

氏名(本籍)	竹井久人(広島県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第421号
学位授与年月日	平成20年12月22日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 有嶋和義 (副査) 浅利昌男 浅井史敏 山本雅子

論文内容の要旨

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、浮腫及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、新生児の罹病率及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、本態性高血圧及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、その病態生理学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、現在のところ母体及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、臨床及び動物実験において、プロスタサイクリン(PGI₂)の不足やトロンボキサンA₂(TXA₂)の増加の結果(PGI₂:TXA₂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・胎盤血流量の縮小及び胎盤梗塞によるものと考えられ、PGI₂/TXA₂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、PGI₂類似化合物及びTXA₂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、血液量及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^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を妊娠中に連続投与すると、高血圧、胎子発育遅延及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、正常妊婦及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、一般用医薬品及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、柴苓湯及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 β -エストロジオール、プロジェステロン及びテストステロン・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) 及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及び血漿中コレステロールを減少させ、蛋白尿の予防効果が報告されている (Abe, 1986)。防己黄耆湯は、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、防己黄耆湯は 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-prostaglandinF_{1 α} /thromboxaneB₂ 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、柴苓湯及び防己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、特に母体及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、高血圧及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及び 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及び

大脳皮質の厚さが減少するが、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及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日及び分娩後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及び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及び防已黄耆湯の影響を検討した。

柴苓湯及び防已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濃度の増加に起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。防已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濃度の増加及び血管収縮因子であるendothelin-1濃度の減少に起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の増加及びGH分泌の促進による胎子血糖値の増加の結果、胎子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及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、柴苓湯及び防已黄耆湯を処置した結果、当帰芍薬散は高血圧及びIUGRを、柴苓湯及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濃度の増加作用に起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、防已黄耆湯の抗高血圧作用は、血中 CGRP 濃度の増加及び endothelin-1 濃度の減少に起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 の増加及び 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、臨床における妊娠高血圧症候群の予防及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及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。

論文審査の結果の要旨

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、浮腫及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、新生児の罹病率及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、本態性高血圧及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、その病態生理学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 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、現在のところ母体及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、臨床及び動物実験において、プロスタサイクリン (PGI₂) の不足やトロンボキサン A₂ (TXA₂) の増加の結果 (PGI₂ : TXA₂ 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・胎盤血流量の縮小及び胎盤梗塞によるものと考えられ、PGI₂/TXA₂ 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、PGI₂ 類似化合物及び TXA₂ 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、血液量及び心拍出量を増加させ、血管抵抗の減少を減少させる。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^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を妊娠中に連続投与すると、高血圧、胎子発育遅延及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ている (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、正常妊婦及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、一般用医薬品及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、柴苓湯及び防已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 17β -エストロジオール、プロジェステロン及びテストステロン・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) 及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及び血漿中コレステロールを減少させ、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、柴苓湯及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、本研究は、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、特に母体及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をしている。本論文は、4章より構成されている。

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、高血圧及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。

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及び 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及び大脳皮質の厚さが減少するが、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を明らかにした。

第2章においては、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使用し、当帰芍薬散の抗高血圧作用及びその作用メカニズムや、血管作用因子について検討した。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。

その結果、当帰芍薬散は妊娠19日及び分娩後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及びendothelin-1の血中濃度に依存しないことなどを明らかにした。

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及び防已黄耆湯の影響を検討した。

その結果、柴苓湯及び防已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濃度の増加に起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。防已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濃度の増加及び血管収縮因子であるendothelin-1濃度の減少に起因することを示した。

第4章においては、この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。

その結果、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を初めて明らかにした。また、当帰芍薬散は、胎子下垂体のSomatotropeの増加及び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を示唆している。

これらの結果から、本研究においては、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及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、柴苓湯及び防已黄耆湯を処置した結果、当帰芍薬散は高血圧及びIUGRを、柴苓湯及び防已黄耆湯は高血圧をそれぞれ改善したことを明らかにした。また、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を示唆している。また、柴苓湯の抗高血圧作用は血中CGRP濃度の増加作用に起因することを示した。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。一方、防已黄耆湯の抗高血圧作用は、血中CGRP濃度の増加及びendothelin-1濃度の減少に起因することを示した。さらに、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の増加及び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を初めて明らかにした。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及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及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を証明した。

本研究で明らかとなった知見は、ヒト及び動物での妊娠高血圧症候群の治療に対して、大きく貢献するものであり、博士（獣医学）を授与するのに相応しい業績と判定した。