

ジピリディリウム系除草剤（ジクワット）の
胎子動脈管収縮作用機序に関する研究

2000

沈 明 浩

学位申請論文

ジピリディリウム系除草剤（ジクワット）の
胎子動脈管収縮作用機序に関する研究

沈 明浩

(2000年3月)

目 次

緒論	1
第1章 ジクワットの胎子動脈管への影響	
材料および方法	5
結果	7
考察	8
小括	8
第2章 ジクワット投与後の胎子動脈管収縮に対する エンドセリンレセプター拮抗薬の作用	
材料および方法	10
結果	11
考察	12
小括	13
第3章 ジクワットの胎子動脈管に対する作用 一妊娠末期母体副腎除去による影響一	
材料および方法	15
結果	17
考察	18
小括	19
第4章 妊娠末期の母体へのコルチコステロン投与による 胎子動脈管への影響	
材料および方法	22
結果	23
考察	24
小括	29

第5章 胎子動脈管における副腎皮質ホルモンレセプター

材料および方法	27
結果	29
考察	30
小括	30
総括	31
文献	34
謝辞	40
(図1～30)	

緒 論

ジピリディリウム系除草剤のジクワット（化学名;1,1'-ethylene-2,2'-bipyridylum dibromide、図-1）は1957年にイギリスのICI社で開発され、優れた除草効果を持つ農薬として日本を始め世界各国で使用されている。

また、ジクワット毒性については、以前からヒトや動物に対して強い毒性を示すことが知られており、動物種によって感受性に差があることも報告されている（Conning et al., 1969; Clark and Hurst., 1970; Kehara et al., 1968; Selypes et al., 1980; Ahmed et al., 1988）。動物へのジクワット毒性は、主に組織学的な変化を起こさず、致死の経過をとると言われている。しかし、一方ではジクワットは、胸腺、副腎および脾臓などに影響を与えることも報告されている（Clark and Hurst., 1970）。ヒトの中毒では、消化器系に影響を与え、高用量では肝細胞に影響を与えるとの報告もある（Conning et al., 1969）。

このように、ジクワットの毒性影響については多くの研究がなされているが、しかし発生・生殖毒性に関しては、少数の報告が見られるのみである（Kehara et al., 1968; Selypes et al., 1980; Ahmed et al., 1988）。また、ジクワットは、胎盤を通過し、胎子へ移行するものの、その胎子に対する毒性は、母体に対する毒性影響と比較すると弱いものであると報告されている（Bus et al., 1975）。

他方、発生・生殖毒性において胎子循環系とくに動脈管に対する化学物質等の影響は、生後しばしば重篤な循環障害を発生させることで注目されている。胎子は、栄養分や酸素を母体から胎盤を通して吸収しており、また、羊水中で生活しているため、肺は機能していない。

そのため、末梢から心臓へ送られた血液は肺を経由せず、生体で見られる循環とは異なる独自の循環系を持っている。胎子循環の特徴として、動脈管および卵円孔、臍動脈と臍静脈の存在、胎盤の存在の存在がある。

この中で動脈管は、肺動脈を直接大動脈へと結ぶ太いバイパスであり、胎生期においては重要な循環系の一翼を担っており、成体に見られない独特の血管である。この血管は、弾性線維に富む肺動脈や大動脈と異なり、極めて平滑筋に富む中膜を有する筋型動脈である (Hörnbland and Larsson, 1967; Desligneres and Larroch, 1970; Walsh et al., 1975)。

動脈管は妊娠末期に向かって徐々に内径を増し、出生後は肺呼吸の開始とともに収縮閉鎖する (Rudolph, 1974)。呼吸開始後、動脈管の収縮閉鎖に要する時間は、ヒトでは、10~15時間 (Rudolph, 1974)、ウサギでは、60分~90分 (Momma et al., 1981)、ラットでも60~90分 (Hörnbland and Larsson, 1967; Powell and Cochranne, 1978) と言われている。

動脈管は生後収縮し、時間の経過とともに動脈管索として遺残する。この動脈管が胎生期において何らかの影響を受けて一時的に収縮すると、生後に肺高血圧症を引き起こしたり、また、動脈管の収縮閉鎖が順調に行われななどの動脈管開存症も引き起こす (Rudolph, 1974)。

動脈管は、極めて特異な性質を持つ血管であると言われている。その一つとして、動脈管は血液中の PO_2 の変化に敏感に反応するといわれている (Dawes et al., 1955)。生後に動脈管が収縮を引き起こす誘因の一つとして、血液中の PO_2 の上昇が考えられている (Rudolph, 1974)。また、胎生期の特異的な性質の一つとして、胎

子の動脈管の拡張維持は、プロスタグランジンE₂の作用によって維持されている(Coceani and Olley, 1973;Sharpe and Larsson, 1975;Heyman et al.,1976;Clyman et al.,1978;Monma et al.,1980)。この動脈管の拡張維持作用は、プロスタグランジンの生合成を阻害する非ステロイド性の抗炎症薬であるインドメタシン等を投与することによって、胎子動脈管が収縮することで確かめられている(Kantrowitz et al.,1975;Hong and Levine,1976)。このように、インドメタシンを直接胎子へ、あるいは母体へ投与(胎盤を経由)すると、ヒツジ(Kirkpatrick et al.,1977;Levin et al.,1978;Clyman, 1980) およびウサギ(Shrape and Lasson,1975)でも動脈管が収縮することが報告されている。

ジクワットにおいても、妊娠末期のラット母体への投与が、胎子動脈管の収縮を引き起こすと報告されている。しかし、その収縮機序は、インドメタシンとは異なり、プロスタグランジンE₂を介したのではなく、強い血管収縮物質として知られているエンドセリンが関与していることを示唆した(Takagi,1999)。

しかしながら、このジクワットによるエンドセリンへの影響は、ジクワットの直接的なものか、あるいは間接的な作用であるかは明らかとされていない。

そこで、本研究では、ジクワットがどのようにエンドセリンに作用し、動脈管を収縮させるか作用機序の究明を行うことを目的とした。

第 1 章

ジクワットの胎子動脈管への影響

第 1 章

ジクワットの胎子動脈管への影響

第1章においては、妊娠末期の母体にジクワット（ジピリディリウム系除草剤）を皮下投与し、その胎子動脈管への影響を経時的に調べた。

材料および方法

1) 被験物質

本研究で用いたジクワット（diquat dibromide、純度99.7%）は（図-1）、ゼネカ（株）より供与されたものを用い、生理的食塩水にて1%の濃度に調製したものを投与液とした。

2) 使用動物および飼育条件

本研究で用いた動物は、Wistarラットで日本クレア（株）から購入した。交配時には12～15週齢に達した未交配の雌を用いた。

ラットの飼育は、室温20～24℃、湿度45～65%に設定された、一定の明暗周期のセミバリアー動物室で行った。市販の固形飼料（MR Breeder）および水道水を自由に摂取させた。交配時には雌雄を一晚同居させ、翌朝膈垢中に精子の存在を確認されたものを妊娠0日（胎齢0日）とし、その後は一匹ずつケージに入れて飼育した。

3) 実験方法

妊娠21日目のラットを用いた。妊娠21日目の午後1時を剖検時間と定め、剖検時間の1、3、6および24時間前に、ジクワットを7 mg/kg（体重）の用量で母体に皮下投与した。使用した妊娠母体は、各群4匹ずつとした。

剖検の際、冷却器（タイテック（株）Coolpipe 200D）により $-45\sim-50$ ℃に調節したアセトンを用意した。胎子は、母体を断頭放血し、直ちに子宮を切開して取り出し速やかに冷アセトンに投入し、全身を急速凍結した。凍結後、胎子の体重を測定し、同腹の胎子のうち同大のもの4匹を選び観察まで -20 ℃の冷凍庫に保存した。

4) 動脈管の観察方法

動脈管の観察にあたり、動脈管が水平面に対してほぼ垂直になるようにするため、胸腔内での動脈管と胸椎および肋骨との位置的關係を検討した。

妊娠20日の母ラットから得た胎子をブアン固定し、その胸部を常法に従ってアルコール脱水、パラプラスト（Sherwood Medical）包埋、 $5\mu\text{m}$ 連続切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した（図-2）。この連続切片をコンピューター画像解析システムTRI（ラトック・システムエンジニアリング（株））を用いて三次元立体構築を行った。まず、やや斜め前方より胸椎、肋骨および心臓の位置を確認した（図-3）。その像を回転させて左から見た三次元像とし（図-4）、その後、肋骨および胸椎を70%透過させ、動脈管、胸骨および胸椎の三次元的な關係を確認した（図-5）。すなわち、動脈管が水平面に対してほぼ垂直になるような角度を確認した（図-6）。

全身凍結による動脈管の観察方法は次の通りである。

観察に際して、急速凍結した胎子（図-7）の頭部および胸骨剣状軟骨部より後方の部分を割断して除去した。残りの胸部は、画像解析システムによって確認した角度になるように、頭方をやや高くして、簡易凍結器（小松エレクトロニクス（株））の凍結台上に背面を上にして載せ、胴体の下に水滴を入れて調節固定した（図-8）。

切りだし方は以下の通りである。

胎子の背面を水平にわずかに切り削ぐと胸椎が白く見え、左右に肋骨があり、さらに切り進めて行くと、中央に胸大動脈が見えてくる（図一9、10）。さらに切り進めて行くと、中央に食道が出現し、食道を削っていくと大動脈と肺動脈の分岐部が認められ、ついには動脈管と大動脈に分離する。動脈管が大動脈から完全に分離し、動脈管の内径が最小となったところの内径を、実体顕微鏡の接眼レンズ内に挿入したマイクロメーターで計測した（図一11）。

5) 統計学的解析方法

得られたデータは、各群ごとに平均値を算出し、Studentのt検定による統計学的解析を行った。

結 果

本章で得られたすべての実験結果は図一12に示した。

ジクワット 7mg/kg 投与群においては、投与後3および6時間に対照群と比べて有意な動脈管の収縮が認められた。また、この収縮は投与後3時間と6時間で比べると、投与後3時間の方がより強い収縮であった。しかし、投与後1および24時間では、動脈管の収縮は認められなかった。

実体顕微鏡下での観察では、7mg/kg投与群の動脈管の内径は、対照群の動脈管（図一13）に比べ、約半分近くまで小さくなっており、動脈管壁は厚くなっていた（図一14）。しかし、投与後1および24時間では、動脈管の収縮は観察されなかった。

考 察

妊娠21日のラットにジクワット7 mg/kg の用量を投与し、その胎子動脈管内径の変化を経時的に調べた。

その結果、7 mg/kg 投与群においては、投与後3時間において最も著しく収縮し、また、6時間においても収縮していたが3時間と比べるとその内径は大きくなっており、これは収縮後の再拡張の段階であると思われた。投与後24時間において、対照群との間に有意な差がみられなかったのは、動脈管は一度収縮した後、再び徐々に拡張し元の状態まで回復したものであると思われた。これらの結果は、Takagi (1999) の実験結果と類似していた。

以上の結果より、ジクワット(7mg/kg)を妊娠末期の母体に投与すると、その子の動脈管の収縮を引き起こすことが示唆された。

小 括

本章では、ジクワット7mg/kg投与による胎子動脈管への影響を経時的に調べた。

その結果、妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、その1、3、6および24時間前に妊娠ラットにジクワットを7mg/kgの用量で皮下投与し、その胎子動脈管の内径を経時的に測定した。

7mg/kg 投与群では投与後3および6時間に有意な収縮がみられた。また、その動脈管の収縮は、投与24時間以内に一度収縮した後、再び徐々に拡張し元の状態まで回復したものであると思われた。

これらの結果から、ジクワット (7mg/kg) は妊娠末期のラット胎子の動脈管に対して収縮作用を持つことが示唆された。

第 2 章

ジクワット投与後の動脈管収縮作用に及ぼす
エンドセリンレセプター拮抗薬の作用時期の
検討

第 2 章

ジクワット投与後の動脈管収縮作用に及ぼす エンドセリンレセプター拮抗薬の作用時期の検討

ジクワットによる動脈管の収縮は、インドメタシンに代表される抗炎症薬の場合と異なり、プロスタグランジンE₂を介したのではなく、エンドセリンが関与していることが報告されている (Takagi, 1999)。

そこで本章においては、実際にエンドセリンが動脈管の収縮に関係があるのかを別の方法で再検討を行った。まず、母体にジクワットを投与し、その後、非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬 (TAK-044) を時間の経過とともに直接胎子に投与し、その胎子の動脈管の変化を経時的に検討した。

材料および方法

1) 被験物質

使用したジクワットは第1章に記したのと同じものである。

TAK-044 (化学名 Cyclo [D- α -aspartyl-3- [(4-phenylpiperazin-1-yl) carbonyl] -L- α -aspartyl-D-2- (2-thienyl) glycyl-L-leucyl-D-tryptophyl] disodium salt; 図-15) は武田薬品工業 (株) より供与されたものを用いた。

2) 使用した動物および飼育条件

使用した動物および飼育条件は第1章に記したのと同じものである。

3) 実験方法

妊娠21日目のラットを用いた。剖検時間は午後1時とし、母体へのジクワ

ット投与は、剖検の3時間前に、7 mg/kg の用量で母体に皮下投与した。

非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬 (TAK-044) は、ジクワットの投与、1、2および2.5時間後に母体をエーテル麻酔下で開腹し、子宮壁を通して胎子背部皮下に直接投与した。使用した妊娠母体は各群4匹とした。TAK-044および生理的食塩水を投与した胎子は各々3匹ずつとした。投与量は、1胎子当たり、0.05mg/0.05mlとした。生理的食塩水投与群は、同量の0.9%生理的食塩水を投与した。

また、母体および胎子に何も処置しない無処置対照群も準備した。

剖検後の処置は第1章と同様であった。

4) 動脈管の観察方法

第1章で述べた急速全身凍結法を用いて動脈管の観察を行った。

5) 統計学的解析方法

得られたデータは、各群ごとに平均値を算出し、Duncan の多重比較検定による統計学的解析を行った。

結 果

すべての実験結果は図-16、17および18に示した。

ジクワット投与後、3時間目の剖検において、無処置胎子および生理的食塩水を投与した胎子の動脈管は、無処置対照群の動脈管と比べ有意に収縮していた (図-16、17および18)。

一方、母体へのジクワット投与後1および2時間目に、胎子に直接TAK-044を投与した胎子動脈管は、その2および1時間後の剖検において、無処置対照

群の動脈管とほぼ同じ大きさであり、有意な収縮はみられなかった（図-16 および17）。

しかしながら、母体にジクワットを投与後2.5時間目にTAK-044を投与した胎子の動脈管は、その30分後の剖検において、無処置対照群の動脈管に比べ無処置胎子および生理的食塩水を投与した胎子と同様に有意な収縮が認められた（図-18）。

考 察

エンドセリンは1988年に、Yanagisawaら（Yanagisawa et al., 1988）によってブタの血管内皮細胞培養液上清から、初めて単離精製されたペプチドで、21残基のアミノ酸からなり（Masaki et al., 1992）、既知の血管内皮由来の血管収縮物質の中で最も強力で持続の長い収縮作用を持っている。エンドセリンには3種類のET-1、ET-2 およびET-3が確認されており（Yanagisawa et al., 1988; Inoue et al., 1989）、ET-1は血管内皮細胞だけでなく、他の広範な組織でも生産され、ET-2やET-3についても僅かではあるが多くの組織で生産されている（矢崎、1992）。また、エンドセリンの持つ血管および血管以外の平滑筋収縮作用、平滑筋増殖作用なども報告されている（Arai et al., 1990）。一方、これらのエンドセリンが作用する受容体についても、現在までETA および ETBの存在が明らかにされている（Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990; Masaki et al., 1992）。

本研究で用いたTAK-044は、非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬の一つであり、ETAとETBの両方の receptor を阻害することができる（Watanabe et al., 1995）。

本章で実施した実験において、ジクワット投与後に非選択的

ETA/ETB receptor 拮抗薬TAK-044を投与し、ETAおよびETB両方のET receptor を遮断すると、ジクワット投与1および2時間後にTAK-044を投与した胎子では、動脈管の収縮は認められなかった。しかし、ジクワット投与2.5時間後にTAK-044を投与した胎子では、動脈管の収縮が認められた。

