean $\pm$ SD for 8-10 rats in each group. #, ##  $p$ <0.05 or 0.01, vs. G19 \$\$  $p$ <0.01, vs. P1

Table 4. Total nitric oxide concentration in the serum of L-NAME-treated/non-treated pregnant and non-pregnant rats

L-NAME	Pregnancy	DW	SR 1g/kg	SR 2g/kg	BO 1g/kg	BO 2g/kg
-	-	26.69 ± 7.67	41.52 ± 15.73*	41.39 ± 7.89*	41.48 ± 16.86*	48.59 ± 9.85**
-	+	19.54 ± 3.18	30.02 ± 4.95**	33.52 ± 4.94**	27.27 ± 5.25**	32.85 ± 4.07**
+	-	11.02 ± 2.95	23.92 ± 5.26**	26.26 ± 7.17**	22.77 ± 4.28**	28.01 ± 5.32**
+	+	12.69 ± 2.94	22.20 ± 3.64**	31.24 ± 5.85**	19.02 ± 2.98**	28.62 ± 5.92**

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant or non-pregnant rats, and Saireito or Boiogito (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 or day 0 (non-pregnant rats). Serum NO concentrations were measured as described in Materials and Methods. L-NAME: -; Saline-treated rats, +; L-NAME-treated rats. Pregnancy: -, non-pregnant rat, +; pregnant rat.

DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data expressed in  $\mu$  Mol/L and as the mean  $\pm$  SD for 10 rats in each group. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01: vs. DW

Table 5.  $17\beta$ -Estradiol and progesterone levels in the sera of pregnant rats

Treatment	L-NAME	DW	SR 1g/kg	SR 2g/kg	BO 1g/kg	BO 2g/kg
$17\beta$ -Estradiol (pg/mL)	-	18.09±5.89	12.64±3.51**	10.90±2.08**	15.78±1.67	19.20±2.79
	+	32.93±4.85	24.21±5.34	30.42±11.49	29.63±8.22	49.62±35.04
Progesterone (ng/mL)	-	77.03±36.51	67.28±35.38	61.76±33.15	62.54±23.34	69.40±26.52
	+	40.94±14.97	63.43±28.93*	36.06±10.39	63.10±20.79*	28.97±11.09

Saireito and Boiogito (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14. L-NAME: -; Saline-treated rats, +; L-NAME-treated rats. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data are presented as the mean ± SD for 10 rats in each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : vs. DW

Table 6. CGRP and endothelin-1 concentrations in the plasma of L-NAME-treated/non-treated pregnant and non-pregnant rats

Treatment	L-NAME	Pregnancy	DW	SR 1g/kg	SR 2g/kg	BO 1g/kg	BO 2g/kg
CGRP (pg/mL)	-	-	83.11 ± 41.18	73.38 ± 36.10	130.77 ± 54.96	106.83 ± 43.12	122.47 ± 70.28
	-	+	34.54 ± 17.04	31.04 ± 9.65	33.23 ± 15.26	22.15 ± 7.30	22.30 ± 8.29
	+	-	62.47 ± 36.71	50.40 ± 16.46	58.91 ± 29.77	58.48 ± 20.68	69.04 ± 20.74
	+	+	104.52 ± 31.57	131.92 ± 28.14	196.42 ± 14.13**	164.77 ± 26.34**	220.94 ± 21.08**
Endothelin-1 (ng/mL)	-	-	65.71 ± 2.44	65.69 ± 4.15	69.01 ± 2.80	53.86 ± 10.28	42.94 ± 22.51**
	-	+	43.82 ± 8.34	35.53 ± 15.59	37.01 ± 24.07	38.87 ± 10.98	30.80 ± 16.89
	+	-	52.64 ± 9.99	56.49 ± 4.13	50.91 ± 12.12	56.61 ± 10.49	63.69 ± 2.27
	+	+	48.52 ± 5.78	50.70 ± 4.58	44.96 ± 7.96	30.80 ± 7.37**	13.57 ± 5.60**

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant or non-pregnant rats, and Saireito or Boiogito (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14 or day 0 (non-pregnant rats). L-NAME: -; Saline-treated rats, +; L-NAME-treated rats. Pregnancy: -; non-pregnant rat, +; pregnant rat. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Data are presented as the mean ± SD for 7-10 rats in each group. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01: vs. DW

