

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 —

1999

高木博隆

学位申請論文

ジピリデイリウム系除草剤（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—

1999

たかぎ ひろたか
高木 博隆

目 次

| | |
|---|----|
| 緒論 | 1 |
| 第1章 ジクワットの胎子動脈管への影響 一用量依存性について一 | |
| 材料および方法 | 5 |
| 結果 | 8 |
| 考察 | 9 |
| 小括 | 10 |
| 第2章 ジクワットの胎子動脈管収縮作用の臨界期の検討 | |
| 材料および方法 | 11 |
| 結果 | 13 |
| 考察 | 13 |
| 小括 | 14 |
| 第3章 ジクワットのプロスタグランジン合成酵素 に対する作用の検討 | |
| 材料および方法 | 15 |
| 結果 | 17 |
| 考察 | 17 |
| 小括 | 19 |
| 第4章 ジクワットの母体および胎子血漿中プロスタグランジンE ₂ への影響 | |
| 材料および方法 | 20 |
| 結果 | 22 |
| 考察 | 22 |
| 小括 | 24 |

第5章 ジクワット投与による胎子動脈管の収縮に対する
エンドセリン receptor 拮抗薬の影響

—ETAおよびETB receptor—

| | |
|---------|----|
| 材料および方法 | 25 |
| 結果 | 27 |
| 考察 | 27 |
| 小括 | 29 |

第6章 ジクワット投与による胎子動脈管の収縮に対する
エンドセリン receptor 拮抗薬の影響

—ETA receptor—

| | |
|---------|----|
| 材料および方法 | 30 |
| 結果 | 32 |
| 考察 | 32 |
| 小括 | 35 |
| 総括 | 36 |
| 謝辞 | 40 |
| 文献 | 41 |
| (図1～26) | |

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'-bipyridylium 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我が国を始め世界各国で使用されている。

一方、ジクワットの毒性については、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、動物種によってその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; Khara et al., 1968; Selypes et al., 1980; Ahmed et al., 1988）。ヒトおよび動物における経口暴露時のジクワット中毒の症状あるいは徴候は、初期には口腔、食道等のびらん、潰瘍などの消化器系に対する傷害およびショックである。ジクワットが体内に吸収されると、急性期には、肝臓、副腎などの高血流臓器において強い毒性を示し、多臓器不全を引き起こして致死的経過をとる（Conning et al., 1969; Clark and Hurst., 1970）。

このように、ジクワットの成体に対する影響については多くの研究がなされているが、その発生・生殖毒性に関しては、少数の報告が見られるのみである（Khara et al., 1968; Selypes et al., 1980; Ahmed et al., 1988）。これらによると、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、成体に対するもの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、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、成体でみ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、臍動脈と臍静脈の存在、胎盤の存在、卵円孔および動脈管の存在がある。

このうち動脈管は、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（図—2）。この動脈管（図—3）は弾性線維に富む肺動脈や大動脈（図—4）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 Larroche, 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 Cochrane, 1978）と言われている。

動脈管は出生後収縮閉鎖し、時間の経過とともに索状組織となり動脈管索として遺残する。この動脈管が胎生期において一時的に収縮すると、生後まで続く持続性肺高血圧症を引き起こしたり、また、生後においては、動脈管の収縮閉鎖が順調に行われず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、動脈管はそれを流れる血液中の PO_2 の変化に敏感に反応するといわれている（Dawes et al., 1955）。それゆえ、出生後の動脈管の収縮を引き起こす原因の一つとして、血液中の PO_2 の上昇が考えられている（Rudolph, 1974）。もう一つの特異的な性質として、胎子の動脈管の拡張維持はプロスタグランジン E_2 の作用によってなされていることである（Cocconi and Olley, 1973; Sharpe and Larsson, 1975; Heyman et al., 1976; Clyman et al., 1978; Momma et al., 1980）。このプロスタグランジン E_2 による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により確かめられている（Kantrowitz et al., 1975; Höng and Lewis, 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 Larsson, 1975）でも動脈管が収縮することが報告されている。

近年、プロスタグランジンE₂以外の動脈管調節物質としてエンドセリンが注目されている。エンドセリンは1988年に柳沢らによって、初めて単離された（Yanagisawa et al., 1988）、21個のアミノ酸で構成されるペプチドであり既知の血管収縮物質の中で最も強力で持続性の収縮作用を持つと考えられているものである。動脈管に対する作用についても、現在までに *in vitro* において、ヒツジの胎子動脈管を収縮させる（Coceani et al., 1989）、出生後の動脈管の収縮閉鎖にエンドセリンが関与している（Coceani et al., 1992）などの報告がなされている。

そこで、本研究では、除草剤として広く使用されているジクワットが胎生期の特殊な血管である動脈管に対して影響を及ぼすかどうかに着目し、その検討をラットを用いて行った。

第1章では、妊娠末期の胎子の動脈管に対するジクワットの影響を検討した。

第2章では、ジクワットの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に感受性を示すのかを検討した。

第3章では、ジクワットの動脈管収縮作用が、インドメタシンと同様の作用機序によるのかどうかの比較検討を行った。

第4章では、ジクワットの母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂への影響の検討を行った。

第5章では、ジクワットの胎子動脈管収縮作用に対するエンドセリン receptor 拮抗薬の影響を検討した。

第6章では、現在明らかにされている2種類のエンドセリン receptor

(ETA/ETB) の内どちらのレセプターが、ジクワットの動脈管収縮作用に主として関わっているかについて検討した。

第 1 章

ジクワットの胎子動脈管への影響 —用量依存性について—

本章においては、妊娠21日の母体にジクワット（ジピリディリウム系除草剤）を0.5、2および7 mg/kgの用量で皮下投与し、それぞれの投与量における胎子動脈管内径の変化を経時的に調べた。

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、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、日本クレア（株）から購入し、麻布大学解剖学第二研究室において繁殖させたWistarラットである。交配時に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晩同居させ、翌朝墮胎中

に精子の存在を確認されたものを妊娠0日（胎齡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 0.5 mg/kg（体重）、2 mg/kg および 7 mg/kg の用量で母体に皮下投与した。

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—5）。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—6）。その像を回転させて左から見た三次元像とし（図—7）、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—8）。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—9）。

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—10）の頭部および胸骨剣状軟骨部より後方の部分を切断して除去した。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—11）。

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—12、13）。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—14）。

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—15に示した。

ジクワット 0.5mg/kg 投与群においては観察した全ての時間で、有意な変化は認められなかった。

ジクワット 2mg/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時間でより強い収縮が認められた。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。

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、2mg/kg 投与群と同様に、投与後3時間で最も強い収縮が認められた。この最も強い収縮が認められた7mg/kg投与群では、対照群の動脈管（図—16）に比べ、内径は対照の約55%まで小さくなっており、動脈管壁は厚くなっていた（図—17）。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。

考 察

妊娠21日のラットにジクワット (0.5、2そして7 mg/kg) 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、0.5 mg/kg 投与群においては、動脈管の収縮は認められなかった。2 mg/kg 投与群と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と思われた。2 mg/kg 投与群と7 mg/kg 投与群の動脈管の収縮の程度を比較すると、7 mg/kg 投与した場合のほうが強く収縮しており、ジクワットの動脈管収縮作用は用量依存的な作用であった。

また、ジクワットは2 mg/kg という無影響量 (ジクワットのラットにおける経口投与LD₅₀は210mg/kg; Clark and Hurst, 1970) に近い低用量で、強い動脈管の収縮作用を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、ジクワットは胎生期のラット胎子動脈管を収縮させること、また、その収縮作用は用量依存的な作用であることが示唆された。

小 括

妊娠 2 1 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 0.5、2 および 7 mg/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全身凍結法にて測定した。

0.5 mg/kg 投与群では有意な変化はみられなかったが、2 mg/kg および 7 mg/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。2 mg/kg および 7 mg/kg 投与群でみられた動脈管の収縮を比較すると 7 mg/kg 投与群においてより著しい収縮がみられた。

これらの結果から、ジクワット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、また、この収縮作用は用量依存的な変化であることが示唆された。

第 2 章

ジクワットの胎子動脈管収縮作用の 臨界期の検討

前章においてジクワットが胎齢21日のラット胎子動脈管を用量依存的に収縮させることを示した。そこで、本章においてはジクワットによる動脈管収縮作用が胎生期のいつごろより始まるか（臨界期）について検討することを目的とした。

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。

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19日および20日のラットを用いた。剖検はそれぞれの午後1時とし、その3時間前に、ジクワットを母体に皮下投与した。ジクワットの投与量は、前章において動脈管が最も著しく収縮した7 mg/kg とした。対照群として、それぞれの日齢において生理的食塩水のみを同様に投与した母体の胎子を用

いた。剖検の際、冷却器により $-45\sim-50^{\circ}\text{C}$ 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°C の冷凍庫に保存した。

また、実験結果の評価にあたっては、第1章で得られた胎齢21日における7mg/kg投与群投与後3時間のデータもあわせて評価した。

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

本章で得られたすべての実験結果は図—18に示した。

対照群の胎子動脈管は、胎齢をおうごとに徐々にその内径を増していた。

胎齢19日においては、ジクワット投与群と対照群との間に有意な変化はみられなかった。

胎齢20日および21日では、ジクワット投与群の動脈管は同胎齢の対照群に比べ有意に収縮していた。

また、胎齢21日におけるジクワット投与による動脈管の収縮の程度は、胎齢20日齢のものと比べると、より強かった。

考 察

本章では、ジクワットによる動脈管収縮作用が胎生期のいつから始まるか、すなわち、臨界期について検討を行った。

本研究では、胎齢19日ではジクワットによる動脈管の収縮はみられなかったが、胎齢20日および21日では、有意な収縮がみられ、ジクワットの動脈管収縮作用の臨界期が胎齢19日と20日との間であることが示唆された。

ラットにおいて、抗炎症薬であるインドメタシンによって誘発される動脈管収縮作用の臨界期は胎齢19日の後半にあるという (Arishima et al., 1991)。このArishimaらの報告では、本研究の胎齢19日に相当する、胎齢19日の前半において、インドメタシンによる動脈管収縮は認められておらず、その臨界期は本研究におけるジクワットのものと一致している。従って、動脈管の化

学物質による収縮機構が、胎齡19日から20日にかけて発現するものと推察された。

また、一方で、胎齡20日と21日でみられたジクワットによる動脈管の収縮の程度を比較してみると、胎齡20日ではジクワット投与群の動脈管の内径は対照の70%であるのに対して、胎齡21日では、ジクワット投与群の動脈管の内径は対照の55%にまで減少しており、胎齡の増加とともに、その収縮の程度が増加していた。この結果は、胎子の成長に伴い、胎子動脈管がジクワットに対して感受性を高め、さらに、動脈管収縮機構が成熟していくことを示すものであろう。

小 括

ジクワットの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に発現するのかを明らかにするために、妊娠19、20および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、投与後3時間の胎子動脈管の内径の変化を急速全身凍結法にて計測した。

その結果、胎齡19日の胎子においては、動脈管の収縮は観察されなかったが、胎齡20および21日の胎子では、動脈管の収縮がみられた。胎齡20および21日の胎子でみられた動脈管の収縮を比較すると胎齡21日においてより著しい収縮がみられた。

本章で得られた実験成績より、胎子動脈管のジクワットに対する感受性の臨界期は、胎齡19日と20日との間であること、また、胎齡の増加に伴い収縮強度が増加することから、胎子の成長につれて動脈管のジクワットに対する感受性も高まることが示唆された。

第 3 章

ジクワットのプロスタグランジン合成酵素 に対する作用の検討

緒論で述べたように、胎生期において動脈管はプロスタグランジンE₂の作用によってその拡張が維持されている。インドメタシンなどの抗炎症薬は、このプロスタグランジンE₂の合成過程の重要な酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害することによって、プロスタグランジンE₂の合成を阻害し、結果的に動脈管収縮を引き起こすと考えられている。

そこで本章においては、ジクワットのプロスタグランジン生合成に及ぼす影響を検索するために、ジクワットがプロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロペルオキシゲナーゼ）に対して阻害作用を有するかどうか *in vitro* にて検討した。

材料と方法

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。

2) 実験方法

ジクワットのプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シク

ロオキシゲナーゼおよびヒドロペルオキシゲナーゼ) に対する影響の検索方法は以下のとおりとした。

ヒツジ精囊ミクロソームアセトン粉末 0.5 mg (乾燥重量)、 $1\mu\text{M}$ のウシ血液ヘモグロビン、 $50\mu\text{M}$ の $[1-^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 (2×10^5 cpm)、 1mM のジクワットを含む全容 0.1 ml の反応溶液を 24°C で1分間インキュベートした。これに、0.3 ml のエチルエーテル/メタノール/1 M クエン酸 (30 : 4 : 1、あらかじめ氷浴中で冷却) を混和して反応を停止した後、0.5 g の無水硫酸ナトリウムを混和した。上層の有機溶媒層の $50\mu\text{l}$ を Silicagel F254 glass plate (Merck, Art. 11798) に帯状にのせ、標品としてプロスタグランジン B_1 を同時にスポットした後、エチルエーテル/石油エーテル/酢酸 (85 : 15 : 0.1) の展開溶媒を用いて15 cm 展開した (約40分)。その後、紫外線ランプを用いてプロスタグランジン B_1 の展開位置をマークした後、X線フィルムに密着固定して48時間オートラジオグラフィーを行い、放射性生成物の展開位置を確認した。アラキドン酸、プロスタグランジン G_2 およびプロスタグランジン H_2 の展開部分をかきとり、液体シンチレーションスペクトロメーターを用いてそれぞれの放射能を測定し生成量を算出した。また、同様の実験を $0.01\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ のインドメタシンを用いて行い、その結果を比較検討した。

3) 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—19および20に示した。

0.01 μ M~1mMのインドメタシンを作用させるとプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は、濃度依存的に減少し、1 mM存在下ではその生成はほぼ完全に阻止されていた（図—19）。

1 mMのジクワットを作用させてもプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂生成量に、対照と比較して変化は認められなかった（図—20）。

考 察

プロスタグランジンエンドペルオキシドはアラキドン酸カスケードにおける重要な代謝物であり、プロスタグランジンG₂とプロスタグランジンH₂がある。それぞれプロスタノ骨格の15位に15(S)-OOH、5(S)-OH基を有し、9、11位にエンドペルオキシド結合をもっている。プロスタグランジンエンドペルオキシドの生合成は前駆体の不飽和脂肪酸（主としてアラキドン酸）からシクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジンG₂へ、ついでこのプロスタグランジンG₂がヒドロペルオキシターゼによってプロスタグランジンH₂へと合成されていく。このように、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼとヒドロペルオキシターゼ）は、すべてのプロスタグランジン合成に不可欠な酵素であり、本研究におけるキー酵素であるプロスタグランジンE₂も、プロスタグランジンH₂により、プロスタグランジンエンドペルオキシド-プロスタグランジンE₂-イソメラーゼに