これらの結果は、ジクワット投与により、何らかの作用機序を経てエンドセリンが放出され、最低でもジクワット投与2時間目以降に動脈管の収縮が引き起こされるものと推察される。

小 括

ジクワットの動脈管収縮作用に対するET receptor 拮抗薬 (TAK-044) の影響を検討するために、妊娠 21 日の午後 1 時を剖検時間と定め、剖検 3 時間前に母体にジクワット 7 mg/kg を皮下投与し、その1、2および2.5時間後に、1 胎子あたり TAK-044 を 0.05 mg 直接胎子に皮下投与し、その胎子動脈管の内径を経時的に測定した。

その結果、ジクワットを投与した母体から得られた無処置胎子および生理的食塩水を投与した胎子では、無処置対照群と比べて生理的食塩水の投与時期に関係なく、動脈管の有意な収縮が認められた。

ジクワット投与1および2時間後にTAK-044を投与した胎子では、動脈管の収縮は認められなかった。しかし、ジクワット投与後2.5時間目にTAK-044を投与した胎子では、動脈管の収縮が認められた。

これらの結果から、ジクワット投与により、何らかの作用機序を経てエンドセリンが放出され、最低でもジクワット投与2時間目以降に動脈管の収縮が引き起こされるものと推察される。

第 3 章

ジクワットの胎子動脈管に対する作用 —妊娠母体副腎除去による影響—

第 3 章

ジクワットの胎子動脈管に対する作用

—妊娠母体副腎除去による影響—

第2章で述べたとおり、ジクワットは胎子動脈管収縮作用をもち、この収縮は、エンドセリンが関与していることが再確認された。しかし、このジクワットは、エンドセリンの分泌に対して、どのように作用しているのかは明らかとされていない。一方、ジクワットは、ラットに対する作用の一つとして、成熟ラットの副腎皮質ホルモンの分泌を特異的に刺激することが報告されている (Helen et al., 1976)。また、副腎皮質ホルモンは、in vitroの実験でラット、ウサギおよびウシの一般的な血管（大動脈）からのエンドセリン放出を増加させることも報告されている (Kanase et al., 1991)。

そこで、本章においては、母体にジクワットを投与し、その時の母体および胎子の副腎皮質ホルモンの動態を測定し、ジクワットと副腎皮質ホルモン分泌との相互関係を検討した。

材料および方法

1) 被検物質

使用したジクワットは第1章に記したものと同一である。

2) 使用した動物および飼育条件

使用した動物および飼育条件は第1章に記したものと同一のものである。

3) 実験方法

動物は、Wistarラットを用いた。

両側の母体副腎除去は、妊娠19日目の午後1時にエーテル麻酔下で行った。副腎を除去した全てのラットには、飲料水の代わりに、0.9%生理的食塩水を与えた。

剖検は妊娠21日の午後1時とし、母体へのジクワット投与は、剖検の3時間前に 7mg/kgの用量で皮下投与した。また、対照群には生理的食塩水のみを投与した母体の胎子を用いた。

その後、胎子動脈管および母体と胎子のコルチコステロン濃度を測定した。

使用した母体は、各群 5匹ずつとした。

4) 動脈管の観察方法

第1章で述べた急速全身凍結法を用いて動脈管の観察を行った。

5) 血液の採取方法

母体の血清の採取は、母体を断頭し、素早く開腹し、腹大動脈より採取した。採取した血液は、3000回転、15分間遠心分離し、血清を採取した。血清は コルチコステロン濃度の測定まで、 -80°C のディープフリーザーにて凍結保存した。

胎子の血漿の採取は、母体の血液を採取した後に、帝王切開により胎子を取り出した。取り出した胎子を断頭し、ヘパリン処理したヘマトクリット管にて採血をした。採取した血液は、12000回転、5分間遠心分離し、血漿を採取した。血漿は、母体の血清と同様に凍結保存した。

1胎子より、1サンプル分の血漿を得た。

6) 血中コルチコステロン濃度の測定方法

コルチコステロン濃度の測定はRat Corticosterone [¹²⁵I] assay system (Amersham) を用いて測定した。

7) 統計学的解析方法

得られたデータは、各群ごとに平均値を算出し、Duncan の多重比較検定による統計学的解析を行った。

結 果

・母体副腎除去後のジクワット投与による胎子動脈管への影響

すべての実験結果は図-19に示した。

無処置母体へジクワット7mg/kg投与した時の胎子動脈管は、無処置対照群に比べ有意な収縮が認められた。

母体の副腎を除去した胎子の動脈管は、無処置対照群との間に差は認められなかった。

また、母体副腎除去後にジクワットを投与した群の胎子動脈管は、ジクワット投与による影響は見られず、無処置対照群と比べて有意な収縮は認められなかった。

・母体副腎除去後のジクワット投与による母体血清コルチコステロン濃度への影響

すべての実験結果は図-20に示した。

ジクワット7mg/kg投与した時の、母体のコルチコステロン濃度は、無

処置対照群に比べ、有意な増加が認められた。

母体副腎除去群および母体副腎除去後にジクワットを投与した母体のコルチコステロン濃度は、無処置対照群に比べ有意に減少した。

・母体副腎除去後のジクワットによる胎子のコルチコステロン濃度への影響

すべての実験結果は図-21に示した。

母体にジクワット7mg/kg投与したときの胎子のコルチコステロン濃度は、無処置対照群に比べ、有意な増加が認められた。

しかし、母体副腎除去群では、胎子のコルチコステロン濃度は、無処置対照群との間に差は認められなかった。

また、母体副腎除去後にジクワットを投与した群の胎子のコルチコステロン濃度も、無処置対照群との間に差は認められなかった。

考 察

本章では、母体の副腎を除去した後にジクワットを投与した時の胎子動脈管に対する影響について検討した。

その結果、無処置の母体にジクワットを投与した胎子のみが動脈管の収縮が認められた。また、同群の母体と胎子のコルチコステロン濃度のみが、無処置対照群に比べ有意に増加した。

しかし、副腎を除去した母体の胎子では、ジクワットの投与に関わらず動脈管の収縮は認められなかった。

このことは、ジクワットによる動脈管収縮と母体および胎子の副腎との間には何らかの関係があると思われた。

一方、ジクワットの作用の一つとして、成熟ラットの副腎皮質ホルモンの

分泌を刺激することが報告されている (Helen et al., 1976)。その作用機序は、ジクワットが副腎に特異的に作用し、副腎でのACTHに対する感受性を高め、その結果、副腎皮質ホルモンを多量に分泌させると報告している (Helen et al., 1976)。

他方、副腎皮質ホルモンは、in vitroの実験でラット、ウサギおよびウシの一般的な血管 (大動脈) からのエンドセリン放出を増加させること (Kanase et al., 1991)、また、in vivoの実験にて、副腎皮質ホルモンが血漿エンドセリン濃度を増加させることも報告されている (Takahashi et al., 1991)。

また、ラットの妊娠末期の母体の副腎皮質ホルモンは、胎盤を通過すると言われている (Dupouy et al., 1975; Kamon, 1970; Zarrow et al., 1970; Arishima et al., 1977)。

これらのことから、妊娠母体にジクワットを投与すると、母体に高い副腎皮質ホルモンの分泌を促し、それが胎盤を通過し、胎子動脈管の収縮に何らかの関与をしたことが示唆された。

小 括

本章では、妊娠21日目の母体の副腎を除去した後にジクワットを投与し、ジクワットによる動脈管の収縮と副腎皮質ホルモンとの関係を調べた。

その結果、無処置の母体にジクワットを投与した胎子のみが動脈管の収縮が認められた。また、同群の母体と胎子のコルチコステロン濃度のみが、無処置対照群に比べ有意に増加した。

しかし、副腎を除去した母体の胎子では、ジクワットの投与に関わらず動脈管の収縮は認められなかった。

これらの結果から、ジクワットによる胎子動脈管の収縮は、この母体側の

高い副腎皮質ホルモンが、胎盤を通過し、何らかの関与をしたことが示唆された。

第 4 章

妊娠末期の母体へのコルチコステロン 投与による胎子動脈管への影響

第 4 章

妊娠末期の母体へのコルチコステロン

投与による胎児動脈管への影響

第3章においてジクワットによる胎児動脈管の収縮には母体の副腎皮質ホルモンが関与していることを示した。

副腎皮質ホルモンによる動脈管の収縮に関する研究は、グルココルチコイドの中でもベタメタゾン、ヒドロコルチゾールおよびプレドニゾロンによる報告のみである (Momma et al., 1981)。しかしながら、ラットにおける副腎皮質ホルモンは、コルチコステロンが主である。また、直接コルチコステロンを投与して動脈管への影響を観察した報告はされていない。

本研究では、実際に妊娠末期の各日齢の母体にコルチコステロンを投与し、その胎児動脈管の収縮に対する臨界期の検討を行った。

材料および方法

1) 被検物質

本研究で用いたコルチコステロンは、SIGMA (株) より購入したものを、ゴマ油にて1%の濃度に調製したものを投与液とした。

2) 使用した動物および飼育条件

使用した動物および飼育条件は第1章に記したものと同一のものである。

3) 実験方法

動物は妊娠19日、20日および21日目のWistarラットを用いた。剖検時間は午後1時とし、投与群はその3時間前にコルチコステロン40mg/kgおよび80mg/kgの割合で母体の皮下に投与した。対照群には生理的食塩水のみを投与した胎子を用いた。

使用した母体は各群5匹ずつとした。

4) 動脈管の観察方法

第1章で述べた急速全身凍結法を用いて動脈管の観察を行った。

5) 統計学的解析方法

得られたデータは、各群ごとに平均値を算出し、Studentのt検定による統計学的解析を行った。

結 果

すべての実験結果は図-22および23に示した。

妊娠19日から21日にの対照群の胎子動脈管の内径は、日齢が進むにつれ徐々に大きくなっていった（図-22および23）。

コルチコステロン40mg/kg投与群においては、妊娠20日および21の動脈管の内径は無処置対照群に比べて有意に収縮していた（図-22）。しかしながら、妊娠19日においては、コルチコステロン投与群と無処置対照群との間に有意な差はみられなかった（図-22）。

コルチコステロン80mg/kg投与群においては、妊娠21日の動脈管の内径は、無処置対照群と比べて顕著に収縮していた。一方、妊娠20日においても無処置対照群との間に有意な収縮が認められたが、妊娠21日ほど顕著な収縮は見

られなかった（図-23）。しかしながら、コルチコステロン40mg/kg投与群と同様に、妊娠19日の動脈管は、コルチコステロンを投与しても有意な収縮は認められなかった（図-23）。

考 察

本章では、妊娠末期の母体にコルチコステロンを投与したときの、その胎子の動脈管への影響を検討した。

その結果、妊娠20日および21日の母体にコルチコステロンを投与した胎子では、動脈管に収縮が認められた。しかし、妊娠19日目の母体にコルチコステロンを投与した胎子の動脈管に収縮は認められなかった。また、その収縮の程度は、用量依存的であった。

以上のことより、妊娠末期のラットの母体にコルチコステロンを投与すると、その胎子の動脈管に収縮が認められた。また、その収縮の臨界期は、妊娠母体にジクワットを投与したときと同様な結果であった（Takagi,1999）。つまり、ジクワットを投与したときの動脈管の収縮の臨界期とコルチコステロンを投与したときの臨界期は、全く同一で、妊娠20日以降であった。また、第2章で述べたように、エンドセリンが動脈管の収縮に関与していることを示唆している。一方、副腎皮質ホルモンはエンドセリンの放出を増加させることも報告されている（Kanase et al., 1991）。

これらのことから、投与したコルチコステロンが胎子動脈管の内皮細胞に作用し、エンドセリンの放出を促し、それによって動脈管の収縮が引き起こされたものと示唆された。

また、妊娠19日の母体にコルチコステロンを投与しても、動脈管の収縮が引き起こされなかったのは、エンドセリンの分泌が促されなかったためであ

ろうと示唆された。

小 括

本章では、実際に母体で増加した副腎皮質ホルモンが、胎子動脈管の収縮作用をもつか調べた。

その結果、母体へのコルチコステロン投与により胎子動脈管の収縮が認められた。また、その収縮の臨界期はジクワットと同様に胎齢20日以降であった。

これらのことより、コルチコステロンが胎子動脈管の内皮細胞に作用し、エンドセリンの放出を促し、それによって動脈管の収縮を引き起こされたものと示唆された。

また、妊娠19日でコルチコステロン投与による動脈管の収縮が引き起こされなかったのは、エンドセリンの分泌を促さなかったためであろうと示唆された。

第 5 章

胎子動脈管における 副腎皮質ホルモンレセプター

第 5 章

胎児動脈管における 副腎皮質ホルモンレセプター

第4章でグルココルチコイド（コルチコステロン）が動脈管の収縮に関与していることを示唆した。そこで本章では、動脈管の内皮細胞におけるグルココルチコイドレセプターの存在の有無および局在性をWestern blot法および免疫組織学的方法を用いて検討を行った。

材料および方法

1) 使用した動物および飼育条件

使用した動物および飼育条件は第1章に記したものと同一のものである。

2) 実験方法

Western blot法で測定したものは、妊娠21日のラット胎児を用いた。妊娠母体15匹とし、その子120胎児の動脈管と大動脈を集めて用いた。

また、免疫組織学的観察は、妊娠19、20および21日のラット胎児を用いた。

剖検時間は全て午後1時とした。

3) グルココルチコイドレセプタータンパクの抽出

剖検後、直ちに胎児より動脈管と大動脈を取り出し、同腹の胎児の動脈管と大動脈を別々プールし、タンパク抽出まで -80°C で保存した。同様に母体肝臓を取り出し -80°C で保存した。

胎子動脈管、大動脈および母体肝臓からのグルココルチコイドレセプタータンパクを抽出する方法は、O'Donnellら（1995）の方法に従った。グルココルチコイドレセプタータンパクの分子量は、約97kDaと報告されている。

凍結組織は5倍量の抽出液（20mM Tris、1mM DETA、10mM sodium molybdate、10% glycerol、1mM dithiothreitol）を用いて、テフロン・ホモジナイザーで抽出した。組織抽出液は、オプテイマTL超遠心器（Beckman）によって2℃、105,000gで45分間遠心し、上清を集め使用時まで-80℃で保存した。

4) Western blot法

電気泳動は、Laemmli（1970）の方法に従って、7.5%ポリアクリルゲル(Bio Rad)を用いて行った。泳動は、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む0.05M Tris-0.192M glycine buffer, pH8.3を用いて行った。試料は、泳動用調整液（0.125M Tris-HCl, 20% glycerol, 4% SDS, 0.005% bromophenol blue, 5% mercaptoethanol）を用いてタンパク含量100 μ gになるように調整した。泳動用試料を作成した後、100℃で1分間熱処理した。電気泳動は、100Vで約100分間行った。タンパク質の定量はLowleyら（1951）の方法で定量した。

電気泳動後のポリアクリルアミドゲルのタンパク質は、Towbinら（1979）の方法に従って、ニトロセルロース膜（Bio Rad）に転写した。転写用緩衝液として、20%メタノールを含む0.05M Tris-0.192M glycine bufferを用いた。転写は100Vで60分間行った。

転写したニトロセルロース膜上のタンパク質を同定するため、抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いてイムノブロットを行った。ブロッキング血清として5%スキム・ミルク液に反応させた後、モノクローナル抗体グルココルチコイドレセプター抗体（BuGR2:Affinity Bioreagent,INC）と3時間反応させた。次いで二次抗体としてマウス・ビオチン化IgG（フナコシ）を1時間反応させた後、常法にしたがってABC反応（ペクタステインABCキットフナコシ）を行った。

5) グルココルチコイドレセプターの免疫組織学的観察

先ずはじめにそれぞれの胎子から動脈管を含む心臓および心血管系を取り出し、ブアン液に入れ、固定した。固定後、常法に従いアルコール脱水し、パラフィン包埋を施した。その後、ミクロトームを用い5 μ mに薄切した。

切片は抗グルココルチコイドレセプターポリクローナル（#57:Affinity Bioreagent, INC）抗体を用いて、酵素抗体ABC法を施し、光学顕微鏡下で観察した。