Table 7. Fetal body weight and placental weight in the L-NAME-treated pregnant rats

Treatment	Saline		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg	
	DW		DW		SR 1g/kg	SR 2g/kg	BO 1g/kg	BO 2g/kg	Arginine 29mg/kg	Arginine 29mg/kg	Arginine 58mg/kg	Arginine 58mg/kg
Total No. of fetuses/placentae	150		140		122	136	129	121	138	138	138	138
Fetal body weight (g)	3.67 ± 0.25**		3.34 ± 0.23		3.14 ± 0.23	3.46 ± 0.21	3.19 ± 0.23	3.40 ± 0.25	3.28 ± 0.13	3.25 ± 0.19	3.25 ± 0.19	3.25 ± 0.19
Placental weight (g)	0.52 ± 0.04		0.57 ± 0.07		0.54 ± 0.09	0.59 ± 0.07	0.50 ± 0.04*	0.57 ± 0.03	0.57 ± 0.06	0.55 ± 0.04	0.55 ± 0.04	0.55 ± 0.04

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats, and Saireito and Boiogito (1g/kg, 2g/kg) or L-arginine (29mg/kg, 58mg/kg) were administered by gavage from gestational day 14. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>w</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. SR: Saireito. BO: Boiogito. Arginine: L-arginine. Data are presented as the mean ± SD for 10 pregnant rats in each group. Means were calculated using the average placental and fetal weight per dam (ten dams in each group).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : vs. L-NAME+DW



Table 8. Fetal body weight and placental weight in the L-NAME-treated pregnant rats

Treatment	Saline		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg	
	DW		DW	TS 1g/kg	TS 2g/kg	
Total No. of fetuses/placentae	115		127	112	114	
Fetal body weight (g)	3.77±0.11**		3.17±0.21	3.68±0.17**	3.70±0.28**	
Placental weight (g)	0.47±0.03		0.44±0.04	0.50±0.02**	0.49±0.03*	

L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats, and Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester.

TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean ± SD for 8 pregnant rats in each group. Means were calculated using the average placental and fetal weight per dam (eight dams in each group).

\*P<0.05 and \*\*P<0.01, vs L-NAME+DW

Table 9. Histopathological findings of placenta in L-NAME-treated pregnant rats

Treatment	Saline			L-NAME 60mg/kg					L-NAME 60mg/kg							
	DW			DW					TS 2g/kg							
Animal number	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8
Vacuolation of syncytiotrophoblastic cells	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Accumulation of cell-debris in decidual basalis	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Histopathological grading: -, no change, +; slight L-NAME was infused subcutaneously into pregnant rats, and Tokishakuyakusan (1g/kg, 2g/kg) was administered by gavage from gestational day 14. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan.

Table 10. Number of TUNEL-positive cells in placenta

Treatment	Saline DW	L-NAME 60mg/kg DW	L-NAME 60mg/kg TS 2g/kg
Chorion			
Basal zone	67.7 ± 20.8	62.5 ± 32.0	55.7 ± 15.4
Labyrinth	32.3 ± 11.0	51.5 ± 26.0	44.0 ± 15.7

DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester.

TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean ± SD for 7-10 rats in each group.

Table 11. Number of somatotrope in fetal pituitary gland on gestational day 20

Treatment	Saline		L-NAME 60mg/kg		L-NAME 60mg/kg	
	DW		DW	TS 1g/kg	TS 2g/kg	
Somatotrope (number/mm <sup>2</sup> )	176.4 ± 41.5		155.6 ± 48.1	224.5 ± 57.9*	236.9 ± 62.3*	

Immunocytochemical staining of somatotrope in fetal pituitary gland on gestational day 20. Fetuses were obtained from 8 dams in each group. DW: distilled water. L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester. TS: Tokishakuyakusan. Data are presented as the mean ± SD for 8 fetuses in each group. \**p*<0.05, vs L-NAME+DW