よって合成されるものである。

緒論にも述べたように、胎生期において動脈管の拡張維持は主としてプロスタグランジンE₂の作用によるものと考えられている(Coceani and Olley, 1973; Sharpe and Larsson, 1975; Heyman et al., 1976; Clyman et al., 1978; Momma et al., 1980)。また、インドメタシンなどの抗炎症薬は、前述のプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼのひとつであるシクロオキシゲナーゼを阻害することによって、プロスタグランジンE₂の合成を阻害し、動脈管の収縮を引き起こすと報告されている (Kantrowitz et al., 1975; Höng and Lewis, 1976)。Momma and Takeuchi (1983および1984) による各種抗炎症薬の動脈管収縮作用の強さを比較検討した報告においても、シクロオキシゲナーゼ阻害作用の強い酸性抗炎症薬に強い動脈管収縮作用が認められている。

本章では、抗炎症薬のプロスタグランジン生合成に対する影響を検討する場合に一般に行われている、アラキドン酸を基質としてプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼを多く含有するヒツジ精囊ミクロソームを反応させる *in vitro*の実験系でジクワットのこれらの酵素に対する影響を検討した。

その結果、陽性対照として用いたインドメタシンにおいては、0.01 μ M 存在下ではプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は対照とほぼ同等であったが、0.1 μ M以上の濃度存在下ではプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量が濃度依存的に減少し、1 mM 存在下ではプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量をほぼ完全に阻害していた。また、プロスタグランジンG₂からプロスタグランジンH₂への転換率は、対照とほぼ同等であることから、インドメタシンはアラキドン酸からプロスタグランジンG₂への転換する過程の酵素であるシクロオキシゲナーゼに対して著しい阻害作用を有することが本章で得られ

た結果からも確認された。一方、ジクワットにおいては、1 mMという高い濃度で作用させてもプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は対照とほぼ同等であり、対照との間に有意な差は認められなかった。以上の成績から、ジクワットには、インドメタシンの持つ、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼの阻害活性はないものと考えられた。

小 括

プロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロペルオキシダーゼ）に対する *in vitro* でのジクワットの影響を検討した。

アラキドン酸を基質として、ジクワット存在下でプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼを含有するヒツジ精囊ミクロソームを作用させ、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量を測定した。

その結果、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は影響を受けなかったことから、*in vitro* においては、ジクワットはインドメタシンのようにこれらのプロスタグランジン合成酵素に対して影響を及ぼさないことが示唆された。

第 4 章

ジクワットの母体および胎子血漿中 プロスタグランジンE₂への影響

第3章においてジクワットが *in vitro* においてプロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ阻害作用がないことを示した。しかしながら、生体内におけるプロスタグランジンE₂の合成過程には、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ以外にも多くの酵素による反応過程が存在し、また、プロスタグランジンE₂の代謝過程が変化しても、プロスタグランジンE₂の動態は変化し得る。

そこで本章においては、ジクワットが母体および胎子のプロスタグランジンE₂の動態に影響を与えるかどうかを、実際に妊娠ラットにジクワットを投与し、その母体と胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度を測定し検討した。

材料と方法

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。

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日のラットを用いた。妊娠21日の午後1時を剖検時間と決め、剖検3時間前にジクワットを7 mg/kgの用量で母体に皮下投与した。剖検の際、母体はエーテル麻酔下にて開腹し、腹大動脈より採血した。胎子は帝王切開によって取り出した。胎子の血液は胎子の腋窩部を切り、流出する血液をキャピラリーチューブによって採取した。採取した母体および胎子の血液はEDTAおよびインドメタシンを加えた後、3,000 rpm、15分間の遠心分離にて血漿を分離した。

4) 血漿中プロスタグランジンE₂測定方法

母体および胎子の血漿は、2Nの塩酸を加えpHを3.5に調整した後、C18カートリッジカラム (Sep-Pak C18 Cartridges、Waters) に保持した。蒸留水に塩酸を加えpHを3.5に調整したもので妨害物質を除去した後、メタノールによってプロスタグランジンE₂を溶出させた。これを窒素気流下で濃縮乾固しプロスタグランジンE₂を析出させた。

分離抽出したプロスタグランジンE₂はProstaglandin E₂ [¹²⁵I] RIA Kit (Dupont)を用いてRIA法によって測定した。

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

本章で得られたすべての実験結果は図—21および22に示した。

ジクワット投与後の母体血漿中プロスタグランジン濃度

ジクワット投与後の母体血漿中プロスタグランジンE₂濃度は、対照群とほぼ同等の値を示し、有意な変化は認められなかった（図—21）。

ジクワット投与後の胎子血漿中プロスタグランジン濃度

ジクワット投与後の胎子血漿中プロスタグランジンE₂濃度は、母体と同様に対照群とほぼ同等の値を示し、有意な変化は認められなかった（図—22）。

考 察

本章では、実際に妊娠ラットにジクワットを投与し、その母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度を測定した。その結果、ジクワットを投与した後の母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂の濃度は対照群とほぼ同等の値を示しており、対照群との間に有意な変化は認められなかった。

従って、ジクワットは生体内におけるプロスタグランジンE₂の合成および代謝過程に何ら影響を及ぼさないと考えられた。

胎生期において動脈管の拡張維持は、プロスタグランジンE₂の作用が最も強いと考えられている。成体においては、プロスタグランジンは局所で生産され、局所で作用し、すぐに代謝されると考えられている。しかしながら、胎子動脈管において、プロスタグランジンE₂の合成と代謝は認められている

(Clyman, 1980; Pace-Asciak and Rangaraji, 1977; Pace-Asciak and Rangaraji, 1978) ものの、プロスタグランジンE₂の合成は少なく (Clyman et al., 1980)、また、成体と比べて肺でのプロスタグランジンの代謝能が低いため血漿中プロスタグランジン濃度は高く保たれている (Clyman et al., 1980; Clyman et al., 1981; Challis et al., 1976)。そのために、主として胎盤などで生産されたプロスタグランジンが胎子血漿中に存在し、これが動脈管の拡張維持に働いており、動脈管の拡張の程度と胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度はよく相関しているという。

緒論にも述べたとおり、インドメタシンなどの抗炎症薬は、プロスタグランジンE₂合成過程において、合成酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害することでプロスタグランジンE₂の合成量を低下させ、結果的に動脈管の収縮を引き起こす (Kantrowitz et al., 1975; Höng and Lewis, 1976)。しかしながら、ジクワットには、第3章で論じたようにシクロオキシゲナーゼ阻害作用もなく、また、本章で明らかにしたように、生体に投与してもプロスタグランジンE₂の動態にも影響を及ぼさない。従って、ジクワットの動脈管収縮作用は、インドメタシンなどの抗炎症薬で考えられているプロスタグランジンE₂を介したものではないことが考えられ、他の因子が大きく関与していることが示唆された。

小 括

ジクワットの *in vivo* でのプロスタグランジンE₂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 3 時間後の母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度をRIA法にて測定した。

その結果、母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度は対照群との間に有意な変化は認められず、ジクワットは *in vivo* においてもプロスタグランジンE₂に対して影響を及ぼさないことを証明した。

第 5 章

ジクワット投与による胎子動脈管の収縮に対する エンドセリンreceptor拮抗薬の影響 — ETAおよびETB receptor —

本章までの研究において、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を介したものであることが明かにされた。

そこで本章においては、近年、血管調節ペプチドとして関心を集めているエンドセリン (ET) に着目し、ジクワットの動脈管収縮作用機序の解明のため、非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬 (TAK-044) を用いてET receptor を遮断した状態で、ジクワットを投与し、その後の動脈管の変化を測定した。

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—23) 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、ET receptor 拮抗薬 (TAK-044) は、剖検3時間前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。投与量は、1胎子当た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。

母体へのジクワット投与は、TAK-044の投与30分後に、7 mg/kg の用量で母体に皮下投与し、その2.5時間後に剖検した。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。

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

本章で得られたすべての実験結果は図—24に示した。

ジクワットを投与した母体では無処置胎子および生理的食塩水を投与した胎子において、無処置対照群と比べて有意な動脈管の収縮が認められた。しかしながら、直接TAK-044を投与後、母体にジクワットを投与した胎子動脈管内径は無処置対照群のそれとほぼ同じ大きさであり、有意な変化はみられなかった。

考 察

ET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。ETには3種類のアイソフォーム (ET-1、ET-2、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)。一方、これらのETが作用する受容体についても、現在までET-1選択的 (ETA) とETアイソフォーム非選択的 (ETB) の存在が明らかにされており (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990; Masaki et al., 1992)、これら2種類の受容体についても、動物の種類や組織の部位によってその発現量や比率は異なっているものの、全身の組織での発現が確認され

ている。従って、ET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、心筋の陽性変時、変力作用など多彩な生理作用はETファミリーと receptor サブタイプとの相互作用によって引き起こされると考えられている (Arai et al., 1990)。

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ものであり、その作用としてDOCA食塩負荷悪性高血圧ラットにおける降圧作用およびラットの心筋梗塞モデルにおいて用量依存性の梗塞サイズの縮小効果などが報告されている (Watanabe et al., 1995)。また、ラット頸動脈バルーン傷害後の膜新生を顕著に抑制することも報告されており (Tsujino et al., 1995)、そのヒトへの臨床応用も期待されている薬物である。

本章で実施した実験において、非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬TAK-044をあらかじめ投与しETAおよびETB両方のET receptor を遮断しておくこと、ジクワットによって引き起こされる胎子動脈管の収縮は完全に阻止されていた。この結果は、ジクワットの動脈管収縮作用においてETが大きく関与していることを示すものである。動脈管に対する、ETの作用については、in vitro において、ヒツジの動脈管を収縮させるとの報告 (Coceani et al., 1989) があり、また、in vitro で妊娠末期のヒツジ動脈管にET receptor 拮抗薬を作用させると酸素刺激による動脈管の収縮を抑制する (Coceani et al., 1992)。これらのことから、出生後の動脈管の収縮閉鎖過程においてPO₂の上昇が引き金となりチトクロームP450分子種 (おそらくCYP3A) を誘導し、これがET-1の合成を促す。この増加したET-1がETA receptor に結合することによって動脈管中膜の平滑筋細胞を収縮させるというように、ETが出生後の動脈管の収縮閉鎖に大きく関与しているとも考えられている (Coceani et al., 1992; Coceani et al., 1994)。すなわち、周生期における動脈管の平滑筋ト

一ヌスの調節に対しては、プロスタグランジンE₂のみならず、ETも関与しているのである。このように、妊娠末期の動物において動脈管はETに対する感受性を持っていることから、ジクワットの動脈管収縮作用機序において、ET が関与しているといえよう。

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) の影響を検索するために、妊娠 21 日の午後 1 時を剖検時間と定め、剖検 3 時間前に 1 胎子あたり TAK-044 0.05 mg を直接胎子に皮下投与し、TAK-044 投与 30 分後に、母体に ジクワット 7 mg/kg を皮下投与し、その胎子動脈管の内径を経時的に全身凍結法にて測定した。

ジクワットを投与した母体から得られた胎子において、無処置対照群および生理的食塩水投与対照群では、動脈管の有意な収縮が認められたが、TAK-044 を投与した胎子の動脈管内径は、ジクワットを投与していない母体から得られた胎子の動脈管内径と有意な差はみられず、ジクワットによる動脈管収縮作用を阻止していた。

本章で得られた結果より、ジクワットの動脈管収縮作用機序に血管収縮物質である ET が大きく関与していることが示唆された。

第 6 章

ジクワット投与による胎子動脈管の収縮に対する エンドセリンreceptor拮抗薬の影響 — ETA receptor —

第5章において、ジクワットによる動脈管の収縮には、エンドセリン(ET)が関与していること示した。

前章にて述べたように、ET receptor は2種類存在している。本章では、ジクワットの動脈管収縮作用が、2種類の ET receptor (ETAおよびETB) の内、どちらの receptor を介しているのかを明らかにするために、ジクワット投与による動脈管の収縮に対する選択的 ETA receptor 拮抗薬 (BQ-123) の影響を検討した。

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。

BQ-123 (化学名Cyclo(D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp); 図—25) はAlexis Co.より購入したものをを用いた。

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、選択的ETA receptor 拮抗薬 (BQ-123) は、剖検の3時間前に母体をエーテル麻酔下で開腹し、子宮壁を通して胎子皮下に直接投与した。投与量は、1胎子当たり 0.2mg/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。

母体へのジクワット投与は、BQ-123の投与30分後に、7 mg/kg の用量で母体に皮下投与し、その2.5時間後に剖検した。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。

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

本章で得られたすべての実験結果は図—26に示した。

ジクワットを投与した母体では無処置胎子および生理的食塩水を投与した胎子において、無処置対照群と比べて有意な、動脈管の収縮が認められた。

しかしながら、直接BQ-123を投与後、母体にジクワットを投与した胎子動脈管内径は無処置対照群のそれとほぼ同じ大きさであり、有意な変化はみられなかった。

考 察

ET receptor は前述のとおり現在までのところ、哺乳類においてはETAとETBの2種類のみが確認されている (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990; Masaki et al., 1992)。一般的には、ETA receptor は主として血管平滑筋細胞に存在し、ETとの結合により、GTP結合タンパク質、PI代謝回転、IP₃産生を介して筋小胞体からCaを遊離し、同時にL型Caチャネルを開いて細胞内Ca量を増加させ、その結果として血管平滑筋は収縮する。一方、ETB receptor は、血管内皮細胞に存在し、ETとの結合により、細胞内貯蔵Caの遊離と非L型Caチャネルの開口により、細胞内Caを増加させ、内皮細胞からのNO遊離を引き起こし、その結果として血管平滑筋は弛緩する。しかしながら、ETB receptor にも、血管の収縮に関与することが報告 (Moreland et al., 1992; Sumner et al., 1992)されて以来、ETB receptor は血管の弛緩のみならず収縮も引き起こすと考えられている。すなわち、ETによる血管平滑筋トーンス

の調節は、ETAを介した収縮作用とETBを介した弛緩および収縮作用の総和ということになる。

そこで、本章においては、ジクワットの動脈管収縮作用におけるETの関与について、ETAとETBの2種類の受容体のうち、どちらのreceptorを介したものを明らかにするために、選択的ETA receptor拮抗薬であるBQ-123を用いて実験を実施した。BQ-123は、1992年に初めて報告がなされた選択的ETA receptor拮抗薬（Ihara et al., 1992）で、モノクロタリンによって誘発された肺高血圧症ラットの右心室圧（肺動脈圧）の上昇と右心室肥大を顕著に抑制するなど選択的ETA receptor拮抗薬として種々の実験的報告がなされている（Miyachi et al., 1993; Teerling et al., 1994; Sakai et al., 1996）。

本章で実施した実験において、BQ-123をあらかじめ投与しETA receptorを遮断した胎子では、ジクワットによる動脈管の収縮は認められなかった。これらの胎子における動脈管の内径は、対照胎子のものと同等であり、ジクワットによる動脈管収縮作用を完全に阻害していた。このように、ETA receptorを遮断することによって、ジクワットの動脈管収縮作用が阻害されたことにより、ジクワットの動脈管収縮作用は、2種類のETA、ETB receptorのうち、ETA receptorのみを介したものであることが示唆された。また、前章で論じた非選択的ETA/ETB拮抗薬による両方の受容体遮断時の反応と比較しても、ETA receptorのみを遮断できればジクワットの動脈管収縮作用は完全に阻止されることから、ジクワットの動脈管収縮作用においてETB receptorの関与はなく、ETA receptorを介した作用であることが明らかである。