結 果

・胎子動脈管でのグルココルチコイドレセプターのWestern Blot法

すべての実験結果は図-24に示した。

妊娠21日の母体ラットの肝臓は、約97kDaのグルココルチコイドレセプタータンパクバンドを示した。また、同様に妊娠21日の胎子動脈管および大動脈にも、グルココルチコイドレセプターの存在が認められた。

・胎子動脈管でのグルココルチコイドレセプターの免疫組織学的観察

それぞれの妊娠日齢のH・E染色像は図-25、27および29に示した。

妊娠19日の動脈管では、グルココルチコイドレセプターは免疫組織化学的に検出できなかった（図-26）。

妊娠20日の動脈管では、グルココルチコイドレセプター陽性反応（矢印）が内皮細胞で認められた（図-28）。

妊娠21日の動脈管は、陽性反応が妊娠20日よりも強く認められた。また、内皮細胞のほとんどの核にグルココルチコイドレセプター陽性反応（矢印）が認められた（図-30）。

考 察

第4章でグルココルチコイド（コルチコステロン）が動脈管の収縮に関与していることを示唆した。そこで本章では、動脈管の内皮細胞におけるグルココルチコイドレセプターの存在の有無および局在性をWestern blot法および免疫組織学的方法を用いて検討を行った。その結果、妊娠21日の胎子動脈管にグルココルチコイドレセプターの存在を示唆した。また、免疫組織学的観察において、胎齢20日および21日では、胎子動脈管の内皮細胞にグルココルチコイドレセプターが確認された。しかし、胎齢19日の胎子動脈管にグルココルチコイドレセプターが認められなかった。

したがって、妊娠21日の胎子の動脈管内皮細胞に、グルココルチコイドレセプターが存在することから、ジクワット投与による動脈管の収縮は、そのジクワットが母体の副腎皮質ホルモンの分泌を引き起こし、それが胎盤を通過して動脈管内皮細胞に作用してエンドセリンの分泌を促すことにより、引き起こされるものと示唆された。

小 括

本章では、コルチコステロンによる動脈管の収縮が直接的な作用なのか、間接的な作用なのかも検討するため、動脈管でのグルココルチコイドレセプターの局在の検討を行った。

その結果、グルココルチコイドレセプターが胎子動脈管の内皮細胞に局在することが認められた。

これらの結果から、ジクワット投与による動脈管の収縮は、ジクワットにより引き起こされた母体の高い副腎皮質ホルモンが胎子へ移行し、動脈管の内皮細胞に作用してエンドセリンの分泌を促したためであろうと示唆された。

総 括

本論文は、ジピリディリウム系除草剤であるジクワットが、どのようにエンドセリンに作用し、動脈管を収縮させるのかの、作用経路の検討を行った。

第1章では、ジクワットの胎子動脈管に対する作用を検討するために、妊娠21日のラットにジクワットを7 mg/kgの用量で皮下投与し、その後の胎子動脈管内径の変化を経時的に検討を行った。その結果、投与後3 および6 時間に有意な動脈管の収縮がみられた。しかし、投与後1 および24時間においては、対照群との間に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、ジクワット（7 mg/kg）は妊娠末期のラット胎子動脈管に対して収縮作用を持つことが示唆された。

第2章では、ジクワットの動脈管収縮作用に対するET receptor 拮抗薬（TAK-044）の影響を検討するために、妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検3時間前に母体にジクワットを皮下投与し、その1、2 および2.5 時間後に、直接胎子にTAK-044を皮下投与し、動脈管への影響の検討を行った。その結果、ジクワット投与1 および2 時間後にTAK-044を投与した胎子は、動脈管の収縮は認められなかった。しかし、ジクワット投与後2.5 時間目にTAK-044を投与した胎子では、動脈管の収縮が認められた。

これらの結果からジクワットを投与することにより、何らかの作用機序を経てエンドセリンが放出され、最低でもジクワット投与2時間目以降に動脈管の収縮が引き起こされるが示唆された。

第3章では、ジクワットが特異的に作用する副腎、特に副腎皮質ホルモンに注目し、ジクワットによる動脈管収縮と副腎皮質ホルモンとの関係の検討を行った。その結果、母体副腎除去後にジクワットを投与した胎子の動脈管

の収縮は、認められなかった。また、ジクワットが母体コルチコステロンの著しい増加を導いていた。

これらの結果から、妊娠末期において、母体および胎子の副腎皮質ホルモンは、胎盤を通過することにより、ジクワットによる胎子動脈管の収縮は、この母体側の高い副腎皮質ホルモンと、何らかの関係があることが示唆された。

第4章では、実際に母体に副腎皮質ホルモン（コルチコステロン）を投与し、その胎子動脈管の収縮作用をもつかの検討を行った。その結果、母体へのコルチコステロン投与により胎子動脈管の収縮が認められた。また、その収縮の臨界期はジクワットと同様に胎齢20日以降であった。

これらの結果から、母体に投与したコルチコステロンは、動脈管の収縮を引き起こすことが示唆された。

第5章では、第4章でグルココルチコイド（コルチコステロン）が動脈管の収縮に関与していることを示唆した。そこで本章では、動脈管の内皮細胞におけるグルココルチコイドレセプターの存在の有無および局在性をWestern blot法および免疫組織学的方法を用いて検討を行った。その結果、Western blot法において、妊娠21日の胎子動脈管にグルココルチコイドレセプターが確認できた。また、免疫組織学的観察において、胎齢19日の胎子動脈管にグルココルチコイドレセプターが認められなかった。しかし、胎齢20日および21日では、胎子動脈管の内皮細胞にグルココルチコイドレセプターが確認された。

これらの結果から、動脈管内皮細胞中には、グルココルチコイドレセプターが存在していることが示唆された。

以上のことから本論文は、以下のことを示唆した。

- (1) 妊娠末期のラットにジクワットを投与すると、その胎子の動脈管の収縮を引き起こすこと。
- (2) ジクワットによる動脈管収縮に対して、血管収縮物質であるエンドセリンが関与していること。
- (3) ジクワットによる動脈管の収縮は、母体からの副腎皮質ホルモンが関与していること。
- (4) コルチコステロンは動脈管収縮作用をもつこと。
- (5) その収縮は動脈管内皮細胞中のグルココルチコイドレセプターが関与すること。

また、(1)～(5)により、妊娠母体に投与されたジクワットは、多量の母体副腎皮質ホルモンの分泌を促し、それが胎盤を通過して動脈管の内皮細胞に作用しエンドセリンの分泌を促し、その結果、動脈管の収縮を引き起こすものと示唆された。

参考文献

1. Ahmed,A.A., Soliman,M.M., Khalifa,B.A.A., Eisadek,S.E., and Nounou,A.H.
Embryocidal and teratogenic of paraquat of chick embryos and white rats.
Arch.Exper.Vet.Med.,42:848-853,1988.
2. Arai,H., Hori,S., Aramori,I., Ohkubo,H. and Nakanishi,S.
Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.
Nature. 348:730-732,1990.
3. Arishima,K., Nakama,S., Morikawa,Y., Hashimoto,Y., and Eguchi,Y.
Maternal-foetal interrelations of plasma corticosterone concentrations at the end of gestation in the rat.
J. Endocr. 72:239-240,1977.
4. Bus,J.S., Preache,M.M., Cagen,S.Z., Posner,H.S., Eliason, B.C., Sharp ,C.W. and Gibson,J.E.
Fetal toxicity and distribution of paraquat and diquat in mice and rats.
Toxicol.Appl.Pharmacol.33:450-460,1975.
5. Clark,D.G. and Hurst,E.W.
The toxicity of diquat.
Brit.J.Ind.Med. 27:51-55,1970.
6. Clyman,R.I., Manuary,F., Roman,C., and Pudolph, A.M.
PGE₂ is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI₂ or 6 keto PGF₁.
Prostaglandins 16: 259-264,1978.
7. Clyman,R.I.
Ductus arteriosus: developmental response to endogenous prostaglandins, oxygen, and indomethacins.
In Samnelsson,B., Ramwell,P.W., and Paoletti,R. (editors)
:Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research. Vol.6,
Raven press, New york,p.887,1980.

8. Conning,D.G., Fletcher,K. and Swan,A.A.B.
Paraquat and related bipyridyls.
Brit.Med.Bull. 25:245-249,1969.
9. Coceani,F. and Olley,P.M.
The response of the ductus arteriosus to prostaglandins.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 51:220-225,1973.
10. Dawes,G.S., Mott,J.C., Widdicombe,J.G.
The patency of the ductus arteriosus in newborn lambs and its
physiological consequences.
J.Physiol. 128:361-383,1955.
11. Desligneres,S. and Larroche,J.C.
Ductus arteriosus. I . Anatomical study of its development during the
second half of gestation and its closure after birth. II .Histological
study of a few cases of patent ductus arteriosus in infancy.
Biol.Neonate. 16:278,1970.
12. Dupouy,J.P., Coffingy,H. and Magre,S.
Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rat.
J.Endocrinol.65:347-352,1975.
13. Helen,C.C., and Michael,S.R.
Early effects of dipuat on plasma corticosteroid concentrations in
rats.
Biochemical Pharmacology.25:2465-2468,1976.
14. Heyman,M.A., Rudolph,A.M., and Silverman,M.H.
Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of
prostaglandin synthesis.
NewEngl.J.Med. 295:530-533,1976.
15. Höng,S-C.L., and Lewis,I.
Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical
action of anti-inflammatory cortioid.
Proc.Natl.Acad.Sci. 73:1730-1736,1976.

16. Hörnblad,P.Y. and Larsson,K.S.
Studies on closure of the Ductus arterious I. Whole body freezing as improvent of fixation procedure.
Cardiologia 51:231-235,1967.
17. Inoue,A., Yanagisawa,M., Kimura,S., Miyauchi,T., Goto,K. and Masaki,T.
The human endothelin family:Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.
Proc.Natl.acad.Sci.USA. 86:2863-2867,1989.
18. Kanse,S.M., Takahashi,K., Warren,J.B., Ghatei,M. and Bloom,S.R.
Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells.
European Journal of Pharmacology, 199:99-101,1991.
19. Kamoun,A.
Activité cortico-surrénale au cours de la gestation, de la lactation et du développement pré et postnatal chez le rat.I.Concentration et cinétique de dispartion de la corticostérone.
J.Physiol,62:5-32,1970.
20. kantrowitz,F., Robinson,D.R., and McGuire,M.B.
Corticosteroids inhibit prostaglandin production by reumatoid synovia.
Nature 258:734-737,1975.
21. Kehera,K.S., Whitta,L.K. and Ciegg,D.J.
Embryopathic effects of diquat and paraquat on rats.
Ind.Med.surg. 37:257-261,1968.
22. Kirkpatrick,S.E., Printz,M.P., and Friedman,W.F.
Prostaglandins (PG'S) and the Fetal ductus arteriosus.
Pediat.Res. 11:394,1977.
23. Laemmli,U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.
Nature (Lond.) .227:680-685,1970.

24. Levin,D.L., Mills,L.J., Parkey,M., and Garriott,J.
Administration of indomethacin to the pregnant ewe:results in
constriction of
the fetal ductus arteriosus.
Pediatr.Res. 12:386,1978.
25. Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L. and Randall,R.J.
Protein measurement with the follin phenol reagent.
J.Biol.Chem.193:265-275,1951.
26. Masaki,T., Yanagisawa,M. and Goto,K.
Physiology and pharmacology of endothelins.
Med.Res.Rev. 12:391-421,1992.
27. Momma,K., Uemura,S., Nishihara,S., and Ota,Y.
Dilation of the ductus arteriosus by prostaglandins and prostaglandins
precursors.
Pediatr. Res. 14: 1074-1077,1980.
28. Momma,K., Nishihara,S., and Ota,Y.
Constriction of Fetal ductus arteriosus by glcocorticoid hormone.
Pediatr.Res.15:19-21,1981.
29. O'Donnell,D., Francis,D., Weaver,S. and Meaney,M.J.
Effects of adrenalectomy and coricosterone replacement on
glucocorticoid receptor level in rat brain tissue:a comparison between
western blotting and receptor binding assays.
Brain Res., 687:113-142,1995.
30. Powell,J.G. and Cochrane,R.L .
The effect of fenoprophen or indomethacin to rat dams during late
pregnancy, with special reference to the ductus arteriosus of the
fetuses and neonates.
Toxicol.Appl.Pharmacol 45:783-796,1978.
31. Rudolph,A.H.
Congenital discases of the heart.
Year Book Medical Publishers,Chicago. 1974.

32. Sakurai T., Yanagisawa,M., Takuwa,Y., Miyazaki,H., Kimura,S., Goto,K. and Masaki,T.
Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.
Nature. 348:732-735,1990.

33. Selypes,S.S., Nagymajtenyi,L. and Berencsi,G.
Mutagenic and embryotoxic effects of paraquat and diquat.
Bull.Environm.Contam.Toxicol.,25:513-57,1980.

34. Sharpe,G.L. and Larsson,K.S.
Studies on closure of the ductus arteriosus. X. In vivo effect of prostaglandin.
Prostaglandins 9:703-719,1975.

35. Takahashi,K., Suda,H., Lam.M.H-C., Ghatei,A. and Bloom,R.
Endothelin-like immunoreactivity in rat models of diabetes mellitus.
Journal of Endocrinology. 130:123-127,1991.

36. Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.76:4350-4354,1979.

37. Walsh,S.Z., Meyer,W.W. and Lind,J.
The human fetal and neonatal circulation.
Springfield.Thomas.1975.

38. Watanabe,T., Awane,Y., Ikeda,S, et al
Pharmacology of a non-selective ETA/ETB receptor antagonist,TAK-044 and the inhibition of myocardial infarct size in rats.
Br.J.Pharmacol. 114:949-954.1995.

39. Yanagisawa,M., Kurihara,H., Kimura,S., Tomobe,M., Kobayashi,M., Mitsui,Y., Yazaki,Y., Goto,K., and Mazaki,T.
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelin cells.
Nature.332:411-415,1988.

