

氏名(本籍)	高木博隆(静岡県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第6号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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—
論文審査委員	(主査) 政岡俊夫 (副査) 有嶋和義 赤堀文昭

### 論文内容の要旨

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)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。その一方で、ヒトや動物の経口暴露による中毒では、口腔、食道等のびらん、潰瘍などの消化器系および肝臓や副腎などの高血流臓器などに対して強い毒性を示すことも知られている。しかしながら、ジクワット毒性に関する報告のほとんどは成体に対するものであり、その発生・生殖毒性に関しては少数の報告がみられるのみで、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と考えられている。

胎子は、栄養分や酸素を母体から胎盤を通して吸収している。また、羊水中で生活しているため胎子の肺は機能していない。そのため、胎子では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を持っている。胎子循環の特徴の一つとして、動脈管の存在がある。

この胎子動脈管は、プロスタグランジン $E_2$ の作用によって、その拡張が維持されており、プロスタグランジン $E_2$ 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を妊娠ラットに投与することによって、胎子動脈管が収縮することが確かめられている。

また近年、エンドセリンが出生後における動脈管の収縮閉鎖に関与しているとの報告がなされ、プロスタグランジン $E_2$ 以外の動脈管調節物質としてエンドセリンの存在が示された。

そこで、本論文は動脈管調節物質プロスタグランジン $E_2$ とエンドセリンに注目し、ジクワットによる胎生期の特殊な血管である動脈管への作用およびその作用機序について、ラットを用いて究明した。

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、0.5mg/kg投与群では動脈管に有意な変化はみられなかったが、2mg/kgおよび7mg/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。2mg/kgおよび7mg/kg投与群でみられた動脈管の収縮を比較すると7mg/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日の母体にジクワットを7mg/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ナーゼ（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 $G_2$  およびプロスタグランジン $H_2$  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 $G_2$  およびプロスタグランジン $H_2$  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 $G_2$  およびプロスタグランジン $H_2$  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ナ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 $E_2$  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 $E_2$  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 $E_2$  濃度には、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 $E_2$  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 $E_2$  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、ジクワットの動脈管収縮作用機序における血管調節ペプチドであるエンドセリン (ET) の関与の有無を明らかにするため、非選択的ET receptor 拮抗薬 (TAK-044) を用いて胎子のETAおよび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害していた。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E<sub>2</sub>を介したものは異なること。
- (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。

## 論文審査の結果の要旨

動脈管は胎生期にのみ存在する血管で、胎生期においては肺動脈と大動脈を結ぶバイパスとして機能し、出生後は呼吸の開始とともに収縮し、ヒトでは10~15時間、ラットでは60~90分で閉鎖する。胎生期における動脈管は、主としてプロスタグランジンE<sub>2</sub>の作用によって、その拡張が維持されていると考えられている。プロスタグランジンE<sub>2</sub>生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を妊娠ラットに投与すると、その胎子において動脈管だけが収縮することは広く知られていることであり、動脈管は他の血管にはない極めて特殊な反応性を有している。

一方、ジクワット（化学名；1,1'-ethylene-2,2'-bipyridylium dibromide）はジピリディリウム系除草剤に分類される農業でわが国を始め世界各国で使用されている。除草剤としての高い有用性とは逆にその毒性についても肝臓は副腎などの高血流臓器などに対して強い毒性を示すことが古くより知られている。近年では、生体内でラジカルに転換すること、また、その過程で種々の活性酸素種を発生することから、その薬理学的・毒性学的作用について非常に興味を持たれている化学物質である。

そこで、本研究ではこの化学物質ジクワットを取り上げ、ジクワットの胎子動脈管に対する作用およびその機序について、特にプロスタグランジンE<sub>2</sub>および新たな血管調整物質として注目されているエンドセリン(ET)に着目してラットを用いて究明することを目的としている。

本論文は六つの章からなっている。

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ている。0.5mg/kg投与群では動脈管に有意な変化はみられなかったが、2mg/kgおよび7mg/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。2mg/kgおよび7mg/kg投与群でみられた動脈管の収縮を比較すると7mg/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を明らかにしている。

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日の母体にジクワットを7mg/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測定している。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と述べている。

第3章では、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明らかにするために、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G<sub>2</sub>およびプロスタグランジンH<sub>2</sub>の生成量を測定している。プロスタグランジンG<sub>2</sub>およびプロスタグランジンH<sub>2</sub>の生成はジクワット存在下において阻害されなかったことから、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と述べている。

第4章では、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E<sub>2</sub>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E<sub>2</sub>濃度を測定している。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E<sub>2</sub>濃度に変化は認められず、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E<sub>2</sub>の合成および代謝過程に何ら影響を及ぼさないと述べている。すなわち、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ざ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E<sub>2</sub>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を明らかにしている。

第5章では、ジクワットの動脈管収縮作用機序における血管調節ペプチドであるETの関与の有無を明らかにするため、非選択的ET receptor拮抗薬（TAK-044）を用いて胎子のETAおよび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ている。あらかじめTAK-044を投与しておくこと、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ことから、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と述べている。

第6章では、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ている。あらかじめBQ-123を投与しておくこと、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たことから、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と述べている。

以上、ジクワットのラット動脈管に対する作用およびその作用機序に関する本研究結果をまとめると、以下のとおりである。

- 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E<sub>2</sub>を介したものは異なること。
- 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こと。

このように本論文は、ジクワットが胎子動脈管が収縮することを明らかにし、さらに、このジクワットの動脈管収縮作用機序にプロスタグランジンE<sub>2</sub>以外の物質、エンドセリンが関与していることを初めて明らかにしたものである。現在まで、動脈管収縮作用を持つ化学物質の収縮作用機序はプロスタグランジンE<sub>2</sub>の生合成阻害と考えられてきたが、本研究によってエンドセリン受容体を介した収縮作用機序の存在を明らかにしたことは、動物応用科学、特に毒性学上、大いに貢献したものと考えられる。よって、博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと判定した。