Coceani et al.(1992)によると、BQ-123をin vitroで妊娠末期のヒツジ動脈管に作用させると、酸素刺激に対する動脈管の収縮を抑制すること、また、ET-1の合成阻害剤であるphosphoramidonを作用させても、同様に酸素刺激に

対する動脈管の収縮を抑制するという。本章で得られた結果からも、胎生期のラット動脈管にはすでにETA receptorが発現しており、その中膜を構成する平滑筋のトーンスがETによって調節されていることがうかがえる。

ジクワットが分類されるジピリディリウム系除草剤の毒性のメカニズムは、体内に摂取された後に、ミクロソームのNADPH-リダクターゼ系で1電子還元されて生じたジピリディリウムラジカルが酸素と反応することによって生じたスーパーオキシドアニオンや一重項酸素などの活性酸素による細胞障害と考えられている (Bus et al., 1975)。また、一方で、in vitro の成績ではあるが、活性酸素がET-1の発現に寄与していることも明らかにされてきた

(Gabriel et al., 1998; Michael et al., 1997)。これらのことから、ジクワットの動脈管収縮作用機序について、投与されたジクワットが体内でジクワットラジカルに変換され、さらに酸素との反応により活性酸素が生じる。このようにして生じた活性酸素がET-1の発現を促し、これがETA receptorを介して、動脈管中膜の平滑筋を収縮させるという経路が考えられた。

以上のように、胎生期の動脈管はプロスタグランジンE₂によってその拡張が維持され、動脈管収縮作用を持つ化学物質はインドメタシンなどプロスタグランジンE₂の合成阻害作用を持つものだけと考えられてきたが、本研究では、除草剤ジクワットが動脈管収縮作用を持つこと、さらに、プロスタグランジンE₂の合成阻害作用以外の作用機序、すなわちETA受容体を介したETの作用によって動脈管の収縮を引き起こすことを明らかにした。

小 括

ジクワットの動脈管収縮作用機序における選択的ETA receptorの役割を明らかにする目的で、妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検3時間前に1胎子あたり選択的ETA receptor拮抗薬（BQ-123）を直接胎子に皮下投与し、BQ-123の投与30分後に、母体にジクワット7 mg/kgを皮下投与し、その胎子動脈管の内径を経時的に全身凍結法にて測定した。

ジクワットを投与した母体から得られた胎子において、無処置対照群および生理的食塩水投与対照群では、動脈管の有意な収縮が認められたが、BQ-123投与群では動脈管内径は、ジクワットを投与していない母体から得られた胎子の動脈管内径と有意な差はみられず、ジクワットによる動脈管収縮作用を阻止していた。

本章で得られた結果より、ジクワットの動脈管収縮作用はET receptorの中で、ETA receptorを介したものであることが示唆された。

総 括

本論文は、ジクワットが胎生期の特殊な血管である動脈管に対して影響を及ぼすかどうかに着目し、ラットを用いてその検討を行った。

第1章においては、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種々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調べた。その結果、0.5 mg/kg 投与群では動脈管に有意な変化はみられなかったが、2 mg/kg および 7 mg/kg 投与群では投与後3 および 6 時間に有意な動脈管の収縮がみられた。2 mg/kg および 7 mg/kg 投与群でみられた動脈管の収縮を比較すると 7 mg/kg 投与群においてより著しい収縮がみられた。これらの結果から、ジクワットは妊娠末期のラット胎子動脈管に対し収縮作用を持つこと、また、この収縮作用は用量依存的な変化であることが明らかとなった。

第2章においては、ジクワットの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に感受性を示すのかを検討するために、妊娠19、20および21日の母体にジクワットを 7 mg/kg の用量で皮下投与し、投与後3時間の胎子動脈管内径の変化を調べた。その結果、胎齢19日の胎子においては動脈管の収縮は観察されなかったが、胎齢20日および21日の胎子では、動脈管の収縮がみられた。胎齢20日および21日の胎子でみられた動脈管の収縮を比較すると胎齢21日においてより著しい収縮がみられた。これらの結果から、ジクワットに対する胎子動脈管の感受性の臨界期は、胎齢19日と20日との間であること、また、胎子の成長に伴いジクワットに対する胎子動脈管の感受性もより高まることが示唆された。

第3章においては、ジクワットがプロスタグランジン合成酵素に対して阻

害作用を有するか *in vitro* で検討を行った。アラキドン酸を基質として、ジクワットあるいはインドメタシン存在下で、プロスタグランジンエンドペルオキシシターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロペルオキシダーゼ）を含有するヒツジ精囊ミクロソームを作用させ、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量を測定してみると、インドメタシン添加によって、アラキドン酸からプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成は阻害されたのに対して、ジクワット添加ではプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成は阻害されなかった。従って、ジクワットには、*in vitro* においてプロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシシターゼの阻害活性はないことが明らかになった。

第4章において、ジクワットの *in vivo* での母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂への影響の検討をする目的で、妊娠21日のラットにジクワットを7mg/kgの用量で皮下投与し、その3時間後の母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度を測定した。その結果、ジクワット投与後の母体および胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度には、対照群との間に有意な変化は認められなかった。これらの結果は、ジクワットは母体および胎子におけるプロスタグランジンE₂の合成および代謝過程に何ら影響を及ぼさないことを示すものである。従って、ジクワットの動脈管収縮作用は、インドメタシンなどの抗炎症薬で提唱されているシクロオキシゲナーゼ阻害によるプロスタグランジンE₂合成阻害によるという作用機序と異なる機序を持つことが強く示唆された。

第5章においては、近年内皮細胞由来の血管調節ペプチドとして注目を集めているエンドセリン（ET）に着目し、ジクワットの動脈管収縮作用機序

の解明のため、非選択的ETA/ETB receptor 拮抗薬 (TAK-044) を用いて胎子のETA/ETB receptor を遮断した状態で、ジクワットを投与し、その後の胎子動脈管内径の変化を測定した。その結果、あらかじめTAK-044 を投与しておく、その胎子においてはジクワットによる動脈管収縮が阻止されていた。従って、ジクワットによる動脈管収縮作用機序に、血管調節物質であるETが大きく関与していることが示唆された。

第6章において、ジクワットによる動脈管収縮作用機序において、ETAとETBの2種類のET receptor の内どちらの受容体が関与しているかを明らかにする目的で、選択的ETA receptor 拮抗薬(BQ-123)を用いて、ETA receptor のみを遮断した状態で、ジクワットを投与しその後の胎子動脈管内径の変化を測定した。その結果、あらかじめBQ-123 を投与しておく、その胎子においてジクワットによる動脈管収縮が阻止されていた。また、このBQ-123によるジクワットの動脈管収縮作用の阻害は、第5章で得られたETA/ETB receptor を遮断した場合と同じく完全にその作用を阻止していた。これらの結果から、ジクワットによる動脈管の収縮は、2種類のET receptor (ETAおよびETB) の内、ETA receptor を介したものであることが示唆された。

以上のことから本論文は、(1) 妊娠末期のラットにジクワットを投与すると、その胎子の動脈管に用量依存的な収縮を引き起こすこと、(2) 胎子動脈管のジクワットに対する感受性の臨界期は、妊娠19から20日の間であること、(3) ジクワットの動脈管収縮作用機序は、インドメタシンなどの抗炎症薬で考えられているプロスタグランジンE₂を介したものと異なること、(4) 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ETが関与していること、また、その作用はETA receptor を介したものである、の諸点

を明らかにした。

謝 辞

本研究は、麻布大学獣医学部解剖学第二研究室名誉教授江口保暢博士、比較毒性学研究室教授政岡俊夫博士、解剖学第二研究室教授有嶋和義博士、解剖学第二研究室助教授山本雅子博士ならびに薬理学研究室教授赤堀文昭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。

さらに、解剖学研究室の先輩でもあり、論文の作成にあたり、適切な御助言ならびに御支援賜りました麻布大学動物工学研究室助教授滝沢達也博士、徳島大学医学部解剖学第二講座助手小松克博士、東京大学総合研究博物館協力研究員佐々木基樹博士に心より感謝致します。

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。

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., Takizawa,T., Yamamoto,M., Ueda,Y.,Kusanagi, M., and Eguchi,Y.
Onset of the constrictive effect of indomethacin on the ductus arteriosus in fetal rats.
Acta Anat. 142:231-235,1991.
4. Bus,J.S., Aust,S.D., Gibson,J.E.
Lipid peroxidation:A possible mechanism for paraquat toxicity.
Res.Commun.Chem.Pathol.Parmacol. 11:31-38,1975.
5. Challis,J.R.G., Dilley,S.R., Robinson,C.
Prostaglandins in the circulation of the fetal lamb.
Prostaglandins. 11:1041-1052,1976.
6. Clark,D.G. and Hurst,E.W.
The toxicity of diquat.
Brit.J.Ind.Med. 27:51-55,1970.
7. 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 PGF₂.
Prostaglandins. 16:259-264,1978.

8. 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.
9. Clyman,R.I., Mauray,F., Demers,L.M.
Dose oxygen regulate prostaglandin induced relaxation in the lamb
ductus arteriosus?
Prostaglandins. 19:489-498,1980.
10. Clyman,R.I., Maurau,F., Roman,C.
Circulating prostaglandin E2 concentrations and patent ductus
arteriosus in fetal and neonatal lambs.
J.Pediatr. 97:455-461,1980
11. Clyman,R.I., Mauray,F., Heyman M.A.
Effect of gestational age on pulmonary metabolism of prostaglandin
E1 and E2.
Prostaglandins. 21:505-513,1981.
12. Coceani,F. and Olley,P.M.
The response of the ductus arteriosus to prostaglandins.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 51:220-225,1973.
13. Coceani,F., Armstrong,C. and Kelsey,L.
Endothelin is a potent constrictor of the lamb ductus arteriosus.
J.Physiol.Pharmacol. 67:902-904,1989.
14. Coceani,F., Kelsey,L. and Seidlitz,E.
Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus
arteriosus at birth.
J.Physiol.Pharmacol. 70:1061-1064,1992.
15. Coceani,F., Kelsey,L., Seidlitz,E.
Occurrence of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in the
lamb ductus arteriosus.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 72:82-88,1994.

16. Conning,D.G., Fletcher,K. and Swan,A.A.B.
Paraquat and related bipyridyls.
Brit.Med.Bull. 25:245-249,1969.
17. 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.
18. 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.
19. Gabriel, A., Kuddus, R. H., Rao, A. S., Watkins, W. D., Gandhi, C.
R.
Superoxide-induced changes in endothelin (ET) receptors in
hepatic stellate cells.
J. Hepatol. 29:614-27, 1998.
20. 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.
21. 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.
22. Hörnblad,P.Y. and Larsson,K.S.
Studies on closure of the Ductus arteriosus I. Whole body freezing as
improvement of fixation procedure.
Cardiologia. 51:231-235,1967.
23. Ihara,M., Noguchi,K., Saeki,T., Fukuroda,T., Tsuchida, S.,Kimura,
S., Fukami,T., Ishikawa,K., Nishikibe,M. and Yano, M.
Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists
selective for the ETA receptor.
Life Sci. 50:247-255,1992.

24. 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.
25. Kantrowitz,F., Robinson,D.R., and McGuire,M.B.
Corticosteroids inhibit prostaglandin production by reumatoid synovia.
Nature. 258:734-737,1975.
26. Khera,K.S., Whitta,L.K. and Ciegg,D.J.
Embryopathic effects of diquat and paraquat on rats.
Ind.Med.Surg. 37:257-261,1968.
27. Kirkpatrick,S.E., Printz,M.P., and Friedman,W.F.
Prostaglandins (PG'S) and the fetal ductus arteriosus.
Pediat.Res. 11:394,1977.
28. 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.
Pediat.Res. 12:386,1978.
29. Masaki,T., Yanagisawa,M. and Goto,K.
Physiology and pharmacology of endothelins.
Med.Res.Rev. 12:391-421,1992.
30. Michael, J. R., Markewitz, B. A., Kohan, D. E.
Oxidant stress regulates basal endothelin-1 production by cultured rat pulmonary endothelial cells.
Am. J. Physiol. 273:L768-74, 1997.
31. Miyauchi,T., Yorikane,R., Sakai,S., Sakurai,T.,Okada,M., Nishikibe, M., Yano,M., Yamaguchi,I., Sugishita,Y. and Goto,K.
Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of Cardiopulmonary alterations in rats with monocrotalin-induced pulmonary hypertension.
Circ Res. 73:887-897,1993.

32. 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.
33. Momma,K., Nishihara,S., and Ota,Y.
Constriction of fetal ductus arteriosus by glucocorticoid hormone.
Pediatr.Res. 15:19-21,1981.
34. Momma,K., Takeuchi,H.
Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Prostaglandins. 26:631-644,1983.
35. Momma,K., Takeuchi,H.
Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs.:Study of additional 34 drugs.
Prostaglandins. 27:527-536,1984.
36. Moreland, S., McMullen, D. M., Delaney, C. L., Lee, V. G. and Hunt, J.
Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 184:100-106,1992.
37. Pace-Asciak,C.R., Rangaraj,G.
The 6 keto-prostaglandin F₂ α pathway in the lamb ductus arteriosus.
Biochem.Biophys.Act. 486:583-585,1977
38. Pace-Asciak,C.R., Rangaraj,G.
Prostaglandin biosynthesis and catabolism in the lamb ductus arteriosus,aorta and pulmonary artery.
Biochem.Biophys.Act. 529:13-20,1978
39. Powell,J.G. and Cochrane,R.L .
The effect of fenopropfen 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.

40. Rudolph,A.H.
Congenital disease of the heart.
Year Book Medical Publishers,Chicago. 1974.
41. Sakai,S., Miyauchi,T.,Kobayashi,M., Kobayashi,M., Yamaguchi,I.,
Goto,K., and Sugishita.
Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term
survival in heart failure.
Nature. 384:353-355,1996.
42. 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.
43. Selyes,S.S., Nagymajtenyi,L. and Berencsi,G.
Mutagenic and embryotoxic effects of paraquat and diquat.
Bull.Environm.Contam.Toxicol. 25:513-57,1980.
44. 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.
45. Sumner, M. J., Cannon, T. R., Mundin, J. W., White, D. G. and
Watts, I. S.
Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle
contraction.
Br. J. Pharmacol. 107:858-860,1992.
46. Teerling,JR., Breu,V., Sprecher,U., Clozel,M., Clozel,JP.
Potent vasoconstriction mediated by endothelin-B receptors in canine
coronary arteries.
Cir Res. 74:105-114,1994.
47. Tsujino,M., Hirata,Y., Eguchi,S., Watanabe,T., Chatani,F. and
Marumo,F.
Nonselective ETA/ETB receptor antagonist blocks proliferation of rat
vasoculuar smooth muscle cells after balloon angioplasty.
Life Sci. 56:PL449-454,1995.