40. Zarrow,M.X., Philott,J.E. and Deneberg,V.H.
Corticosterone passes from mother to young through placenta.
Nature (Lond) ,226:1058-1059,1970.
41. 矢崎義雄
循環調節ペプチドと関連疾患 <羊土社> ,1992
42. 高木博隆 (Takagi,H.)
ジピリディリウム系除草剤 (ジクワット) の胎子毒性について
—胎子動脈管に対する影響—<博士学位論文>1999

謝 辞

本研究は、麻布大学獣医学部比較毒性学研究室教授政岡俊夫博士、薬理学研究室教授赤堀文昭博士ならびに解剖学第二研究室教授有嶋和義博士の御鞭撻と御指導の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、絶えざる御指導を賜りました解剖学第二研究室助教授山本雅子博士、比較毒性学研究室助教授和久井信博士ならびに薬理学研究室助教授白井明志博士に哀心から感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたって多大な御協力と御指導をいただきました麻布大学比較毒性学研究室および解剖学第二研究室的の教室員の皆様に心から謝意を表します。

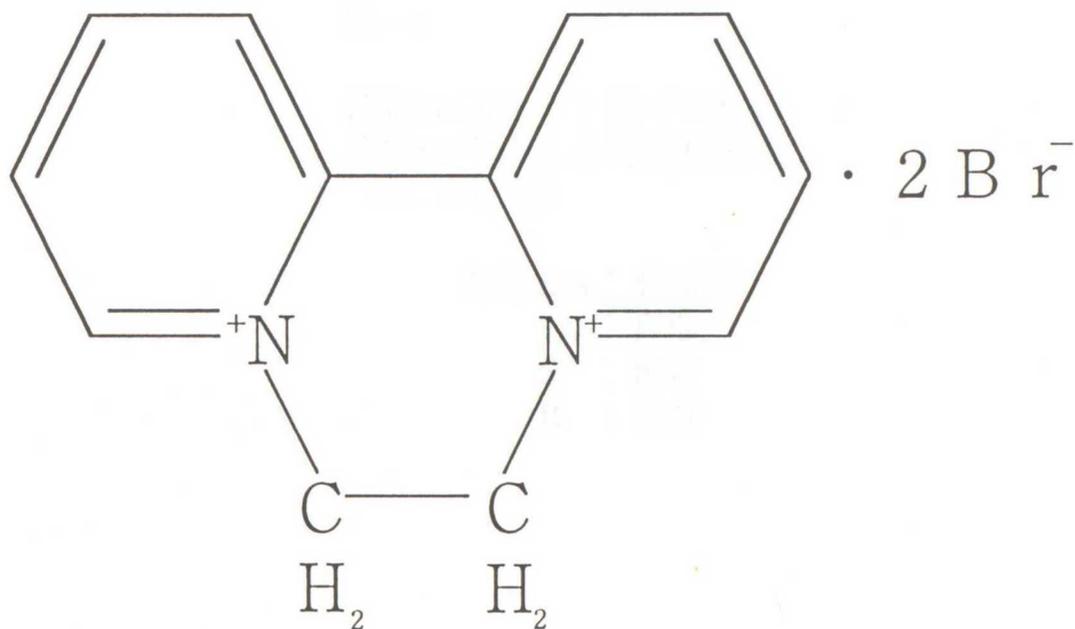


図-1 ジクワット (化学名1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium dibromide) の化学構造式

TV : 胸椎
 S : 胸骨
 R : 肋骨 (第24肋骨)

図—2

妊娠20日ラット胎子の $5\mu\text{m}$ の
連続切片による胸部横断面
(H-E染色)

矢印 DA : 動脈管
TV : 胸椎
S : 胸骨
R : 肋骨

図—3

コンピューター三次元画像解析システム
による心臓と大血管の胸腔内での位置を
示す。〔やや斜め前方より見る。〕

TV : 胸椎
S : 胸骨
R : 肋骨 (第四肋骨)

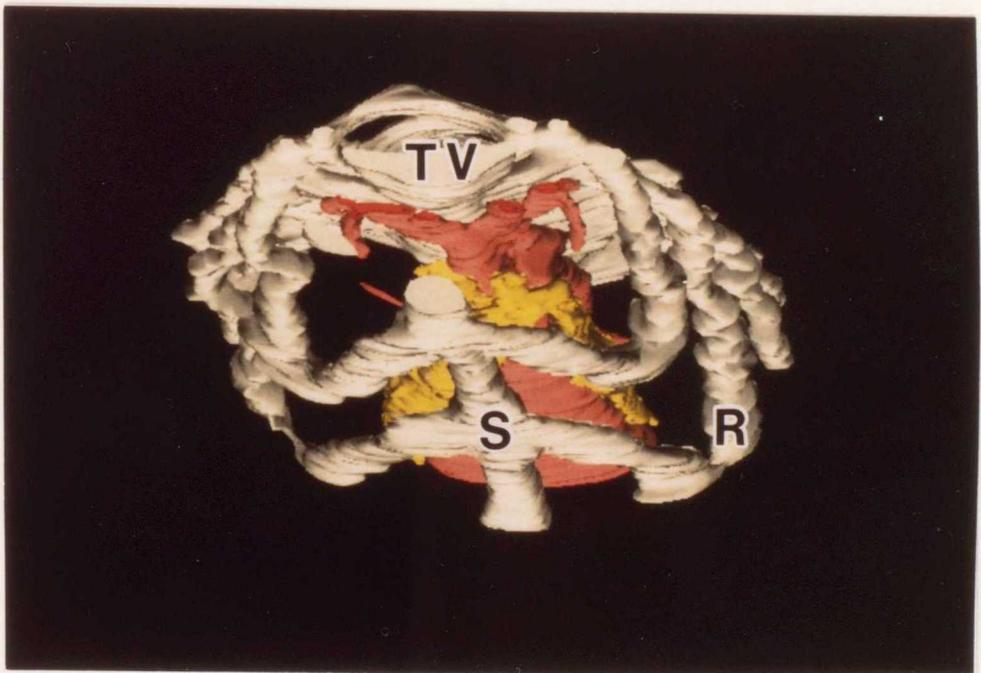
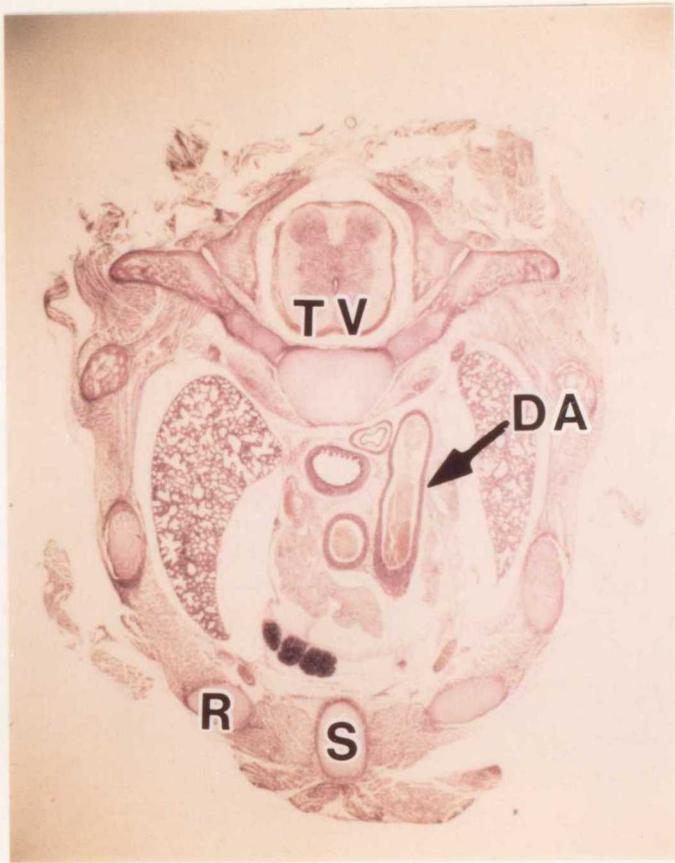


図-4

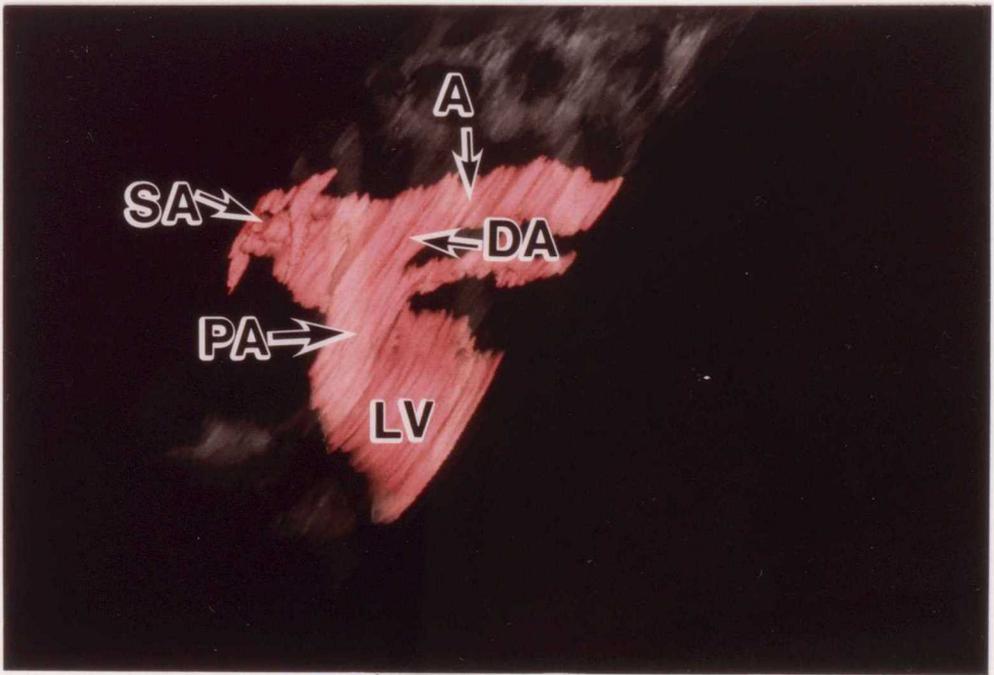
図-3を左側より見た三次元像

A : 大動脈
LA : 左心房

図-5

図-4の三次元像の肋骨および胸椎を70%
透過して大血管と心臓を見た像

DA : 動脈管
A : 大動脈
PA : 肺動脈
SA : 総頸動脈
LV : 左心室

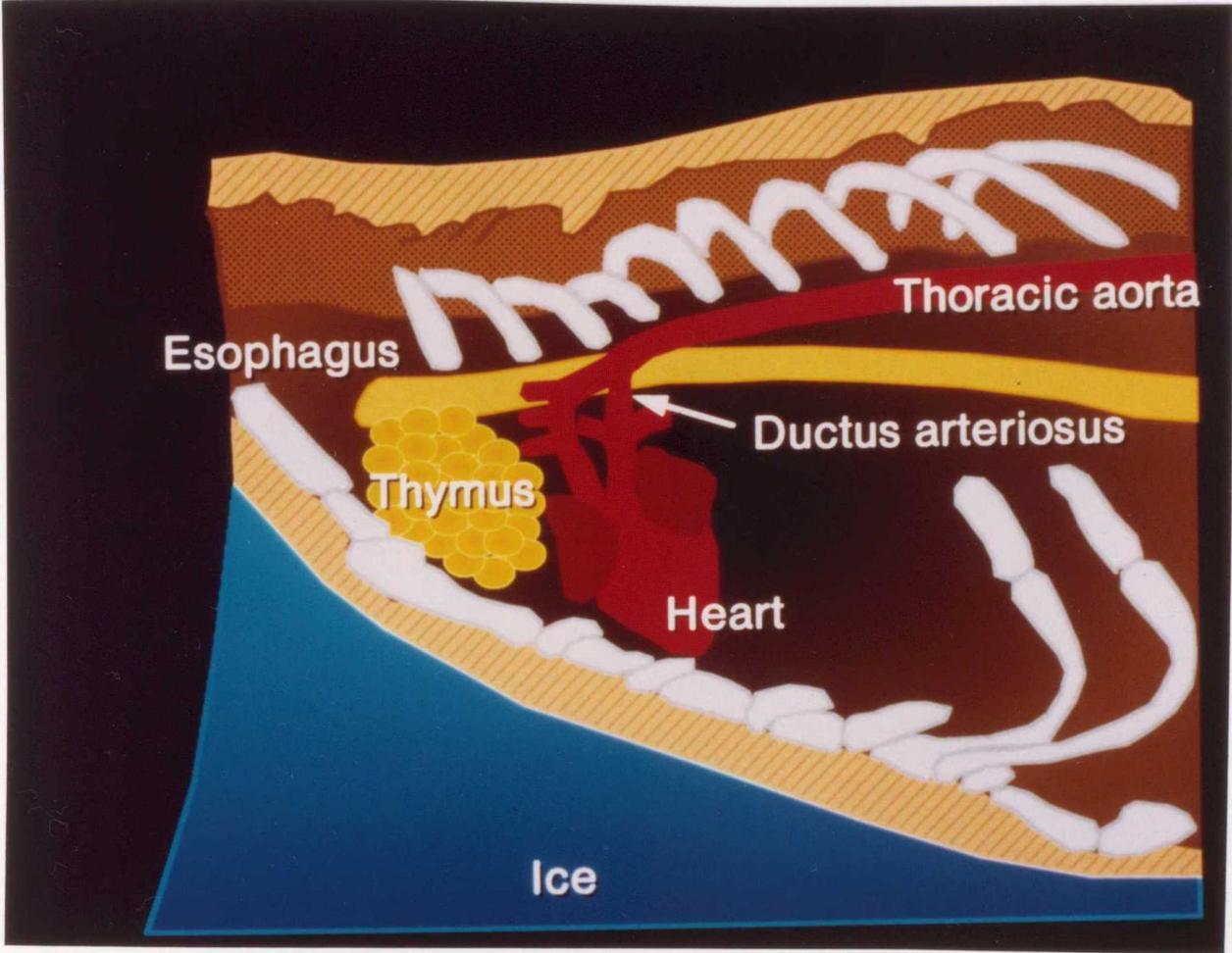


図—6

動脈管の測定部位の模式図

矢印：動脈管

観察時は図のように胎子を保定し、背部よりメス
で少しずつ水平に切り進める。



図—7

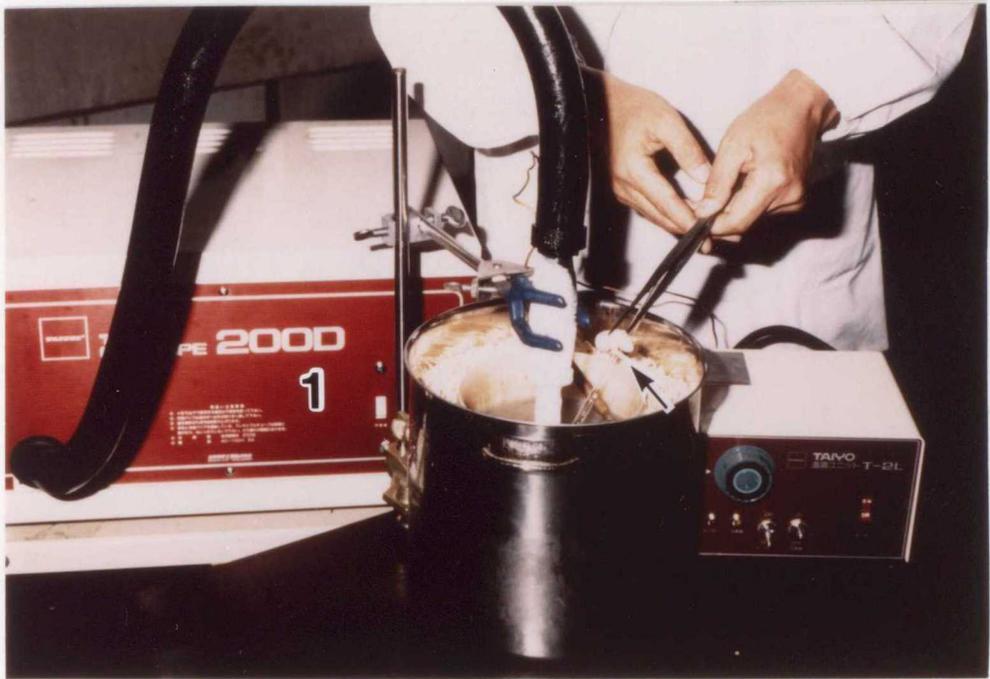
急速凍結装置を示す。

- 1 : 急速凍結装置
(TAIYO社 Cool Pipe 200D)
矢印 : 急速凍結された胎子

図—8

計測機器を示す。

- 1 : 実体顕微鏡
2 : 簡易凍結装置
(KOMATSU)