Functional and morphological studies on  
the effect of Kampo medicines in  
pre-eclamptic rat model

by

Hisato Takei

Abstract

Pre-eclampsia is a major complication of human pregnancies, affecting from 4% to 8% of pregnant women. It is characterized by hypertension, edema, and proteinuria, and the leading cause of fetal growth retardation, neonatal morbidity, mortality associated with premature delivery, and maternal sickness (Brown, 1995), and it is a disease of the first cause of the gravidopuerperal death in Japan. Risk factors such as multiple pregnancy, extremes of maternal age, family history, essential hypertension, and renal disease are known to greatly increase its occurrence, but the pathophysiology is still incompletely understood. It is known that some patients only develop hypertension during labour, which is a time of maternal risk (Long, 1981). The rest and the alimentotherapy (salinity limitation, calorie limitation, and protein-rich diet) are principles for the treatment of pre-eclampsia. At present, there is only symptomatic treatment as a drug therapy, and the anti-hypertension medications such as the Ca antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitors are main.

However, it is thought that utero-placental blood flow decreases, and it has a

large influence on the fetal development if it inhibits to the blood pressure forcibly during pregnancy, and seems to be difficult that the dam and fetus are treated at the same time at present. In clinical and experimental studies, because of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) deficiency and the resulting increased thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>): PGI<sub>2</sub> ratio has been supposed to be the cause of selective platelet destruction, reduced uteroplacental blood flow and placental infarction in pre-eclampsia, correction of the PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> imbalance has been tried to prevent pre-eclampsia (Dekker, 1995). Therapy using low-dose aspirin, PGI<sub>2</sub> analogues and TXA<sub>2</sub> synthetase inhibitors, however, has proven unsatisfactory.

During a normal pregnancy in both humans and animals, there is a physiological vascular adaptation that includes increased blood volume, increased cardiac output, and decreased vascular resistance. These changes are suggested to be regulated, at least partly, by endogenously produced nitric oxide (NO). Recently, experimental studies in rats have shown that chronic inhibition of NO synthesis during normal pregnancy, by continuous administration of an NO synthetase inhibitor N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), induces a clinical picture similar to that of pre-eclampsia including hypertension, fetal growth retardation, and proteinuria (Yallampalli, 1993; Salas, 1995; Diket, 1994). Though chronic treatment by L-NAME may not reproduce the entire disease entity, it produces virtually all the symptoms of pre-eclampsia in the animal model. This implies a direct relationship between NO production and the vascular changes in normal pregnant women and pre-eclamptic patients, and various substances including calcitonin gene-related peptide (CGRP) and endothelin modulators have been examined in L-NAME-treated pregnant rats (Richer, 1996; Yallampalli, 1996; Gangula, 1997a; Wight, 1998; Wimalawansa, 1998; Makino, 1999; Olson, 1999; Zlatnik, 1999).

Nowadays, in Japan, certain traditional herbal medicines (Kampo medicines) are used clinically with standardized quantities and quality of ingredients. Among these medicines, Tokishakuyakusan, Saireito and Boiogito are comparatively used by high frequency as a clinical prescription for especially pre-eclampsia. Tokishakuyakusan is widely used to alleviate menopausal symptoms (Koyama, 1993). Tokishakuyakusan is widely used to alleviate menopausal symptoms (Koyama, 1993), and also used as a tocolytic drug for the treatment of preterm labor (Noguchi, 1985; Kano, 1991). In animal studies, Tokishakuyakusan has been reported to regulate the ovarian endothelin-renin-angiotensin-arterial natriuretic peptide system (Usuki, 1992), and the intravenous administration of Tokishakuyakusan increased on  $17\beta$ -estradiol, progesterone and testosterone levels in the serum or preovulatory follicles (Usuki, 1990).

Saireito is chiefly used for clinical treatment of the edema and proteinuria of toxemia during pregnancy (Ito et al., 1996; Ushiroyama, 2003) and renal disease (Senaga and Kawashima, 1986). In animal studies, Saireito has been reported to have a preventive effect on proteinuria induced by puromycin aminonucleoside in rats, with a reduction of urinary protein and plasma cholesterol (Abe, 1986). On the other hand, Boiogito is widely used to treat osteoarthritis of the knee (Otani et al., 1997; Noguchi et al., 2004), and the proteinuria, edema of crus and renal dysfunction in rheumatoid arthritis patients (Takahama, 1995). Boiogito has been reported to suppress urinary excretion of protein and restore the 6-keto-prostaglandin  $F_{1\alpha}$ /thromboxane $B_2$  ratio in the kidney (Nagasawa et al., 2001). Though these reports might relate to the improvement of pre-eclampsia by clinical, no studies have ever tried to demonstrate the

effect of Tokishakuyakusan, Saireito and Boiogito for pre-eclampsia.