48. Walsh,S.Z., Meyer,W.W. and Lind,J.
The human fetal and neonatal circulation.
Springfield.Thomas.1975.
49. 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.
50. 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.
51. 矢崎義雄
循環調節ペプチドと関連疾患 <羊土社> ,1992

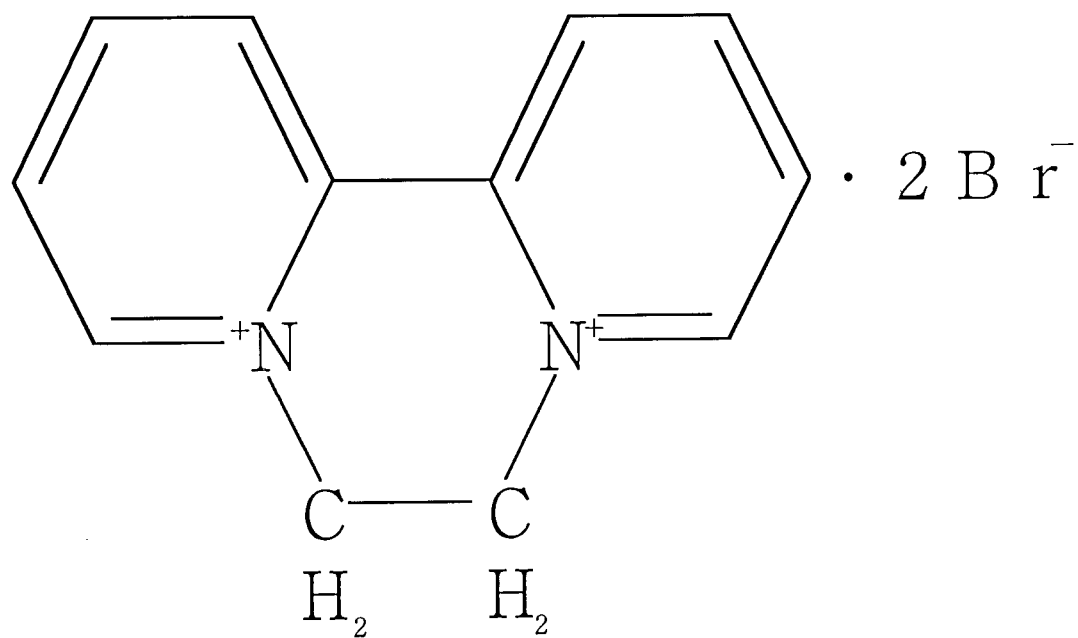
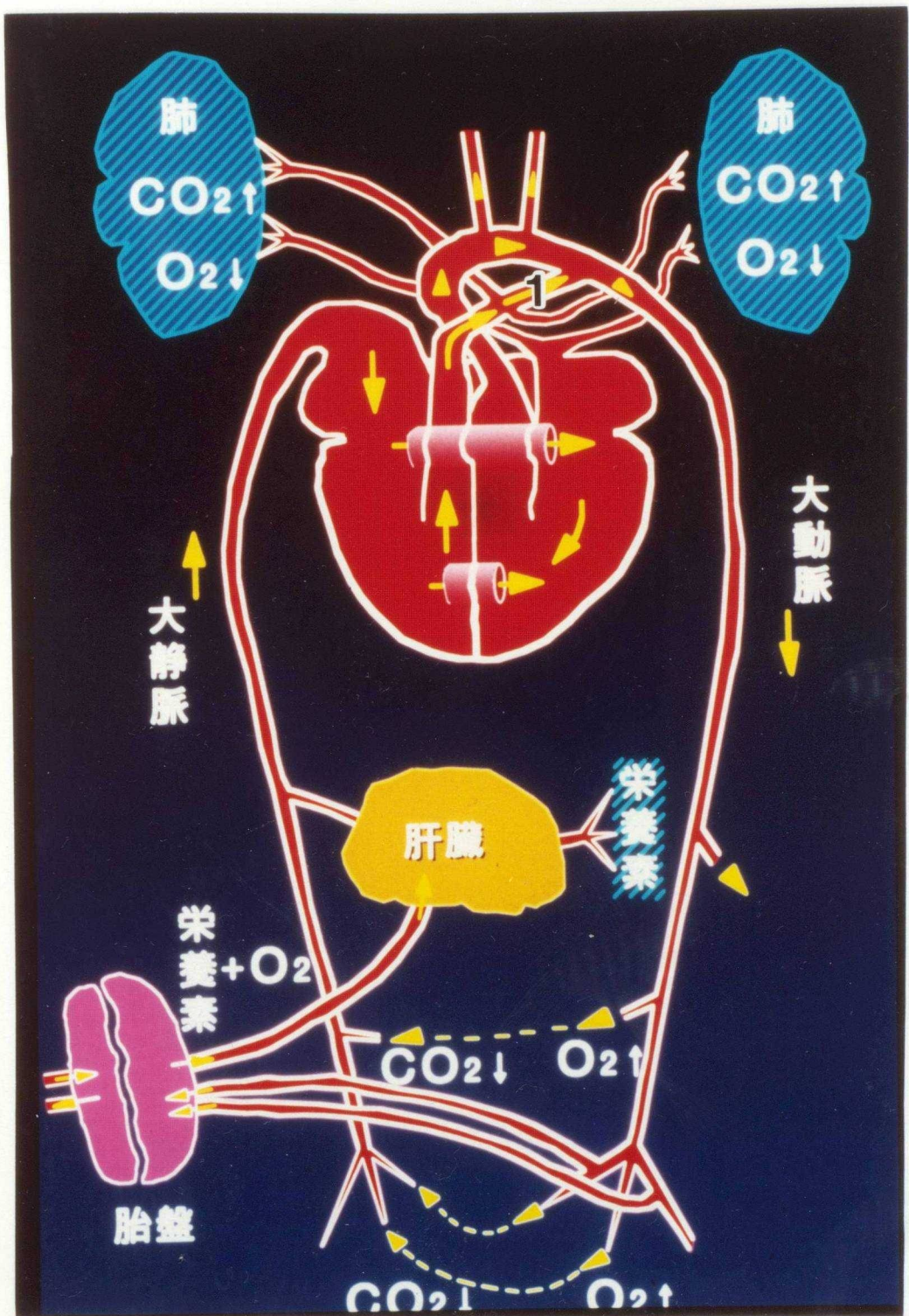


図-1 ジクワット (化学名1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium dibromide) の化学構造式



図一2 胎児循環の模式図

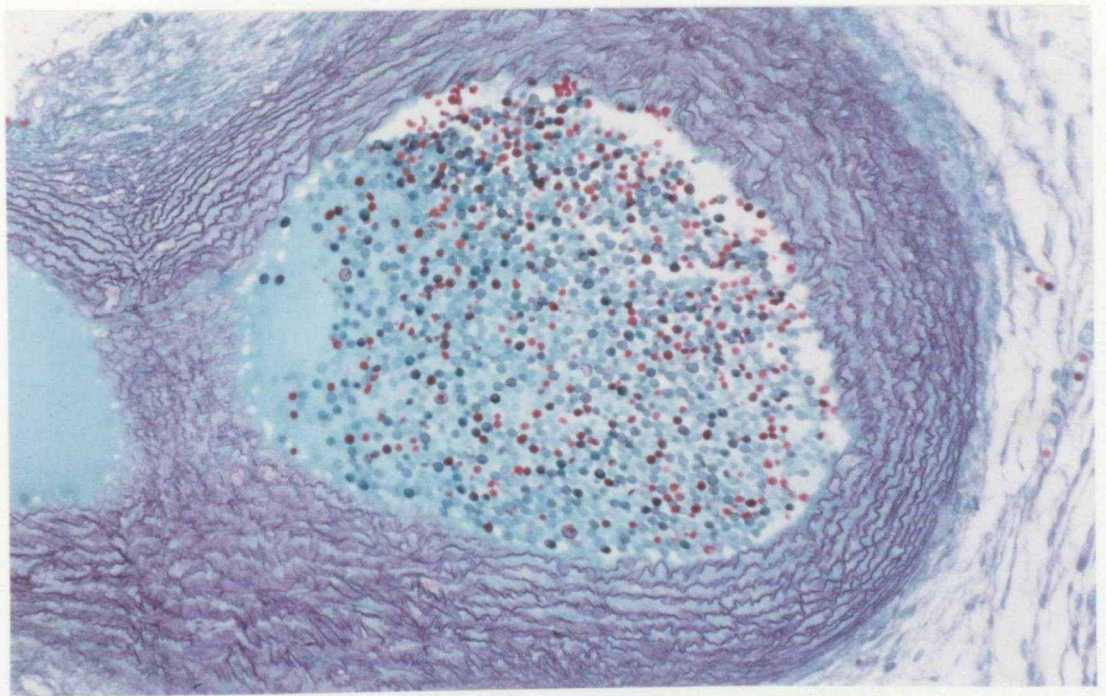
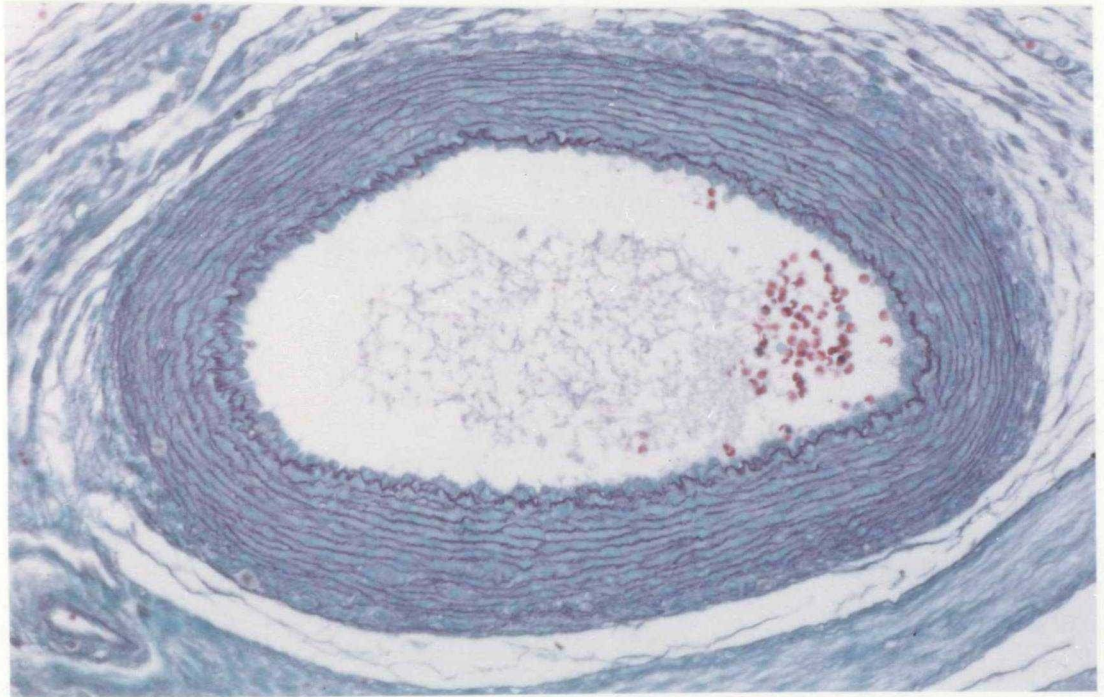
1 : 動脈管

図—3

胎齡21日の動脈管の光学顕微鏡像
(アルデハイド・フクシン染色)
倍率×230

図—4

胎齡21日の大動脈の光学顕微鏡像
(アルデハイド・フクシン染色)
倍率×230



図—5

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—6

コンピューター三次元立体構築による
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)

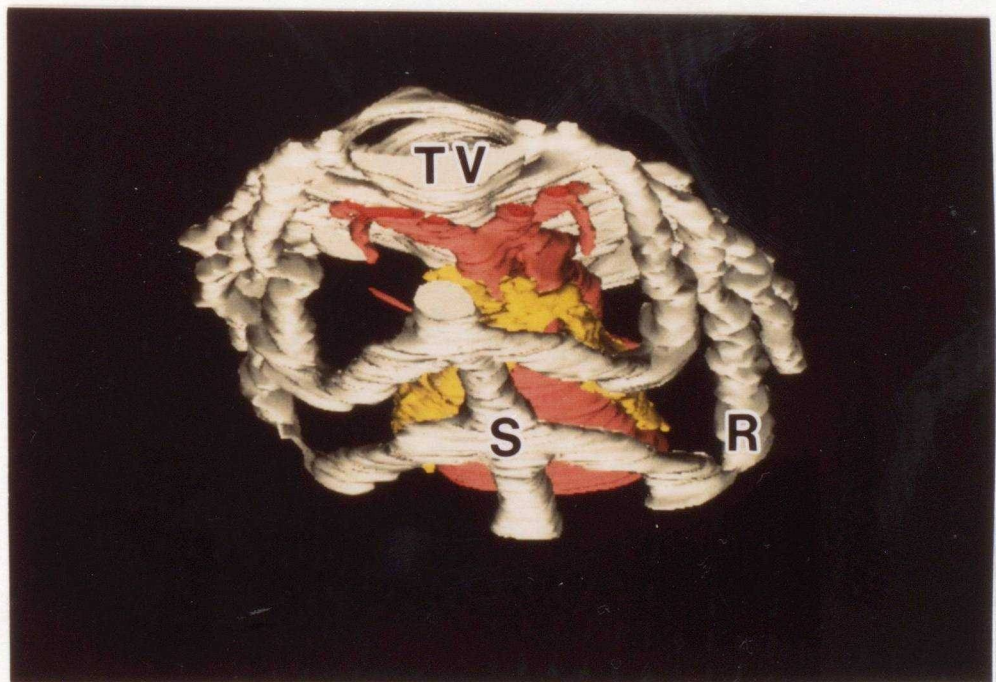
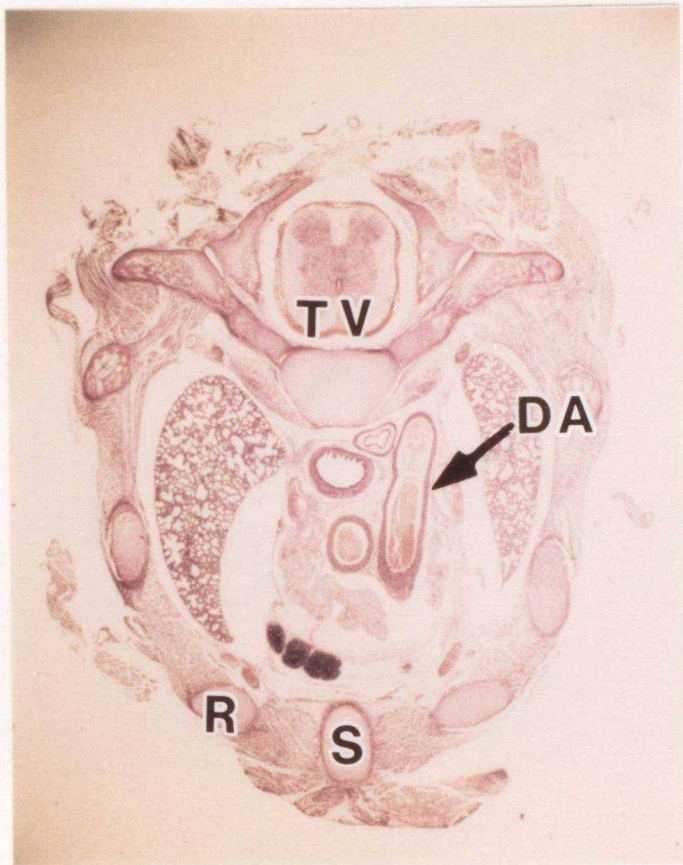