図—9

胎齡21日の胎子の背面を水平に切り出した面の拡大を示す。

TA：胸大動脈
L：肺
S：胃

左側は頭側を示す。

倍率×14

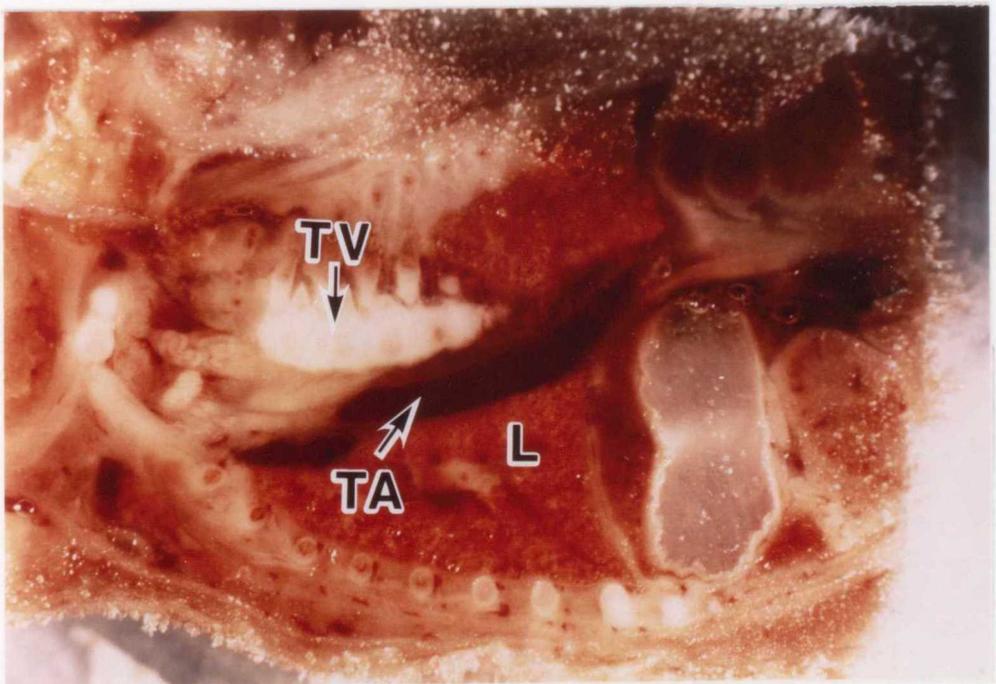
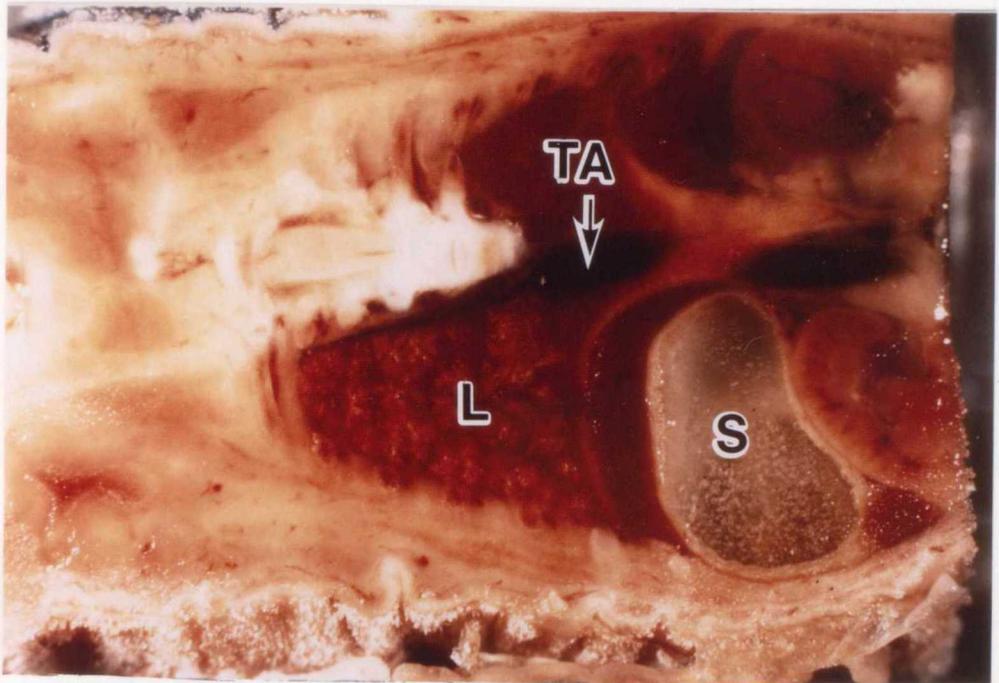
図—10

図—9をさらに切り進めた面を示す。

TV：胸椎
TA：胸大動脈
L：肺

左側は頭側を示す。

倍率×14



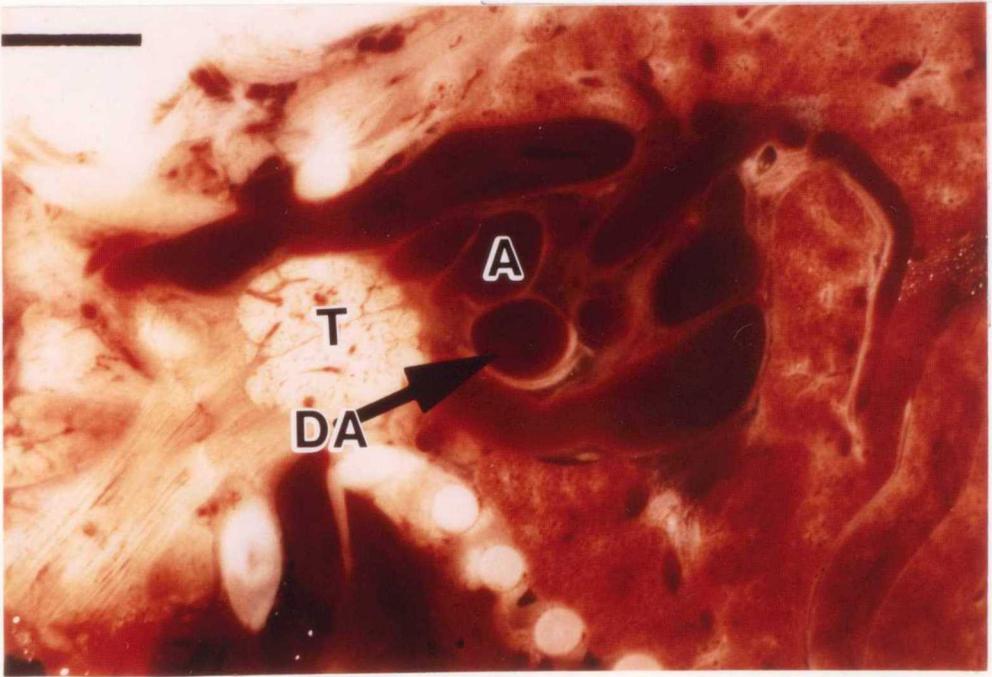
図—11

さらに切り進めた面を示す。

大動脈 (A) と動脈管 (DA) に分岐した所
を示す。胸腺 (T) も白く認められる。

左側は頭側を示す。

倍率×14



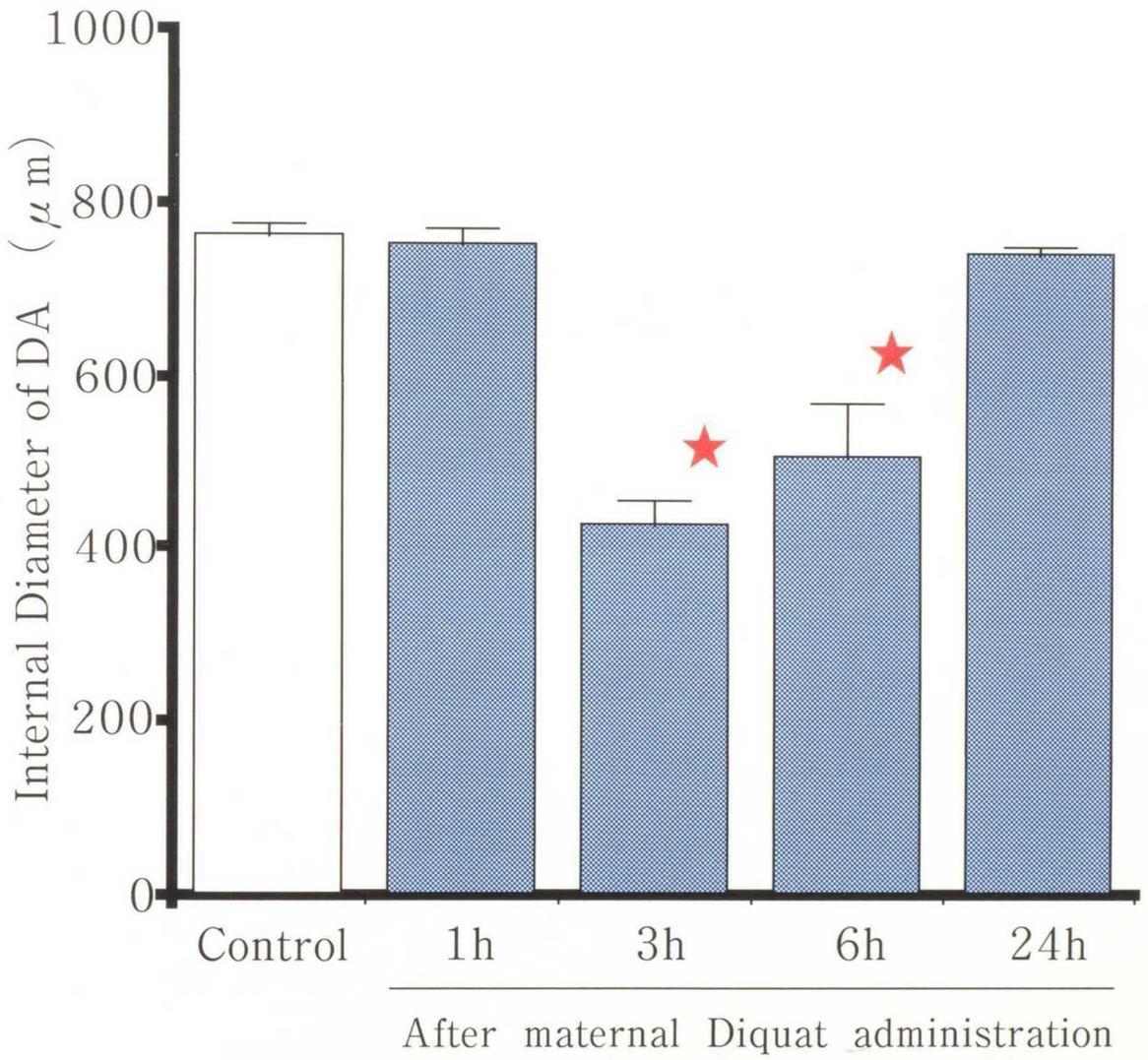


図-12 母体へのジクワット投与による胎児動脈管の内径の変化

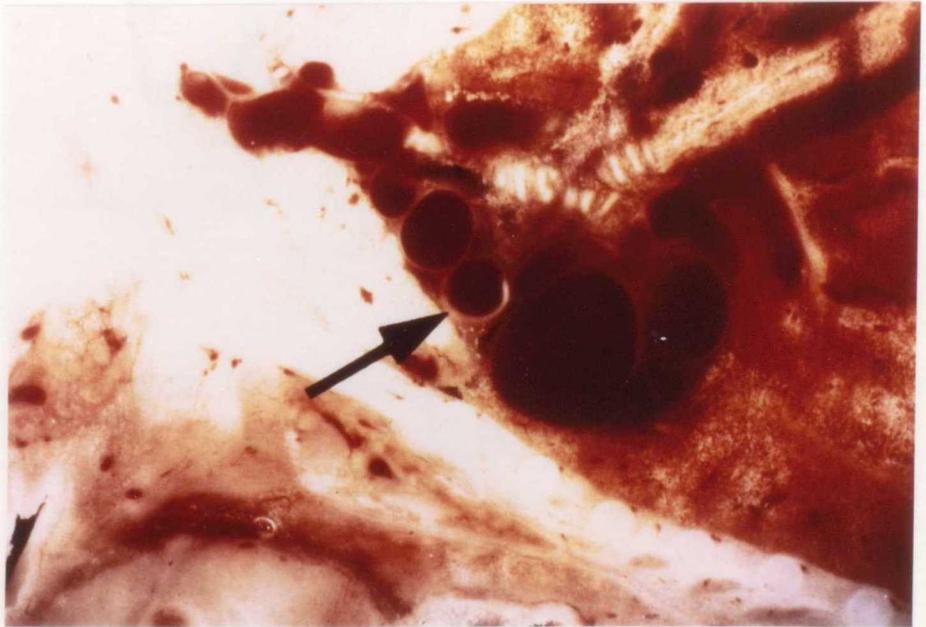
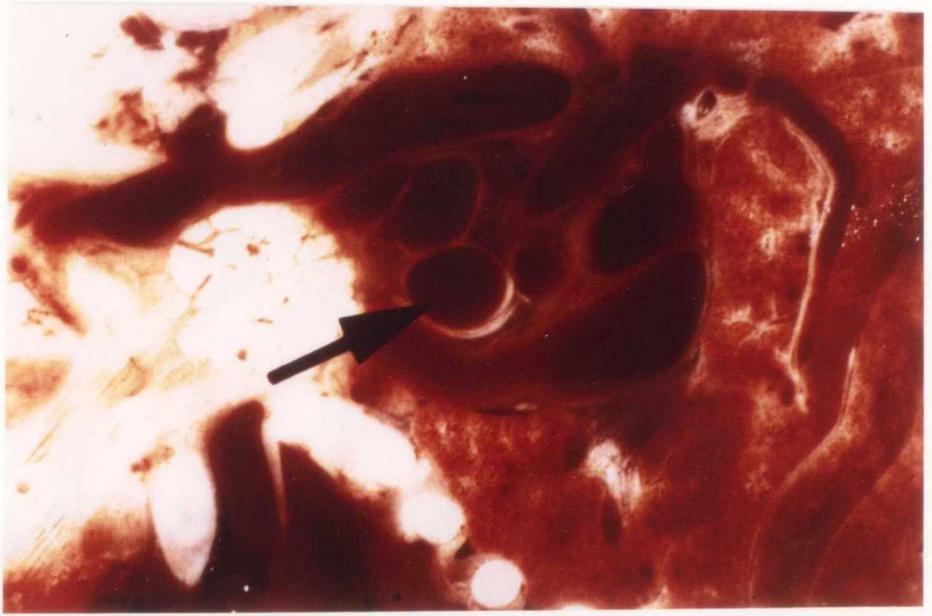
★ : Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

図一13

対照群の胎子動脈管の凍結写真像
矢印：動脈管
右側は頭側を示す。
倍率×14

図一14

ジクワット投与3時間後の胎子動脈管の凍結写真像
矢印：動脈管
右側は頭側を示す。
倍率×14



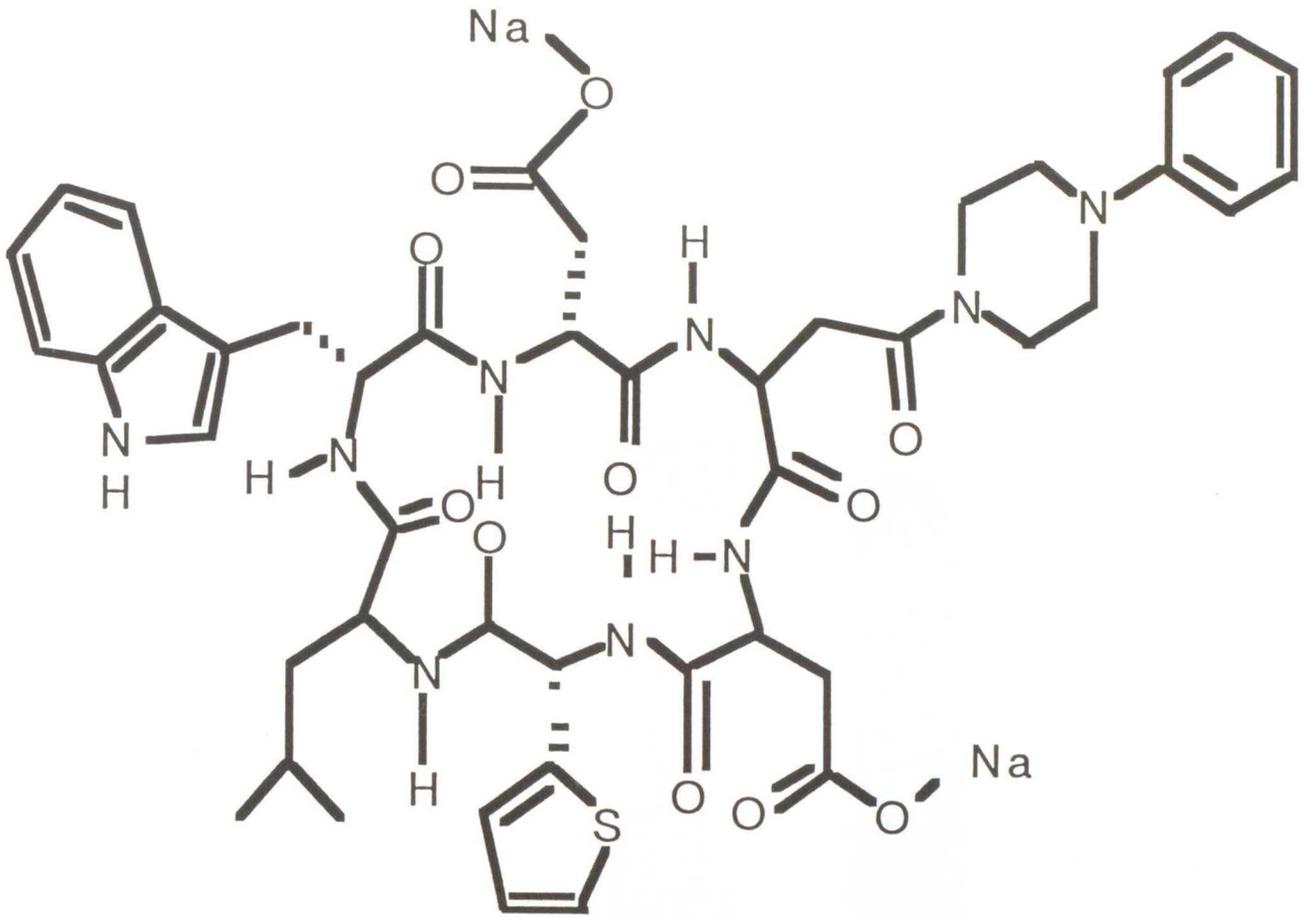


図-15 TAK-044 (化学名cyclo [D- α -aspartyl-3- [(4-phenyl-piperazin-1-yl) carbonyl] L-alanyl-L- α -spartyl-D-2- (2-thienyl) glycyL-L-leucyl-D-tryptophyl] disodium salt) の化学構造式