The objective of this study investigated on the pharmacological effects of each Kampo medicines on L-NAME-induced pre-eclamptic rat model, especially both the dam and fetal treatments, and to clarify its mechanism of action. And the approach from the following various angles were tried.

#### Summary of results

1. We tested the traditional herbal medicine Tokishakuyakusan for pre-eclampsia-like syndrome including hypertension and intrauterine growth retardation (IUGR) in L-NAME-treated rat.

Tokishakuyakusan improved the hypertension and IUGR in pre-eclamptic rats induced by L-NAME. Tokishakuyakusan is not a direct depressor, and the suppressive effect on L-NAME-induced pre-eclampsia is not due to the modulation of NO production. Furthermore, Tokishakuyakusan restored the damages (the decreases in the fetal cerebrum weight and the thickness of the cerebral cortex) induced by the L-NAME treatments. Interestingly, the beneficial effect of Tokishakuyakusan on L-NAME-induced hypertension has been shown only pregnant rats. The depression of blood pressure in Tokishakuyakusan administered dosage is not enough to prevent IUGR in this model and the effects of IUGR may involve other mechanisms of action than depressing hypertension.

2. We demonstrated the anti-hypertensive effect of Tokishakuyakusan in L-NAME-treated rat model during pregnancy and the postpartum period.

Tokishakuyakusan improved the hypertension in pre-eclamptic rats induced by L-NAME on gestational day 19 and postpartum day 7, however, there was no



such prevention on postpartum day 1. The depressor effect of Tokishakuyakusan on L-NAME-induced hypertension that a certain level of progesterone may be an indispensable prerequisite, and the effect of Tokishakuyakusan are apparently unrelated to blood concentrations of NO, CGRP, and endothelin-1.

3. We tested the traditional herbal medicines Saireito and Boiogito, for hypertension of pre-eclampsia-like syndrome in L-NAME-treated rat.

Saireito and Boiogito prevented hypertension in the L-NAME-induced pre-eclamptic rat, but had no effect on the L-NAME-induced IUGR. Saireito is not a direct depressor, and the hypotensive action is increasing of CGRP concentration in the blood. In the other, Boiogito is also not a direct depressor, and the hypotensive action is increasing of CGRP concentration and decreasing of endothelin-1 concentration in the blood.

4. We investigated the effect of Tokishakuyakusan on the growth hormone and its regulators/mediators in L-NAME-induced pre-eclamptic rats during pregnancy.

It has been suggested that a cause of L-NAME-induced IUGR depends on the decrease in the growth hormone (GH) secretion of fetus, which is not due to histopathological abnormality of the placenta. And the increase in fetal blood GH levels following TS treatment may be attributed to the enhanced differentiation of somatotrope in fetal pituitary gland, in a growth

hormone releasing hormone (GHRH)-independent fashion. Therefore, it was suggested that Tokishakuyakusan was increased on the fetal weight of IUGR caused by proliferating of the somatotrope and promoting the secretion of GH in fetal pituitary gland.

These results suggested that Tokishakuyakusan is improved on the hypertension and IUGR, or Saireito and Boiogito is inhibited to the hypertension, respectively, when the traditional herbal medicines are induced a pre-eclampsia-like syndrome during pregnancy or the postpartum period. These three Kampo medicines were not a direct depressor like an existent hypotensive drug; moreover, their anti-hypertensive action was different to respectively.

Although the mechanism of the depressor action of Tokishakuyakusan is unknown, it would be dependent on the co-existence of a certain level of progesterone. Boiogito affected both CGRP and endothelin-1 concentrations in the blood, while Saireito affected only CGRP concentration. Moreover, it was suggested that the improvement action of IUGR shown in Tokishakuyakusan was caused by proliferating of the somatotrope and promoting of the GH secretion in the fetal pituitary gland. Thus, this study demonstrated that three Kampo medicines may be a new curative or preventive therapy for pre-eclampsia and TS is a candidate to have the usefull effect on therapy that both pre-eclamptic mothers and their fetuses.