図-7

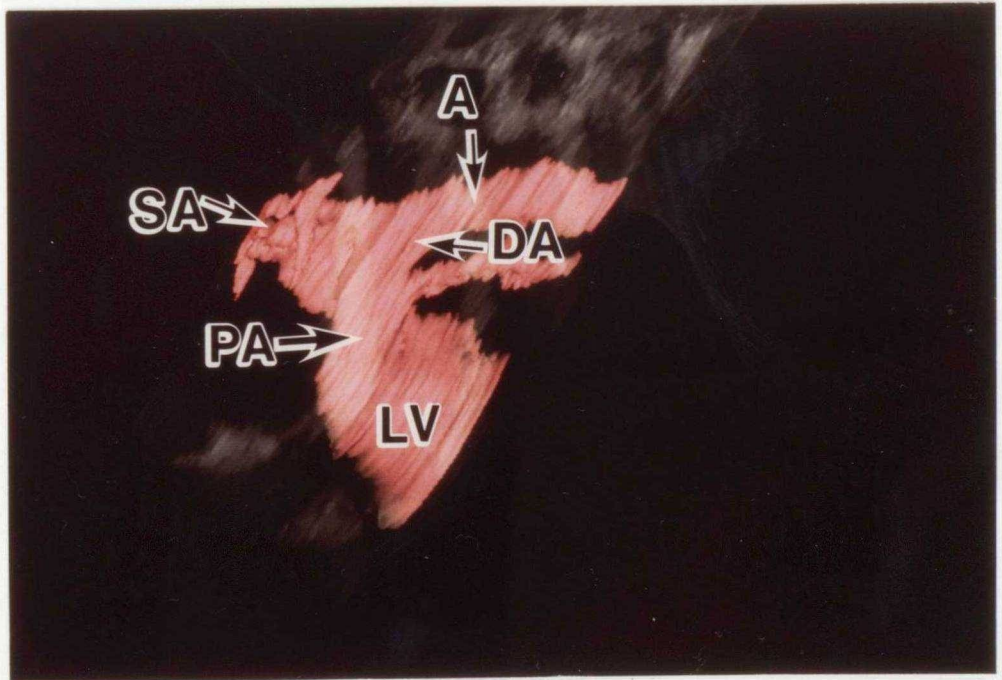
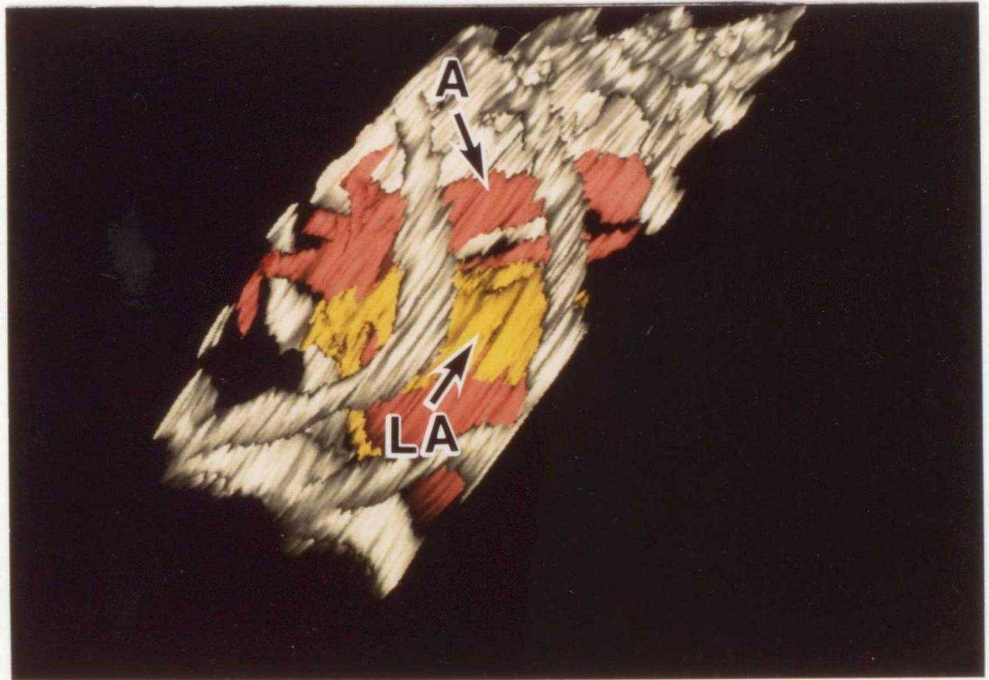
図-6を左側より見た三次元像

A : 大動脈
LA : 左心房

図-8

図-7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

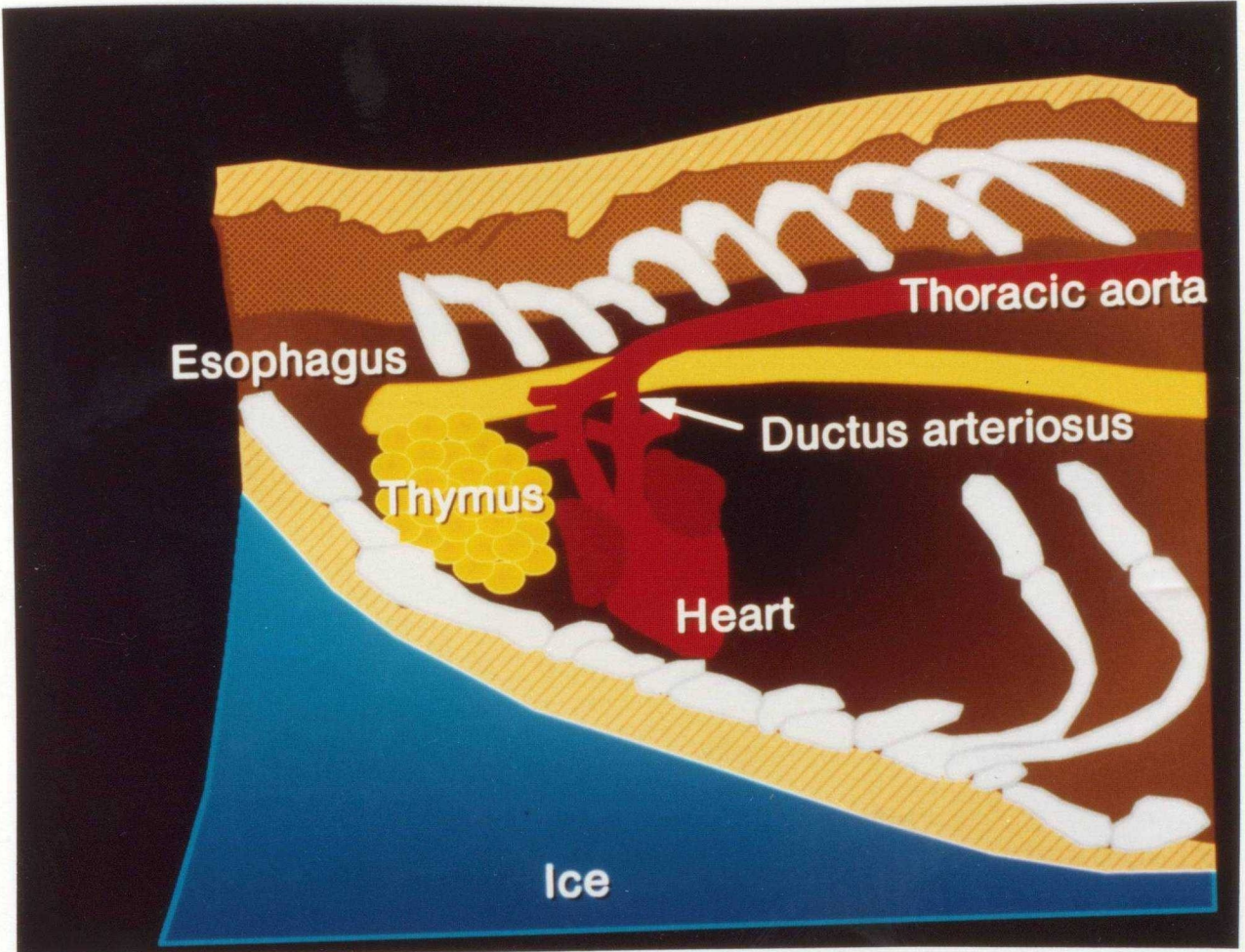


図—9

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—10

急速凍結装置を示す。

- 1 : 急速凍結装置
- 矢印 : 急速凍結された胎子

図—11

計測機器を示す。

- 1 : 実体顕微鏡
- 2 : 簡易凍結装置

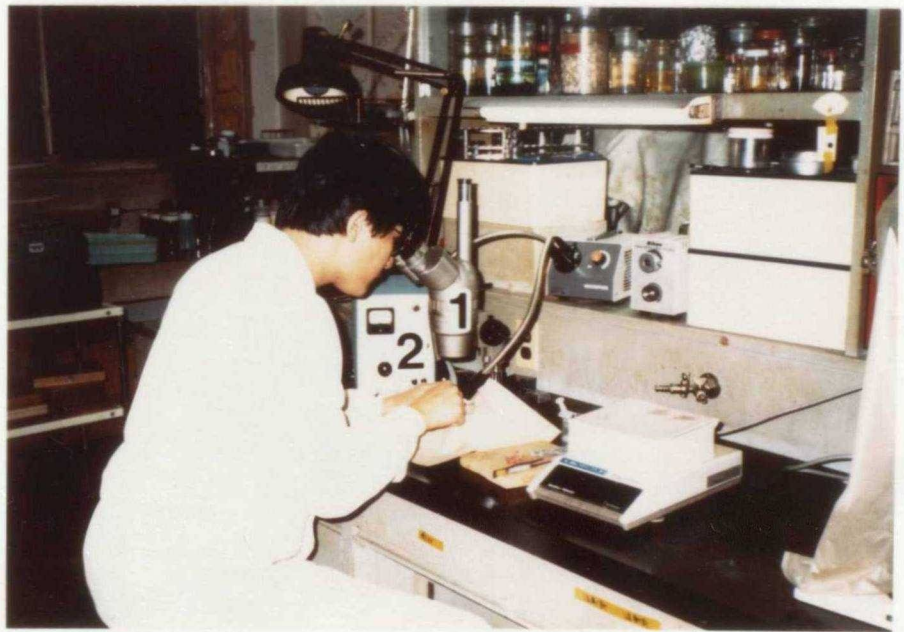
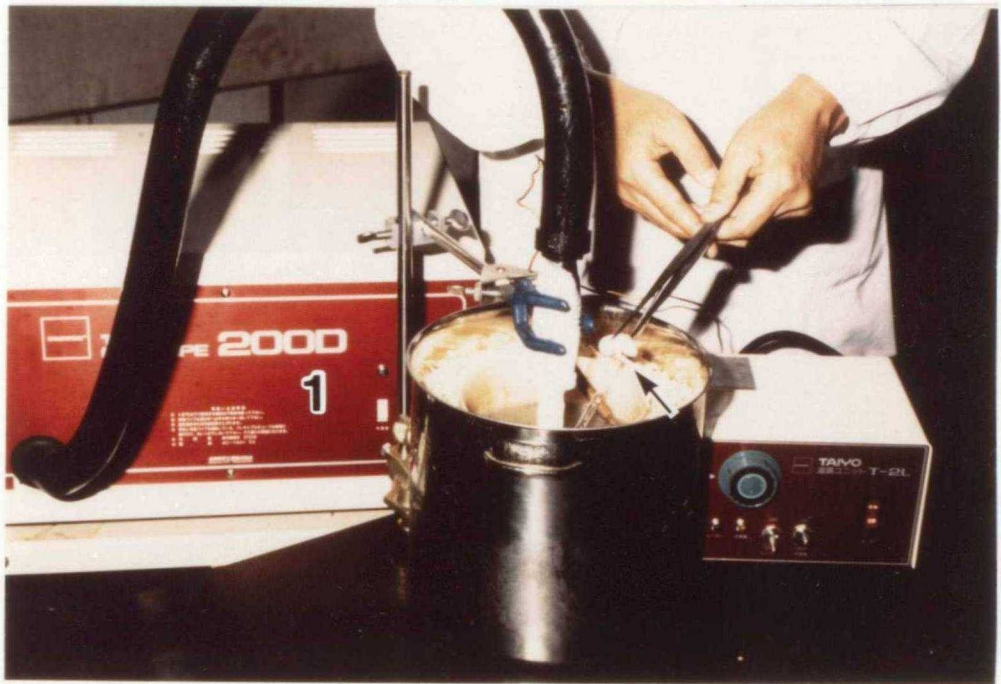