・ジクワット投与1時間後のTAK-044投与群

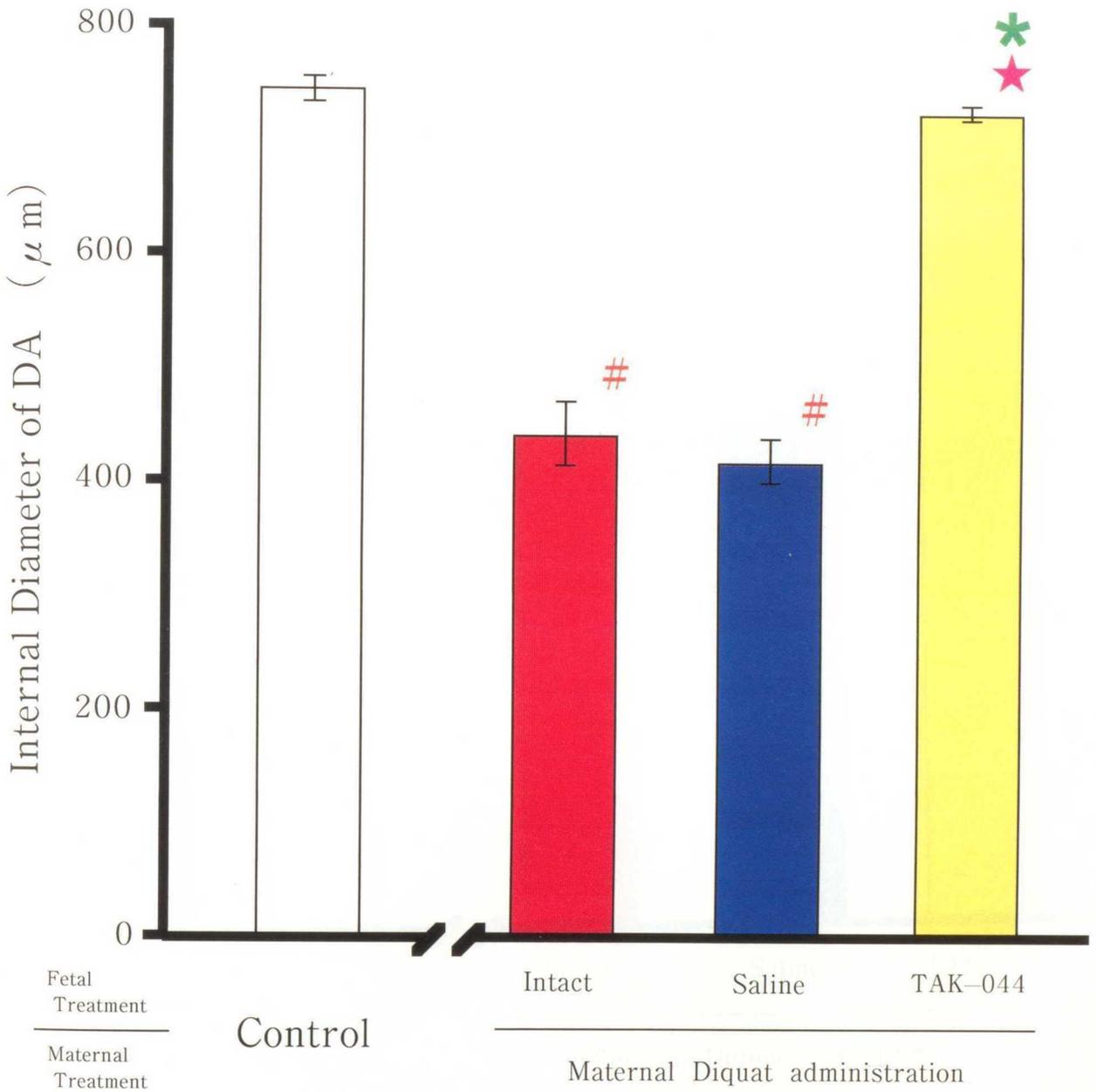


図-16 ジクワット投与による胎児動脈管収縮に対する
エンドセリンレセプター拮抗薬 (TAK-044) の影響

: Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

★ : Diquat投与母体のIntact胎児との間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

★ : Diquat投与母体のSaline投与胎児との間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

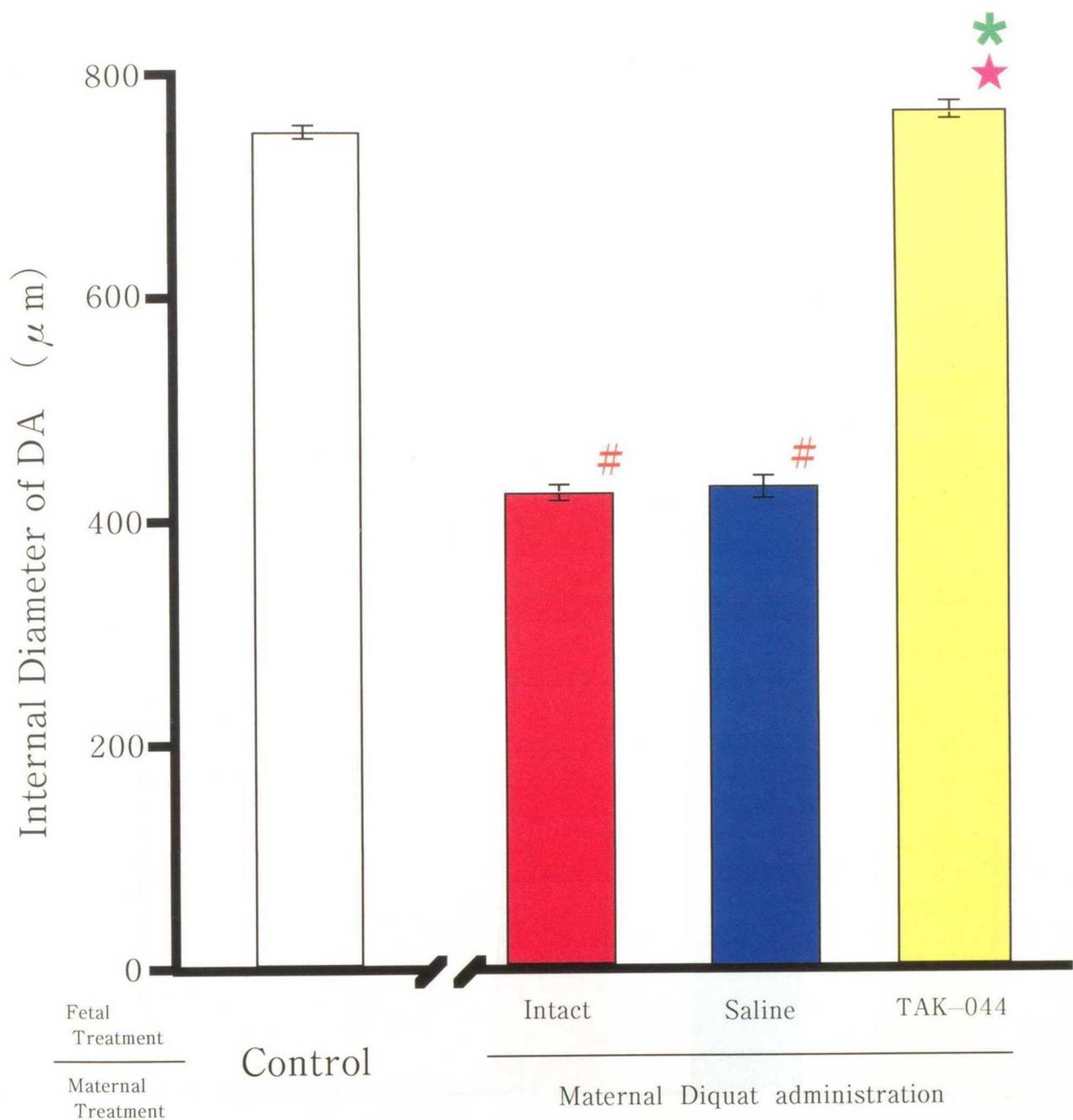


図-17 ジクワット投与による胎児動脈管収縮に対する
エンドセリンレセプター拮抗薬 (TAK-044) の影響

: Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

* : Diquat投与母体のIntact胎児との間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

* : Diquat投与母体のSaline投与胎児との間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

・ジクワット投与2.5時間後のTAK-044投与群

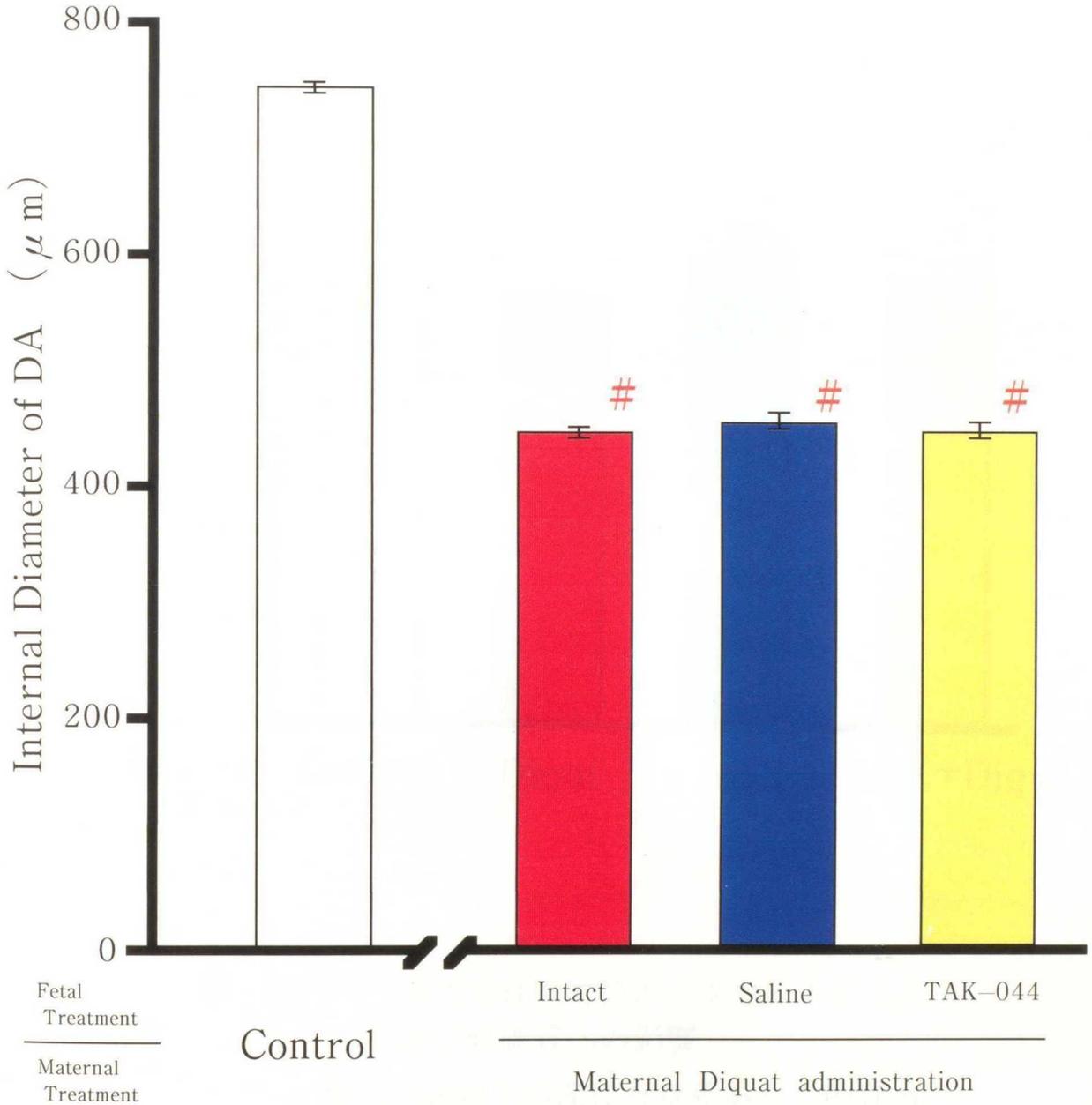
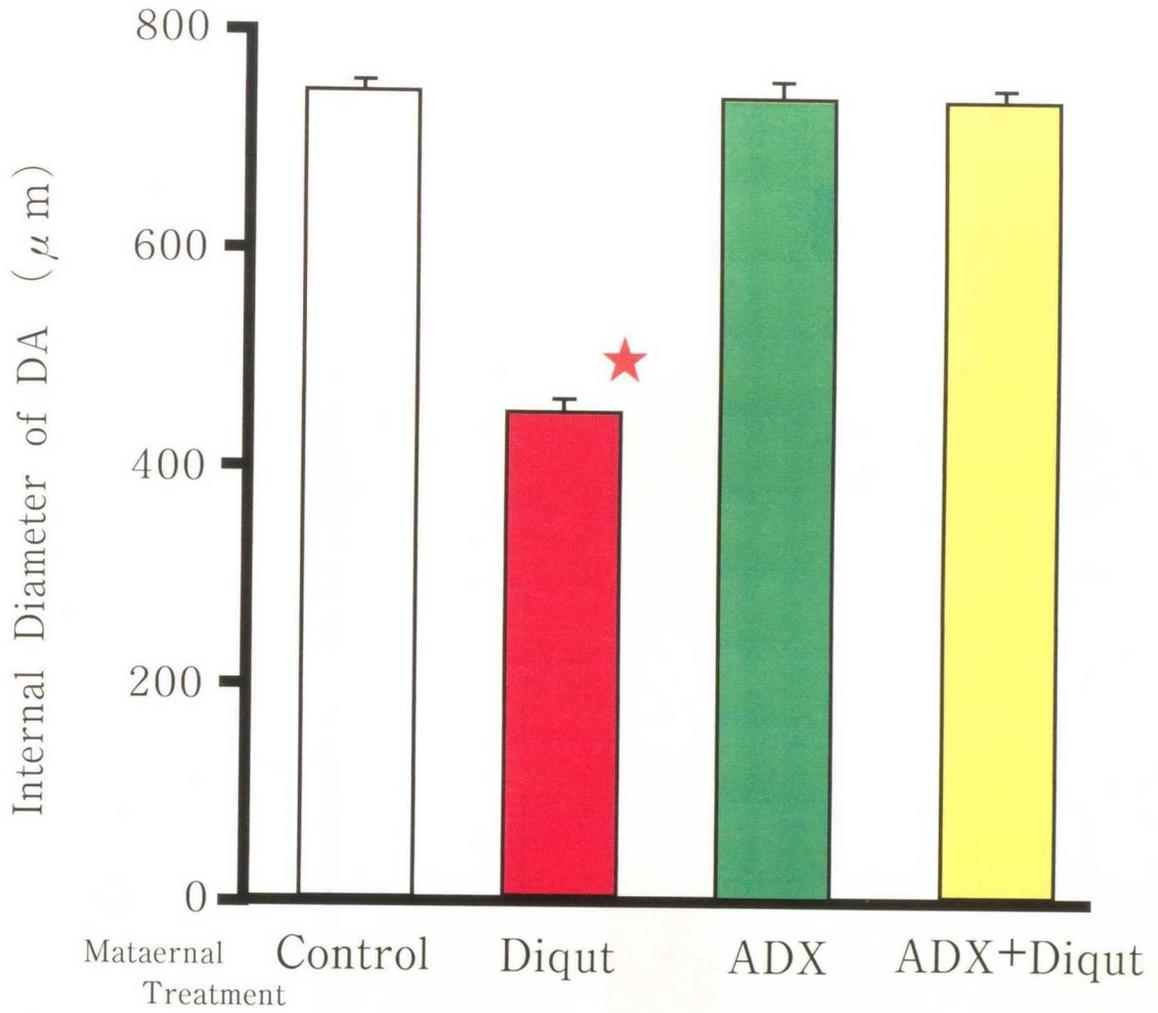