図-12

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

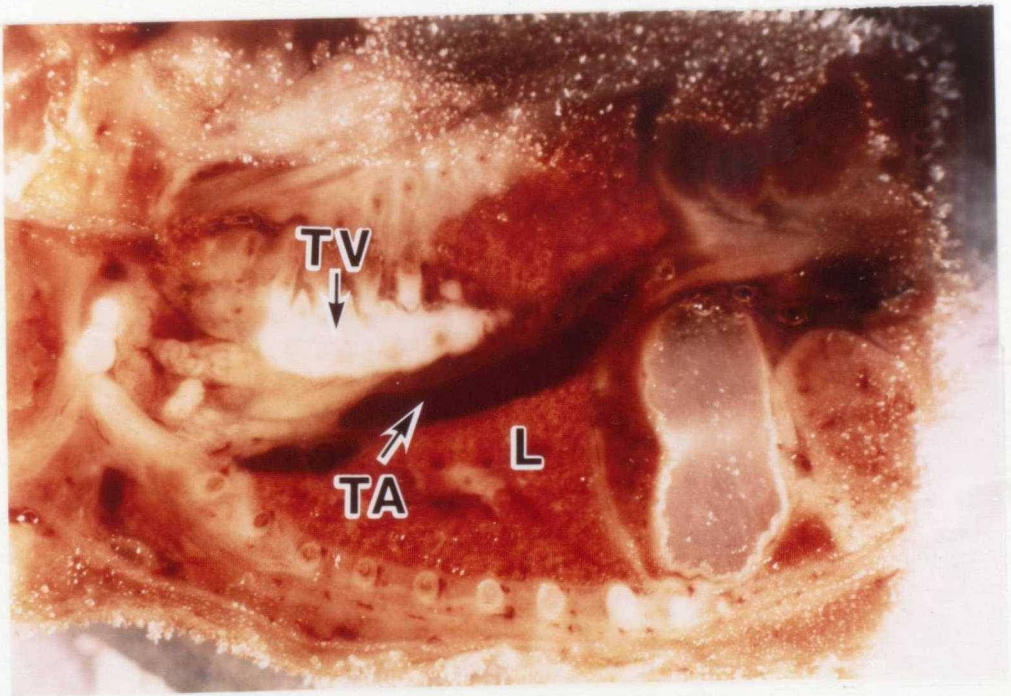
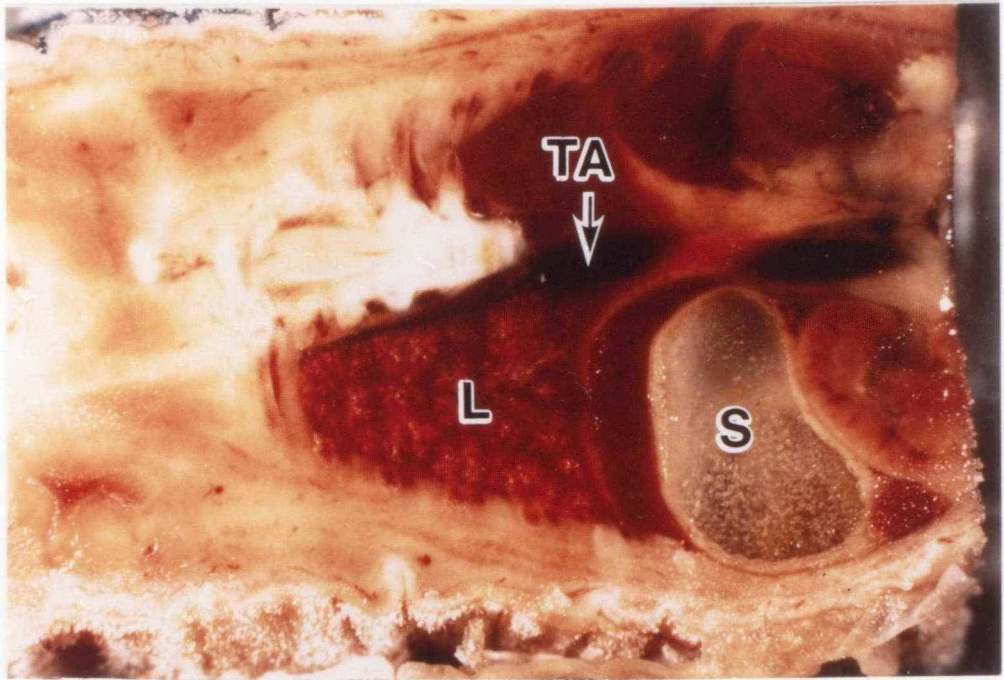
図-13

図-12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。

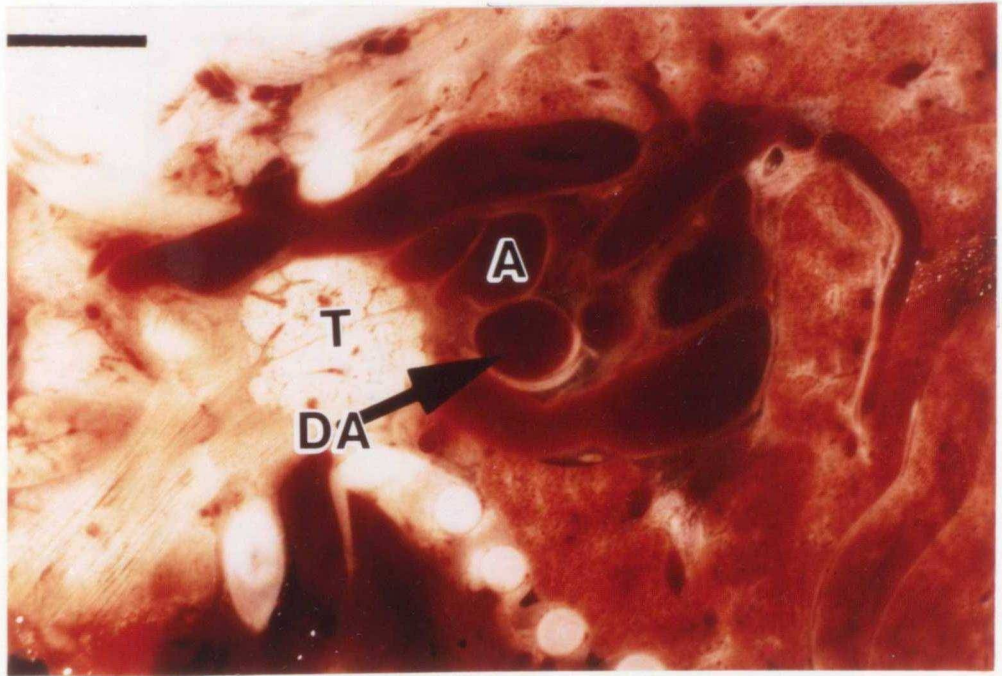
倍率×14

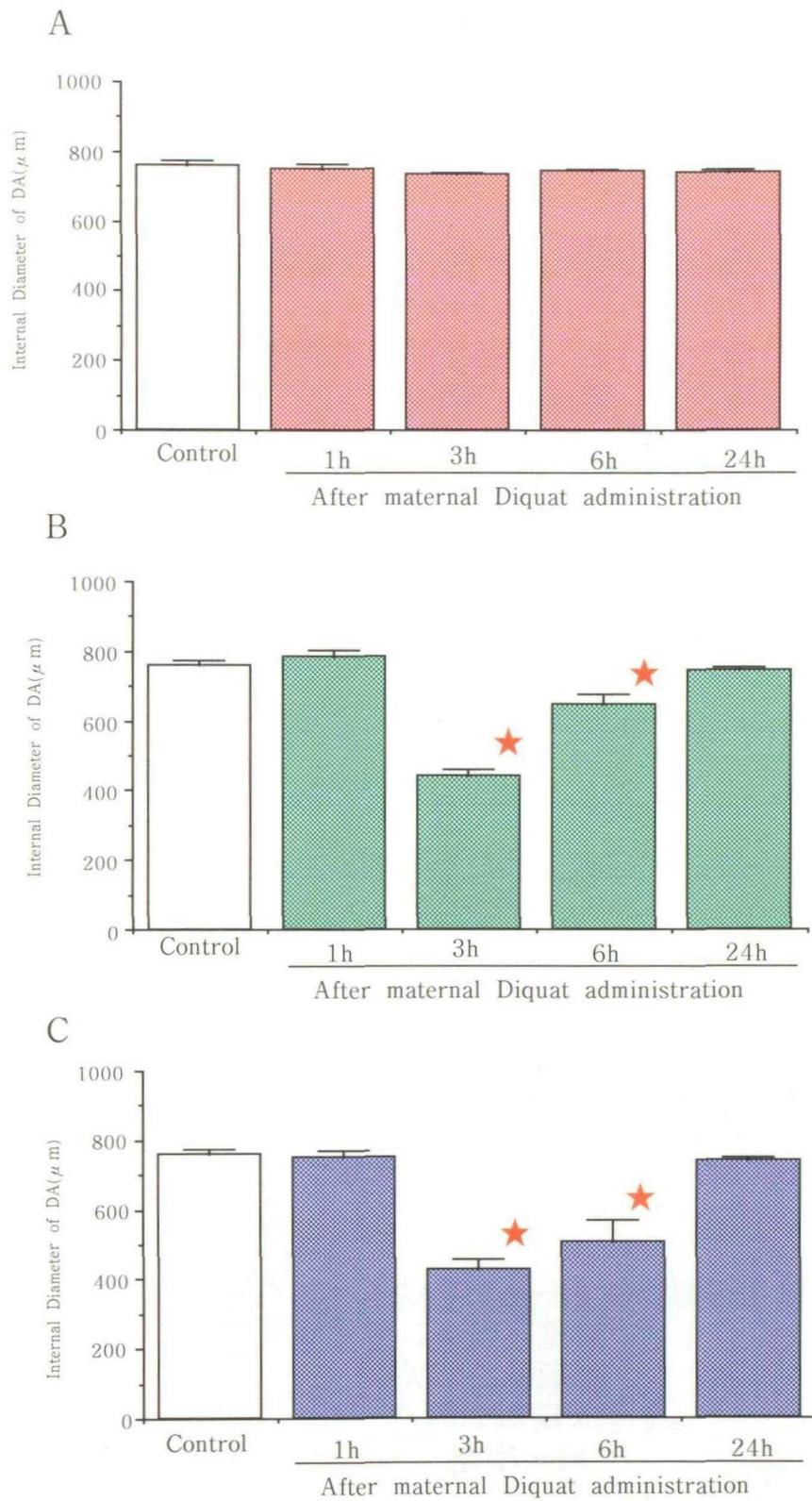


図—14

図—13を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—15 母体へのジクワット投与による胎子動脈管の内径の変化

A:0.5mg/kg投与群, B:2mg/kg投与群, C:7mg/kg投与群

★: Controlとの間に有意差あり ($P \leq 0.05$)

図一16

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

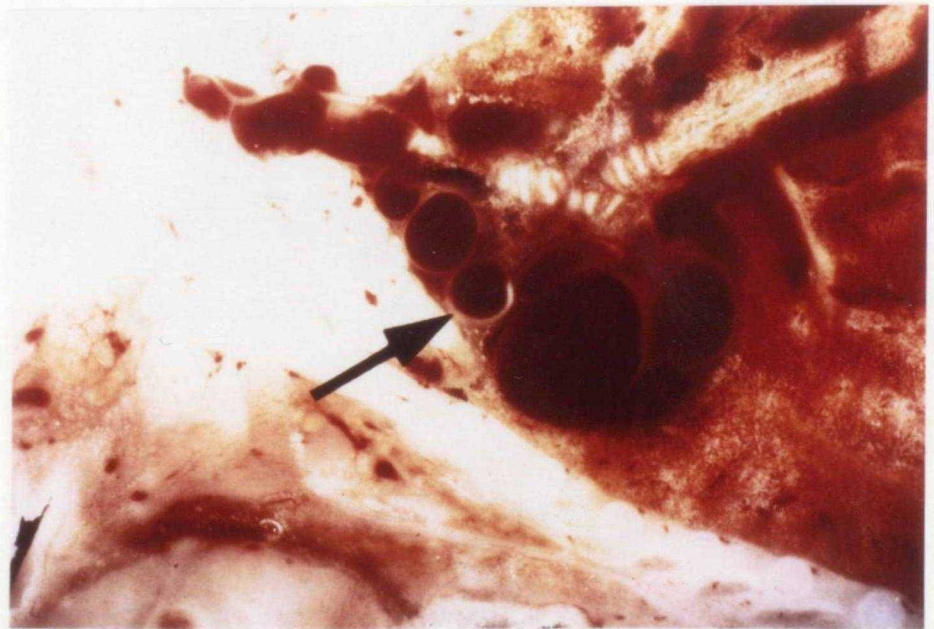
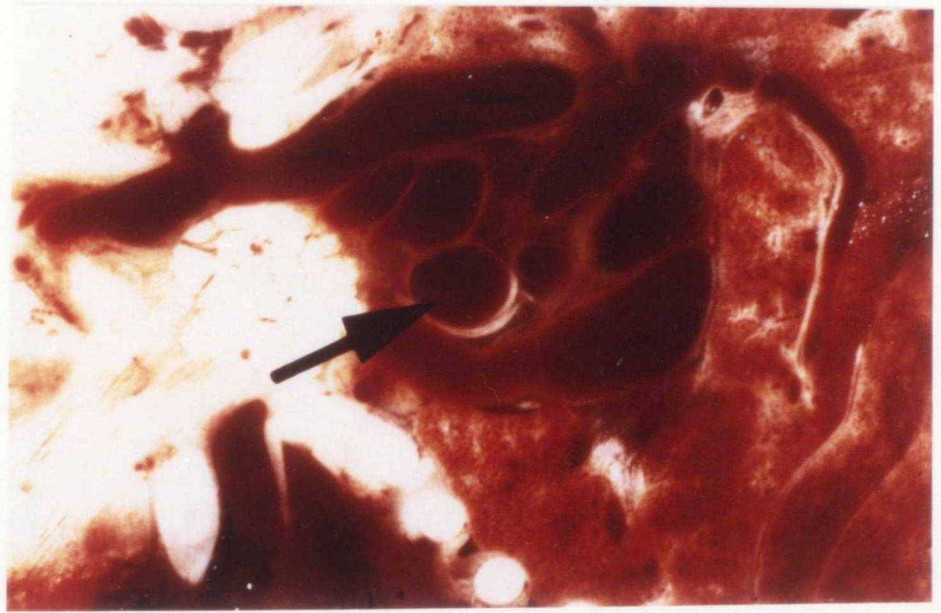
図一17

ジクワット投与7 mg/kg 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



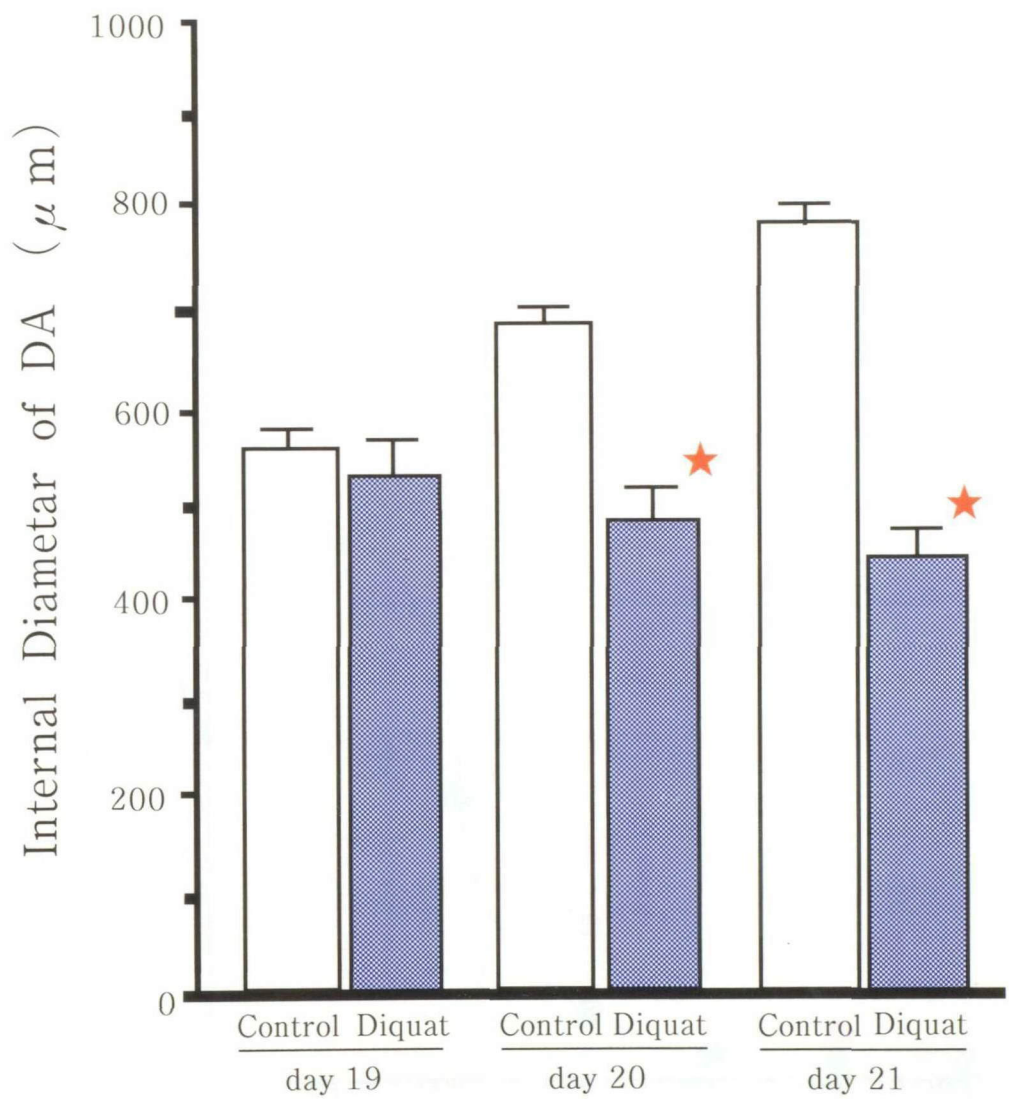


図-18 母体へのジクワット投与によるラット胎子動脈管への影響の臨界期
 ★ : Controlとの間に有意差あり (P ≤ 0.05)