図-18

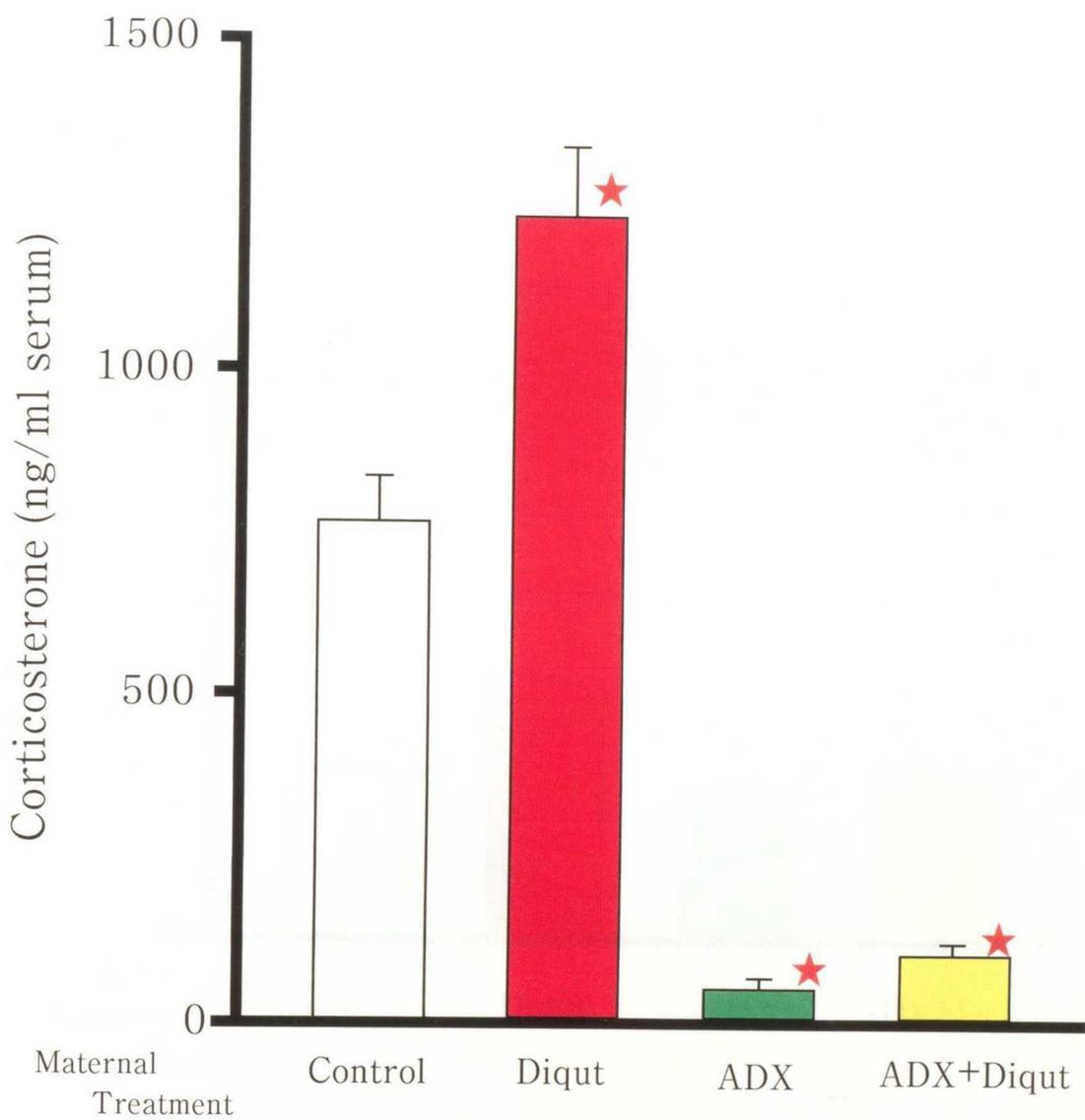
ジクワット投与による胎子動脈管収縮に対する
エンドセリンレセプター拮抗薬 (TAK-044) の影響

: Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)



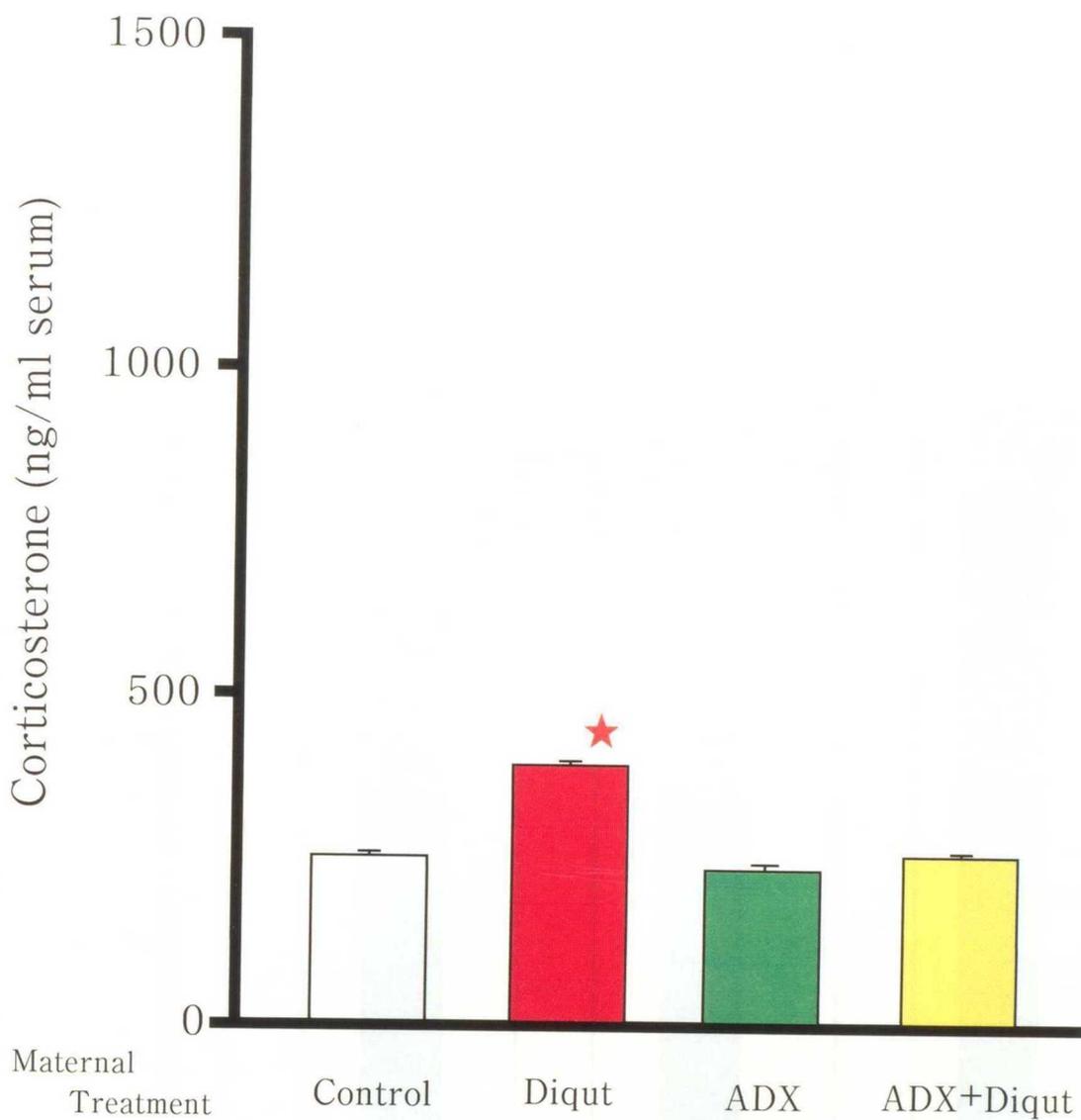
図—19 母体副腎除去後のジクワットによる胎子動脈管への影響

★ : Controlとの間に有意差あり (P ≤ 0.05)



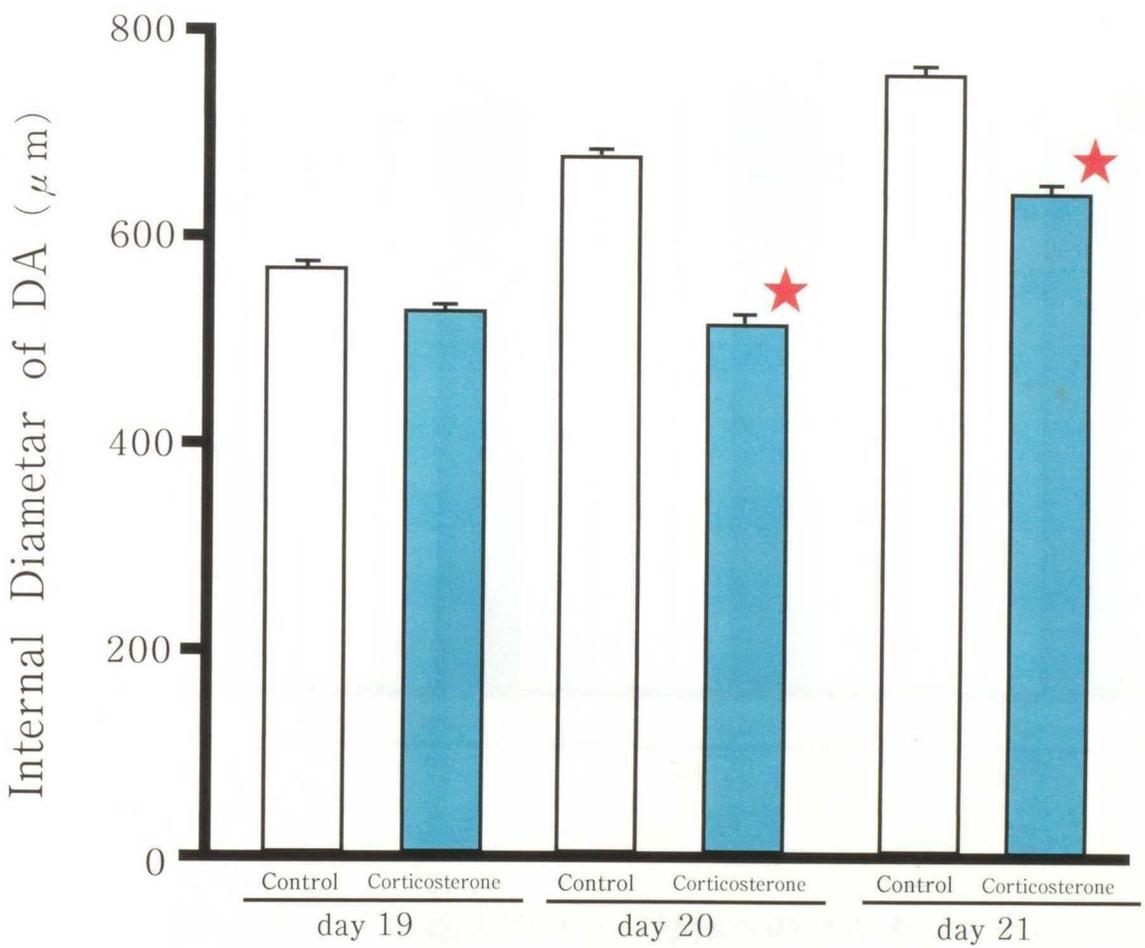
図—20 母体副腎除去後のジクワットによる母体血清コルチコステロン濃度への影響

★ : Controlとの間に有意差あり (P ≤ 0.05)