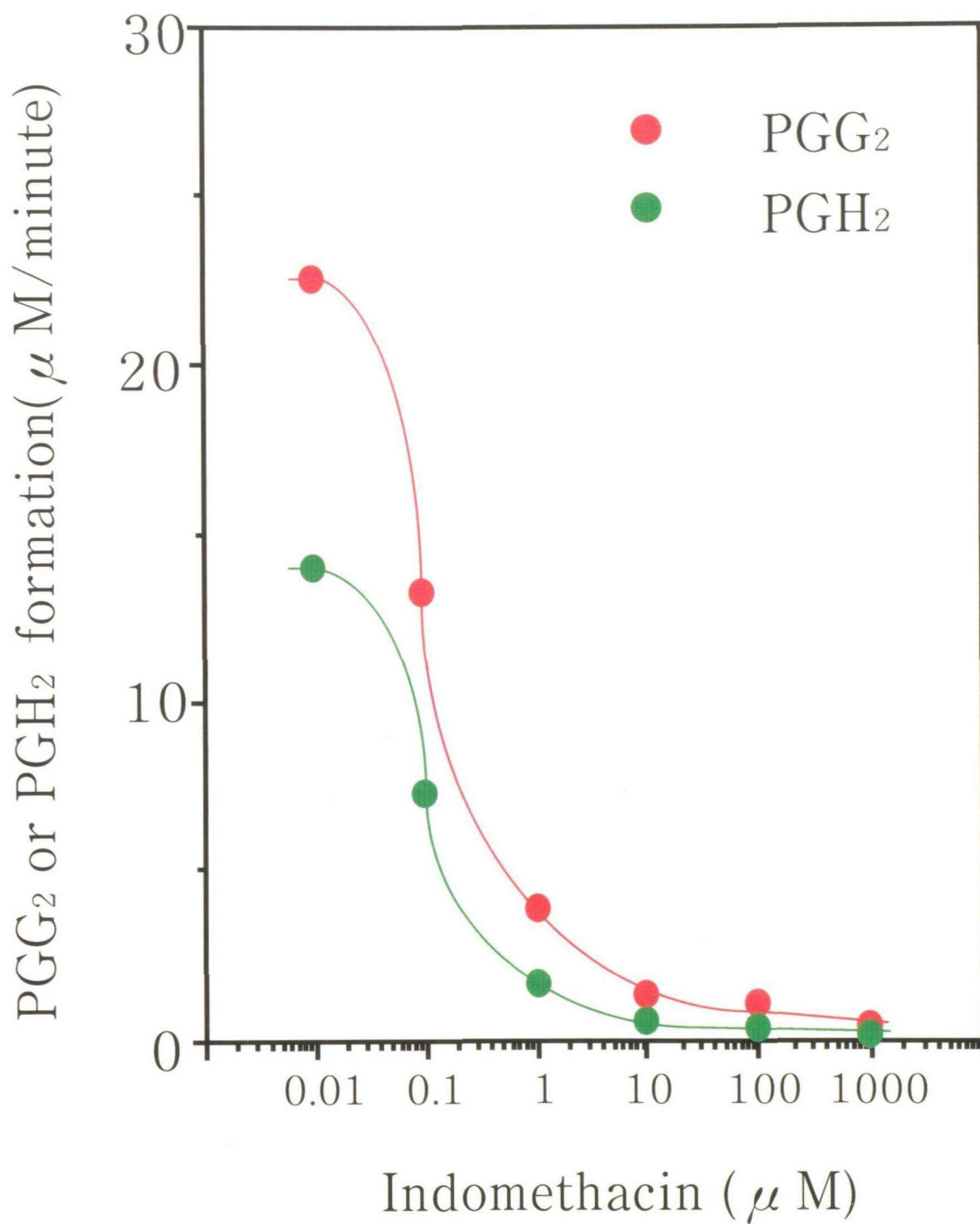


図-19 インドメタシン存在下におけるアラキドン酸からの PGG₂およびPGH₂生成量

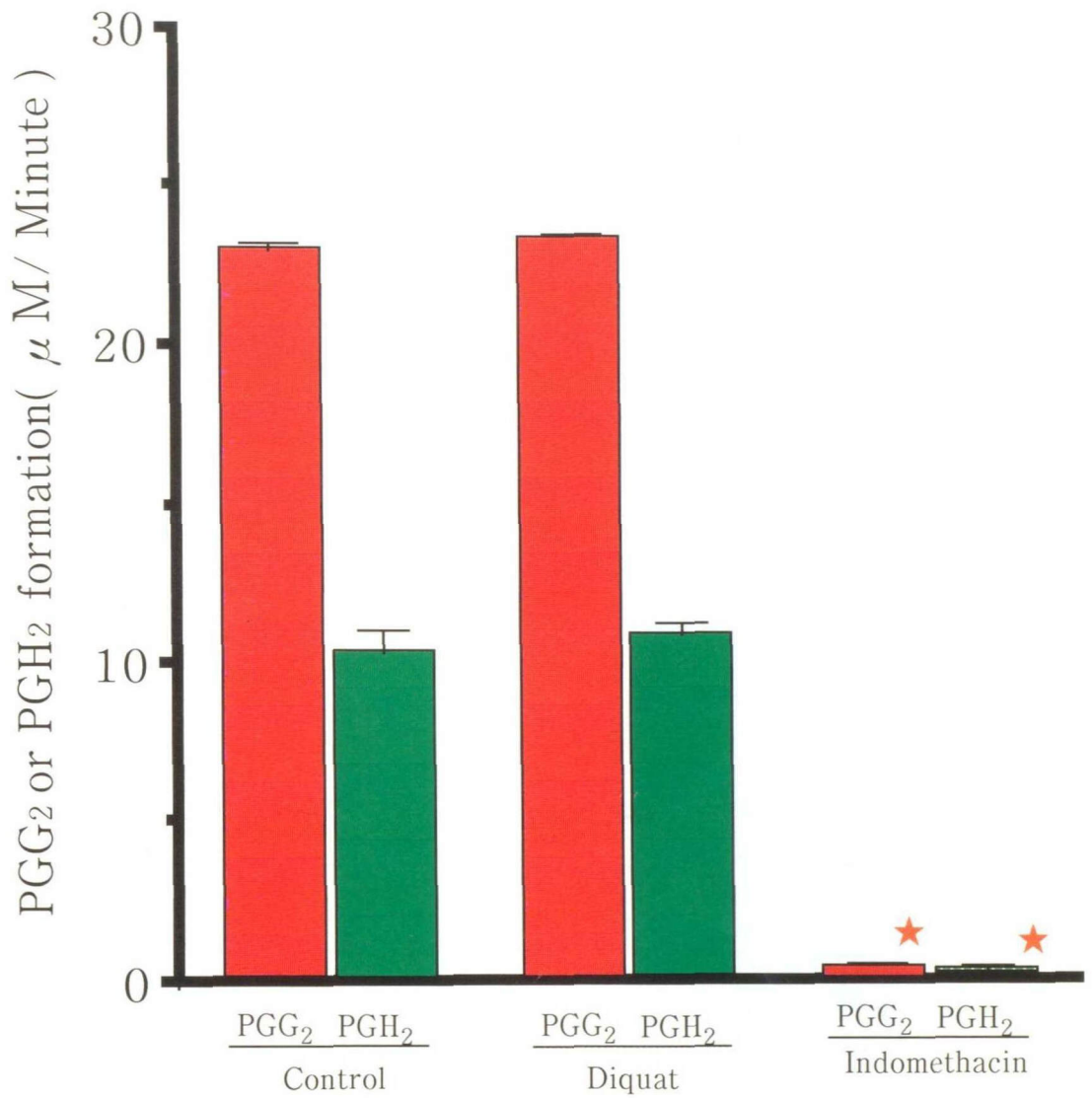


図-20 ジクワットおよびインドメタシン存在下 (1mM) におけるアラキドン酸からのによる PGG₂ および PGH₂ 生成量

★ : Control との間 に有意差あり (P ≤ 0.05)