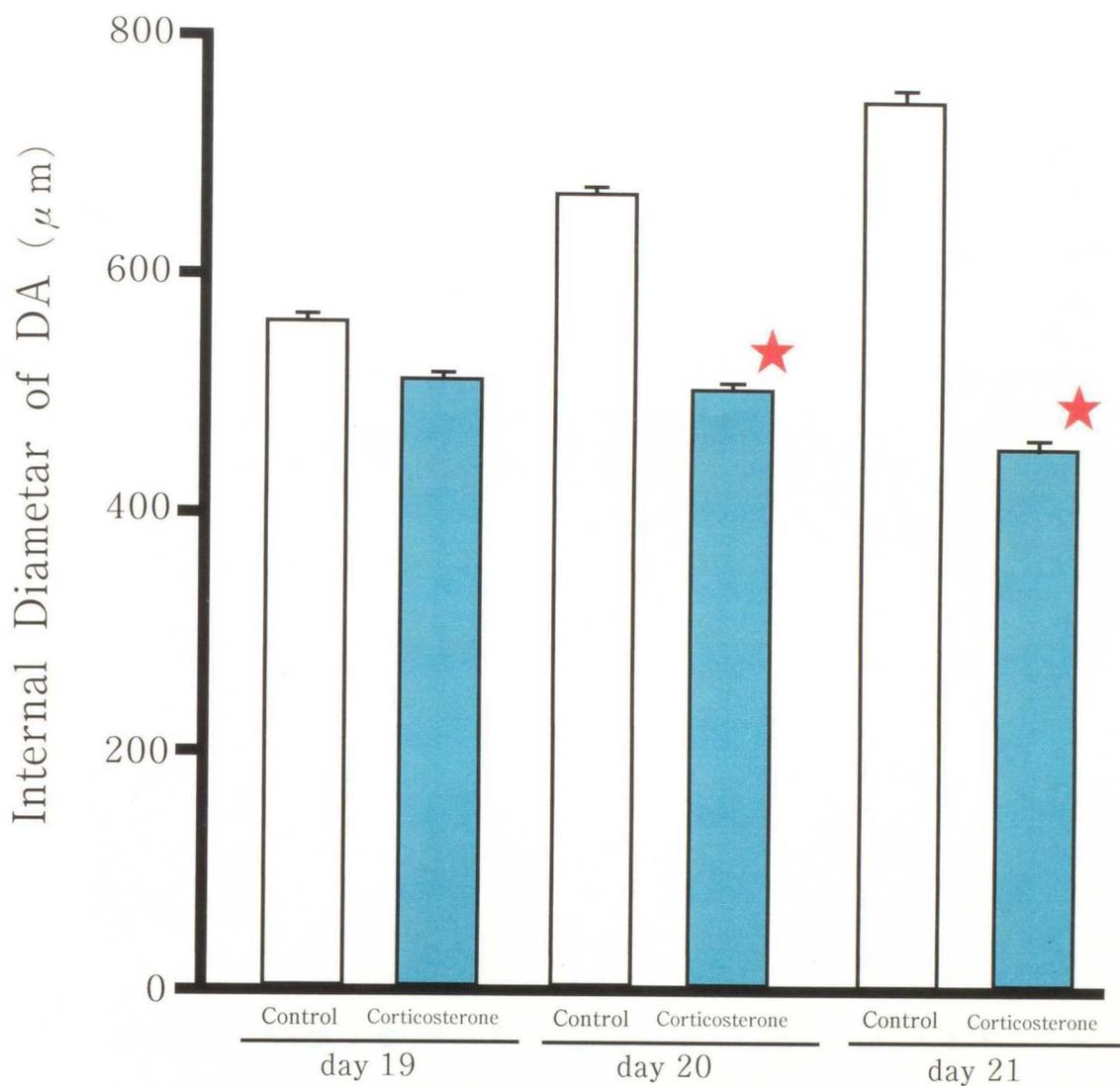


図—21 母体副腎除去後のジクワットによる
胎子血漿コルチコステロン濃度への影響

★ : Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

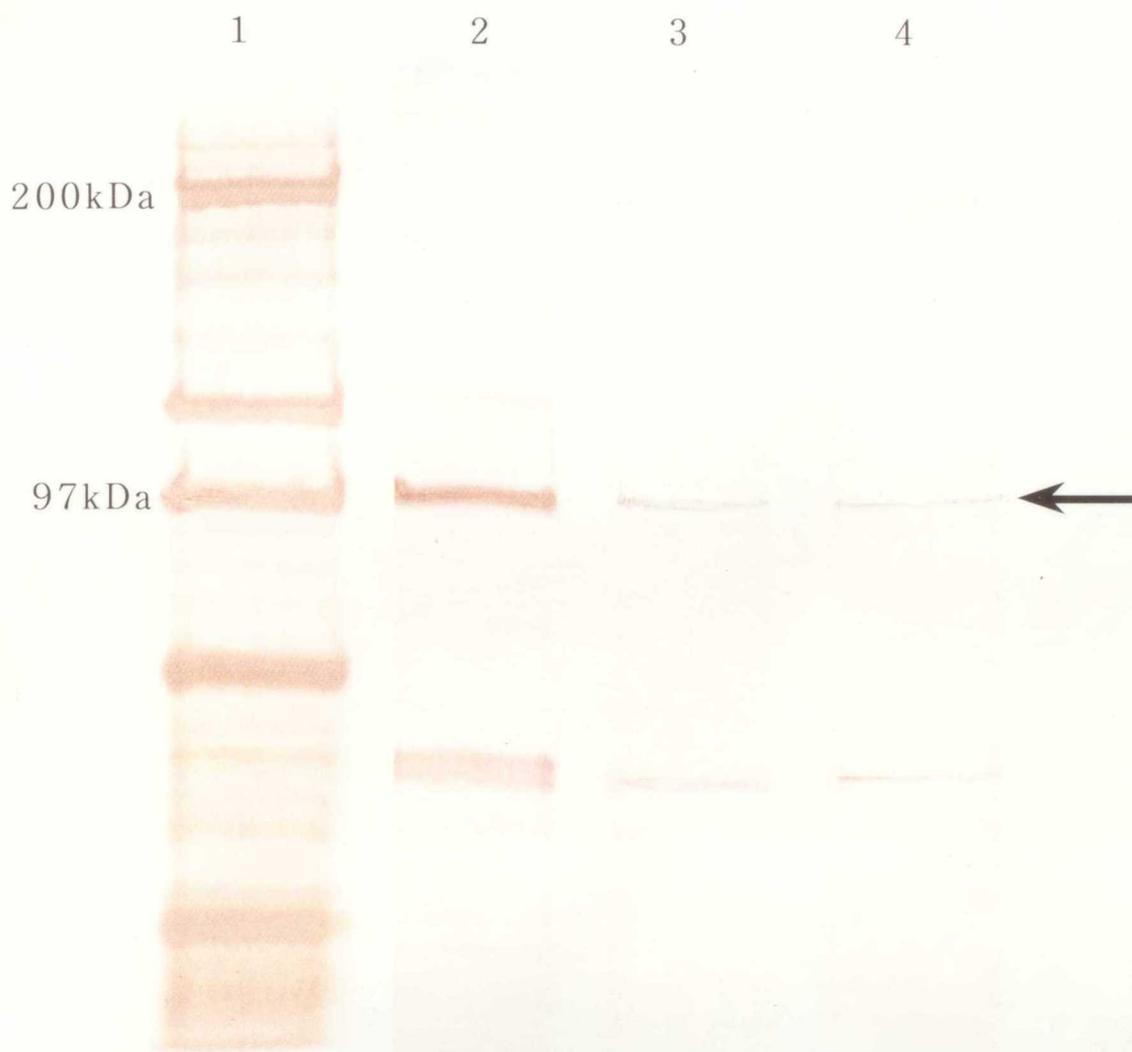


図—22 妊娠末期ラット母体へのコルチコステロン (40mg/kg) 投与による胎子動脈管への影響
 ★ : Controlとの間に有意差あり (P ≤ 0.05)



図—23 妊娠末期ラット母体へのコルチコステロン (80mg/kg) 投与による胎児動脈管への影響

★ : Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)



図一24 妊娠21日の胎児動脈管抽出物でのグルココルチコイドレセプターのウェスタンブロット分析

Lane1, 分子量マーカー

Lane2, 母体肝臓

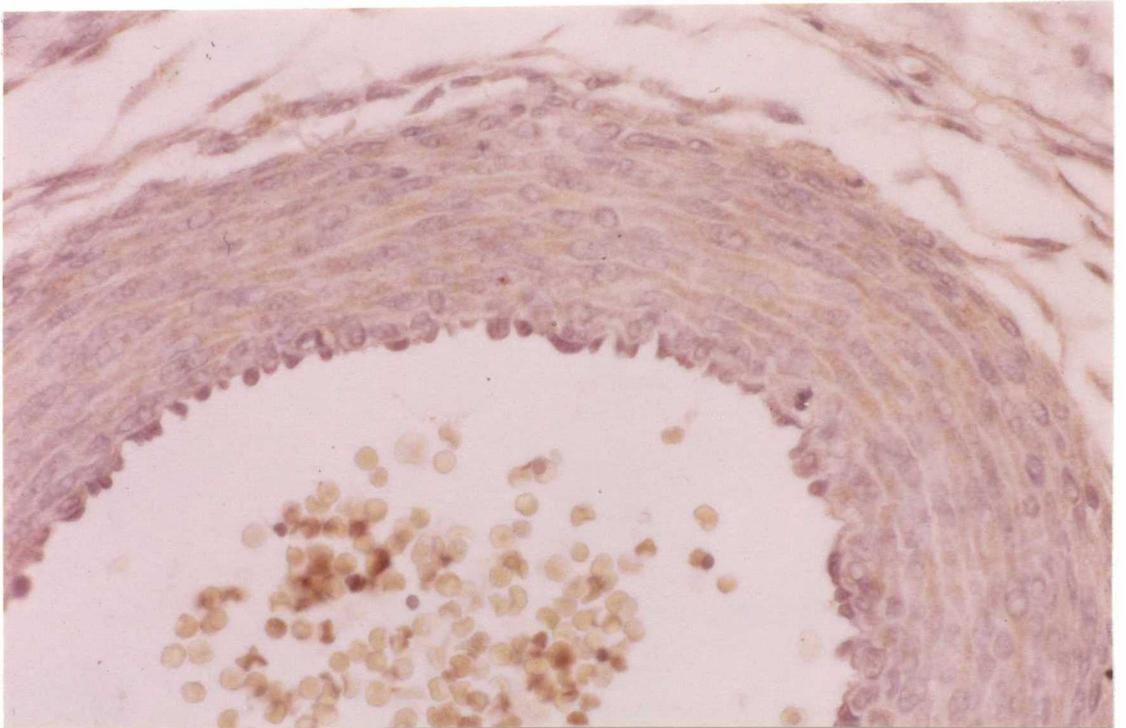
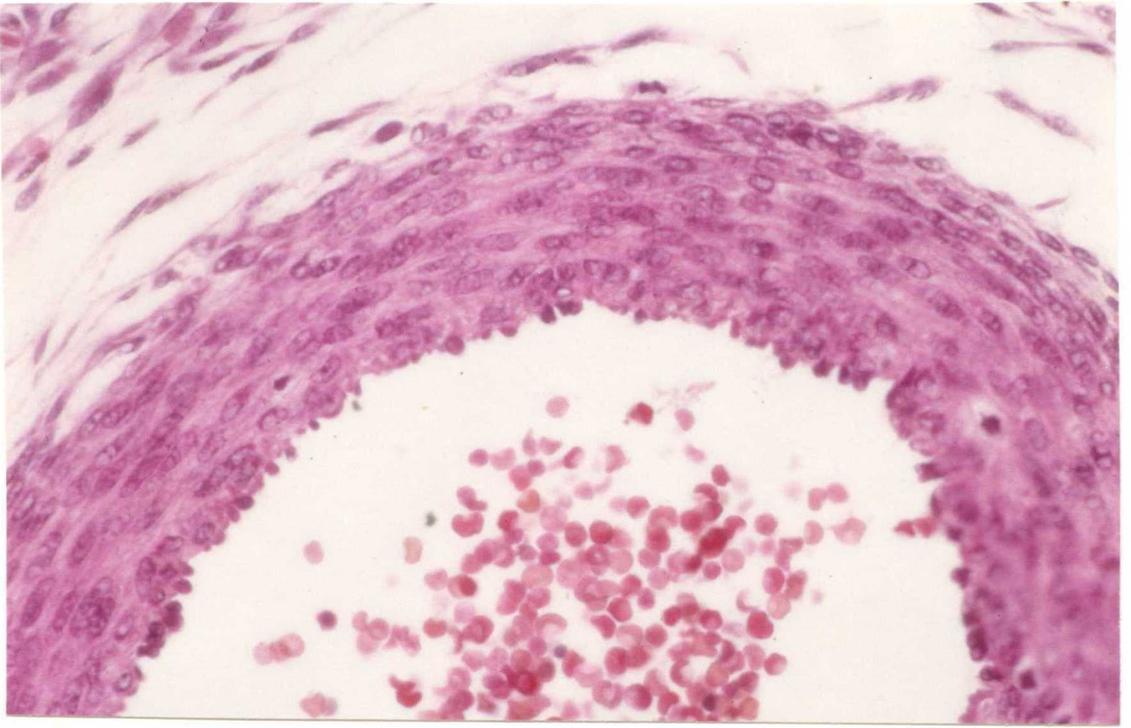
Lane3, 胎児動脈管

Lane4, 胎児大動脈

矢印：グルココルチコイドレセプター

図—25 胎齡19日の動脈管のH・E染色像
倍率×520

図—26 胎齡19日の動脈管の抗体染色像
倍率×520



図—27 胎齡20日の動脈管のH・E染色像
倍率×520

図—28 胎齡20日の動脈管の抗体染色像

矢印：グルココルチコイドレセプター陽性細胞
倍率×520

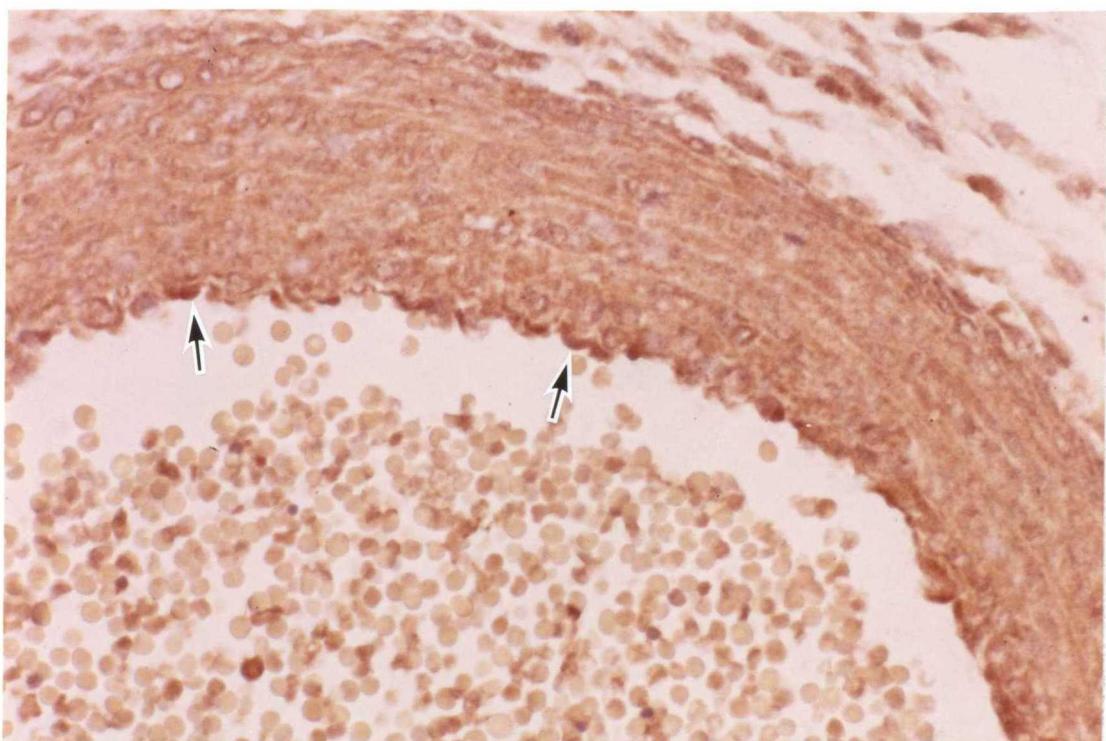
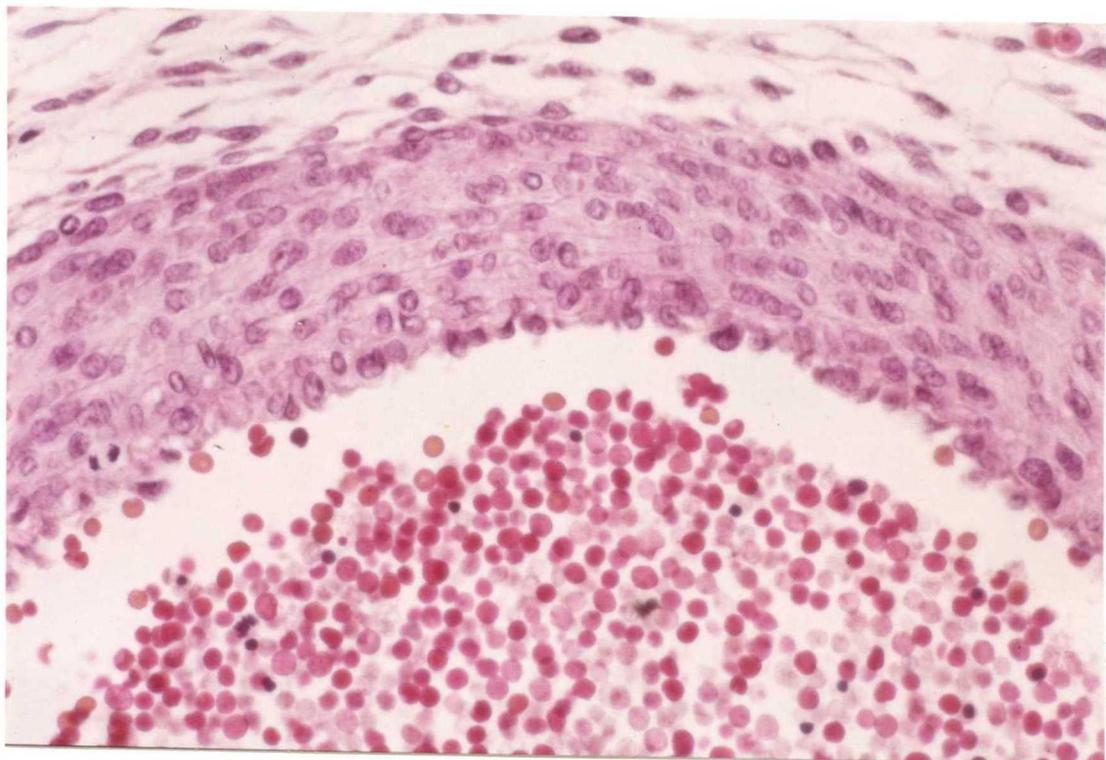


図-29 胎齡21日の動脈管のH・E染色像
倍率×520

図-30 胎齡21日の動脈管の抗体染色像

矢印：グルココルチコイドレセプター陽性細胞
倍率×520