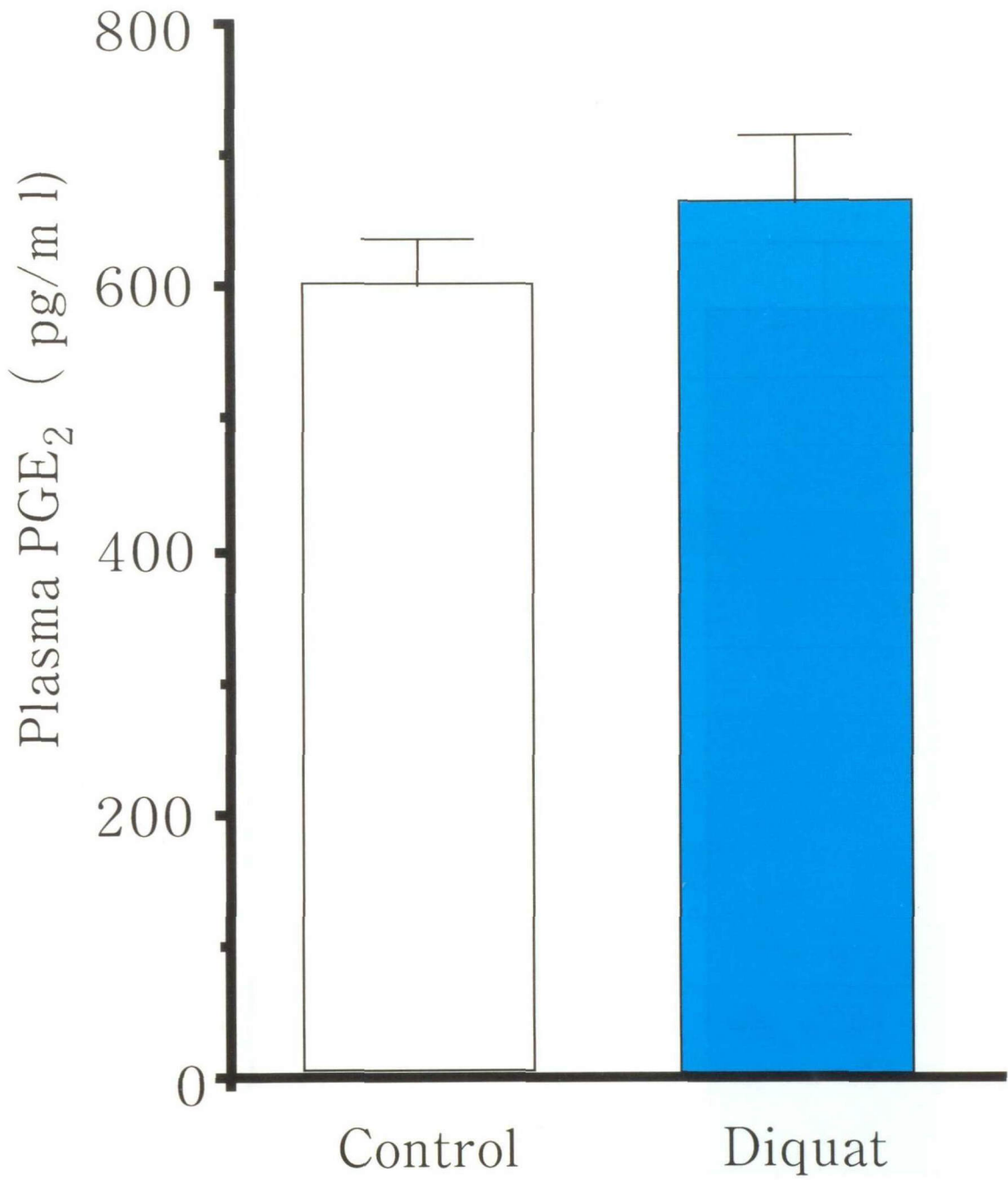


図-21 ジクワット投与後の母体血漿中PGE₂濃度

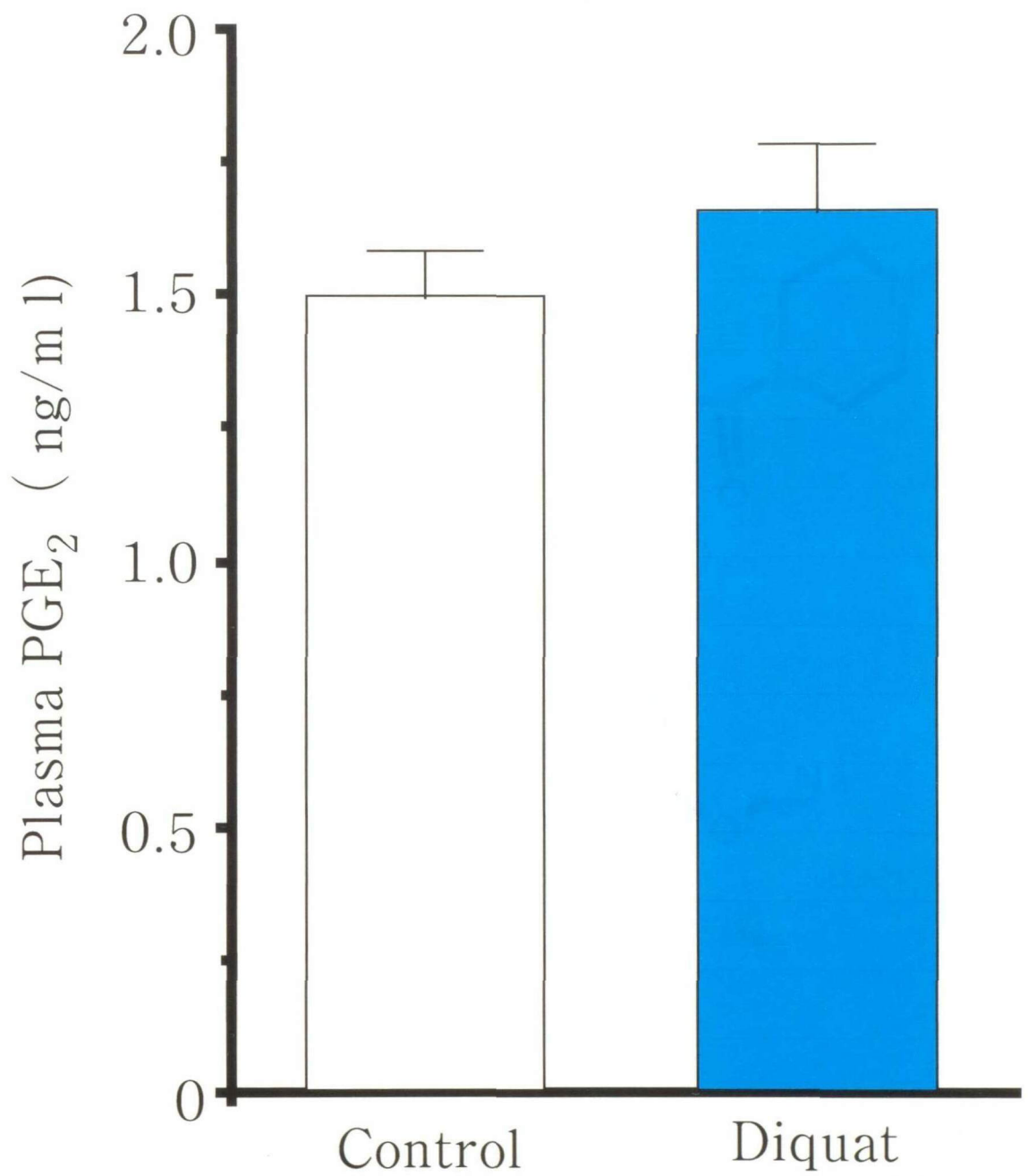


図-22 母体ジクワット投与後の胎子血漿中PGE₂濃度

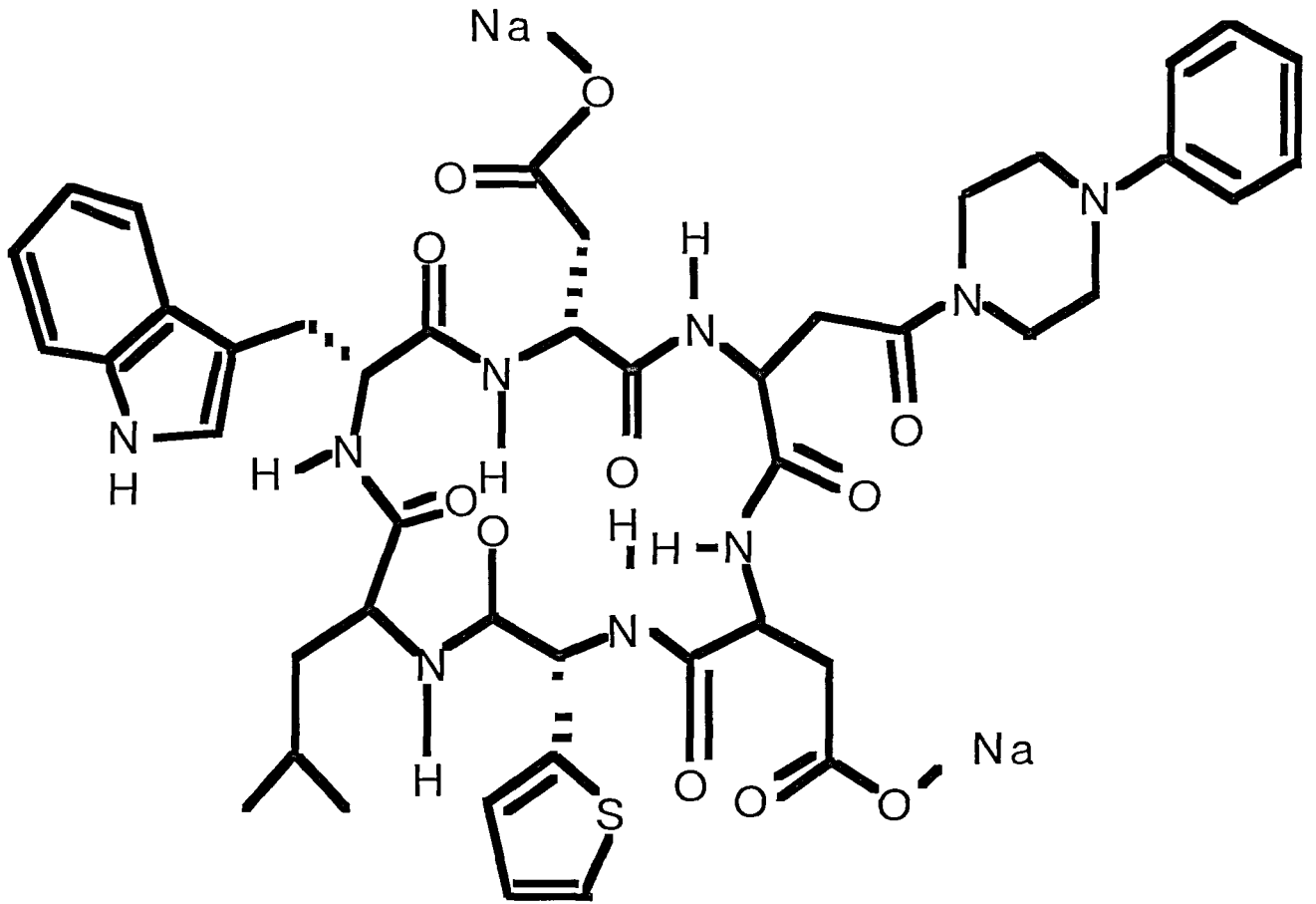


図-23 TAK-044 (化学名cyclo [D- α -aspartyl-3- [(4-phenyl-piperazin-1-yl) carbonyl] L-alanyl-L- α -spartyl-D-2- (2-thienyl) glycylyl-L-leucyl-D-tryptophyl] disodium salt) の化学構造式

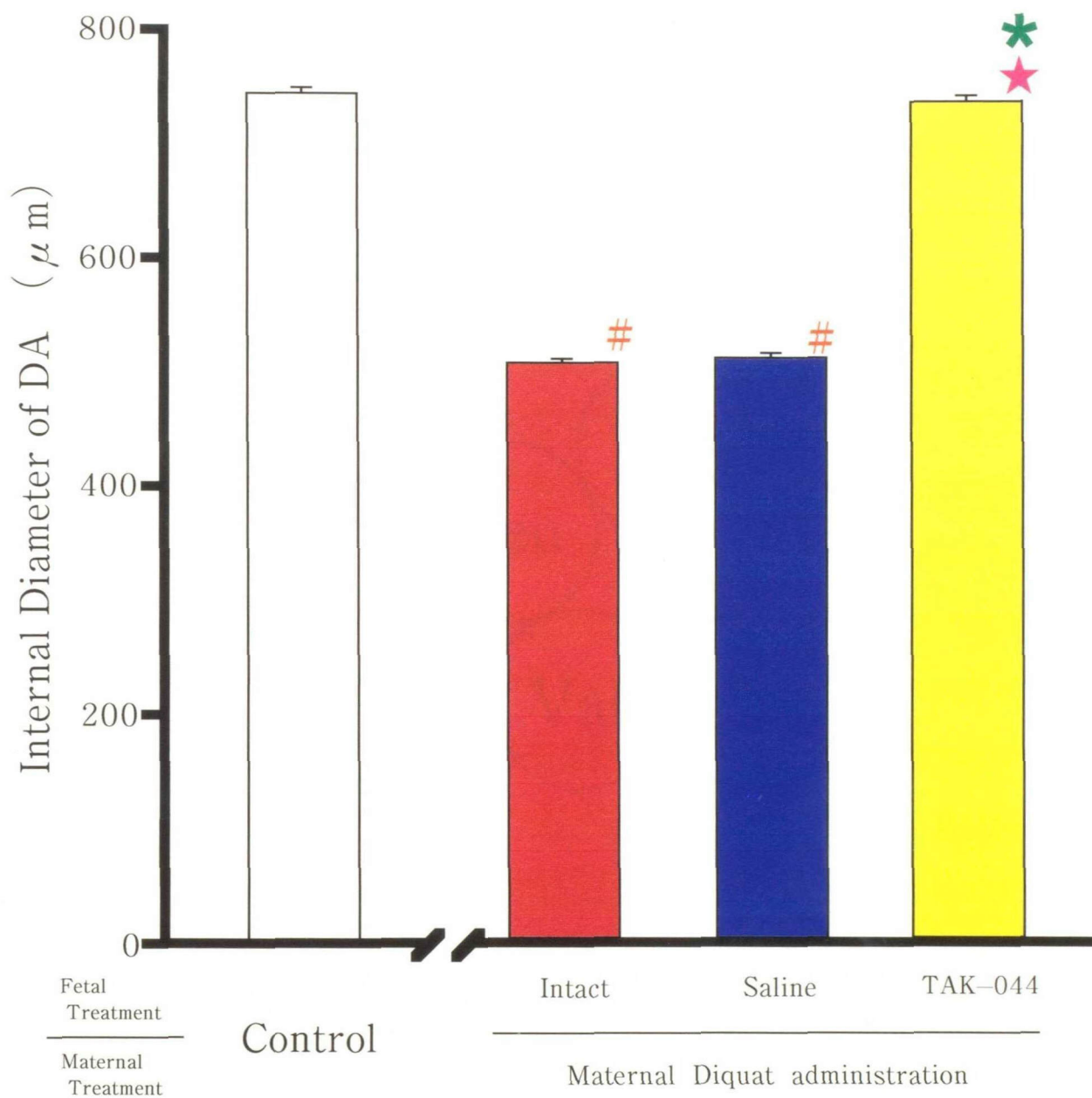


図-24 ジクワット投与による胎児動脈管収縮に対する
 エンドセリン (ETA/ETB) レセプター拮抗薬
 (TAK-044) の影響

: 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 ($P \leq 0.05$)

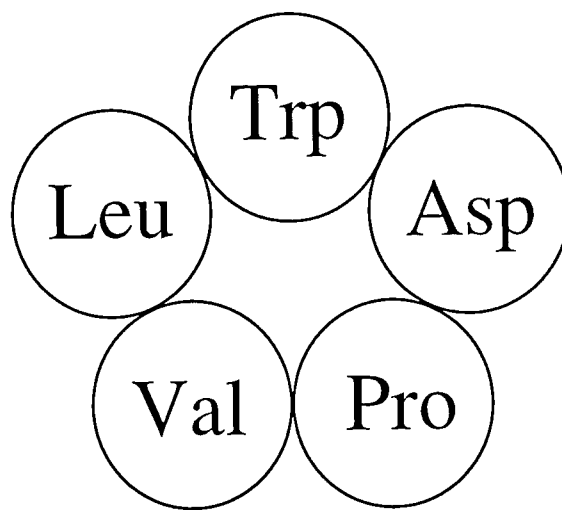


図-25 BQ-123 (化学名Cyclo (D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp))
の化学構造式

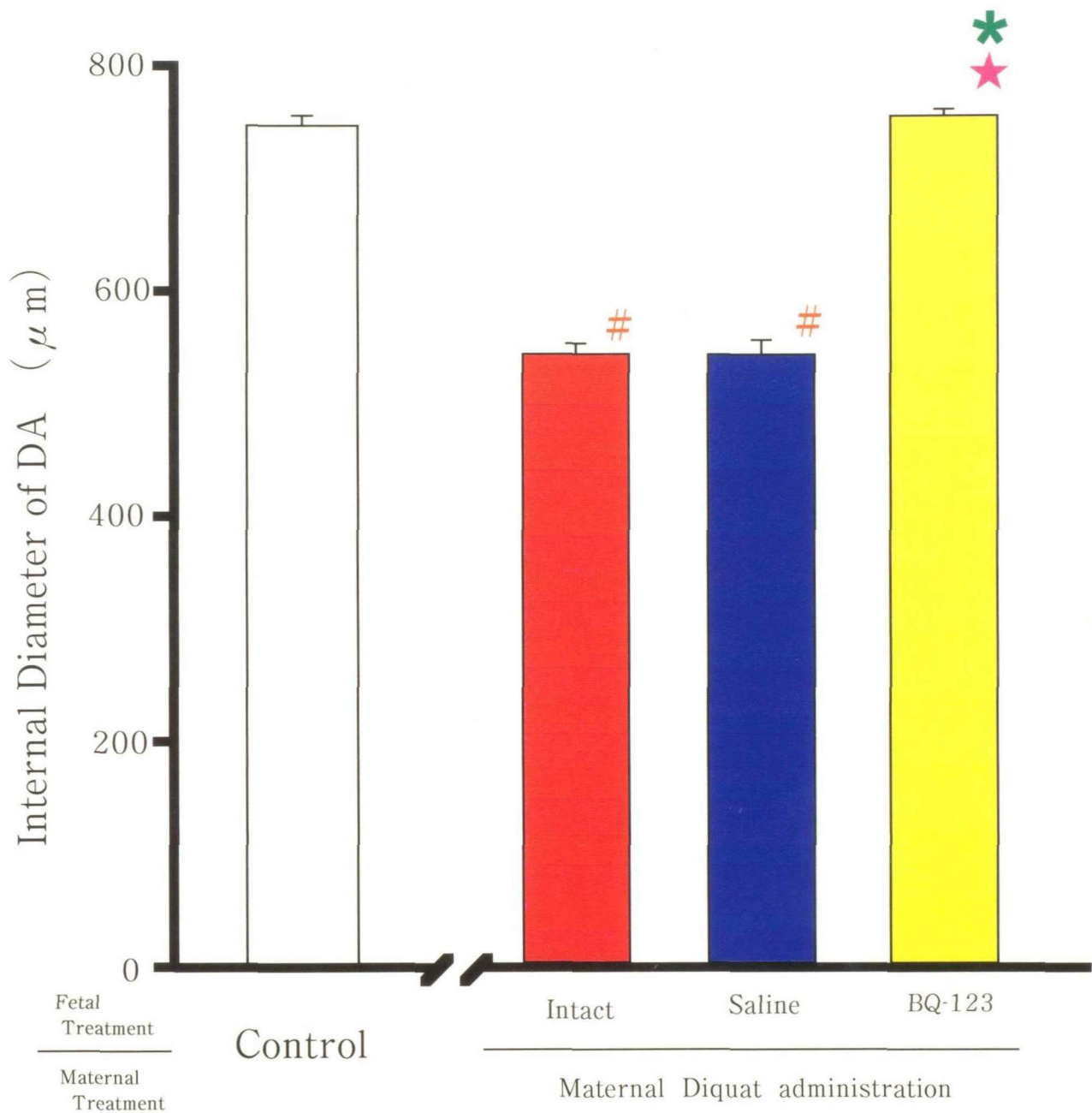


図-26 ジクワット投与による胎児動脈管収縮に対する
 エンドセリン (ETA) レセプター拮抗薬 (BQ-123)
 の影響

- # : 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 ($P \leq 0.05$)