

ラット周生期における動脈管調節因子の 発現動態とその機能

Characterization of regulators of ductus arteriosus tone in the perinatal rat

有嶋和義, 山本雅子, 白井明志

麻布大学大学院獣医学研究科

Kazuyoshi Arishima, Masako Yamamoto, Mitsuyuki Shirai

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: We studied the effects of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, on the ductus arteriosus (DA) that constricted by maternal indomethacin administration in fetal rat.

Pregnant rats were administered indomethacin (1 and 10 mg/kg) orally 24 hr before cesarean section, and then L-NAME (50 mg/kg) was injected intraperitoneally 3 hr after indomethacin administration. The caliber of the fetal DA was studied with a whole-body freezing method.

Indomethacin alone group showed that the fetal DA was reopened 24 h after maternal indomethacin administration. However, compared with the indomethacin alone group, L-NAME-treated group showed a significant constriction of the DA 24 h after maternal indomethacin administration.

These results indicate that NO has a significant role in the course of reopening of the fetal DA that constricted by maternal indomethacin administration.

1. 目 的

プロスタグランジン (PG) E_2 は、胎生期にのみ存在する血管「動脈管」の胎生期での拡張維持及び出生後の収縮閉鎖に大きく関わっている [1, 2]。胎生期において、indomethacin に代表される非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) の母体への投与がその胎子の動脈管を収縮させることは広く知られている [3, 4]。そのメカニズムは、NSAIDs が PG 合成過程のキー酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することによって、胎子の循環血中 PGE_2 濃度を減少させ胎子動脈管を収縮させると考えられている。我々は、これまでに、妊娠 20 日における母体への indomethacin の投与は、投与後 3 時間において胎子血

漿中 PGE_2 濃度を減少させ、その減少に対応して胎子動脈管を収縮させるが、投与後 24 時間では、胎子血漿中 PGE_2 濃度は減少したままであるのにもかかわらず動脈管が再拡張することから、indomethacin 投与による動脈管の収縮からの回復過程において PGE_2 以外の動脈管拡張因子が発現していることを示唆してきた。そこで、本研究では、胎生期における動脈管の拡張因子として NO が知られていることから、動脈管の indomethacin による収縮からの回復過程に NO が関与しているかどうかについて検討を行った。

2. 方 法

2.1) 使用動物

動物は交配時に 12 ~ 15 週齢に達した雌の Wistar

系ラット（日本クレア(株)）を用いた。動物の飼育は、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ に設定された動物室で行った。飼料として固形飼料 Lobo-MR-Breeder（日本農産工(株)）および水道水を自由給与した。妊娠動物を得るために、雌雄のラットを終夜同じケージに同居させ、翌朝雌の膣垢内の精子の存在を調べて、精子の確認された日を妊娠0日または胎齢0日とし、その時から妊娠雌を個別のケージで飼育した。

2.2) 実験方法

妊娠20日目の母体に indomethacin 1 mg/kg あるいは 10 mg/kg を経口投与し、その3時間後に L-NAME 50 mg/kg を腹腔内投与した。対照として、無処置対照群および indomethacin 投与後 L-NAME の代わりに生理食塩水を投与する L-NAME 非投与群を設けた。剖検は、indomethacin の投与後24時間に行った。剖検の際、母体を断頭法によって死亡させた後、帝王切開により速やかに胎子を取り出し、無呼吸のもとに、冷却器（COOLPIPE200D, タイテック(株)）によって $-45 \sim -50^\circ\text{C}$ に調節されたアセトン中に胎子を投入し凍結させた。凍結した胎子は、観察まで -28°C にて保存した。観察にあたっては、同腹の胎子のうち同程度の体重を示した胎子を4～5匹選び観察を行った。動脈管の観察には、Arishima らによる急速全身凍結法 [3] を用いた。まず、頭部および剣状突起部より後方を切断して除去し、残りの胸部を簡易凍結器（ERECTRO FREEZE MCR802A, コマツエレクトロニクス(株)）の凍結台の上に背面を上にして乗せ、動脈管が水平面に対してほぼ垂直になるように、胎子の胴体の下に水滴をたらし、向きを調節し固定した。この固定した胎子胸部の背面を、実体顕微鏡下でメスを用いて水平に僅かに切り削ぐと胸椎が白く見え、左右の肋骨も確認される。さらに切り進めていくと、中央に胸大動脈そして食道が連続して切断面に現れる。食道を削っていくと動脈管と大動脈の連結部が見られ、ついには動脈管と大動脈が分離する。動脈管が大動脈から完全に分離したところで、実体顕微鏡の接眼レンズに挿入したマイクロメーターを用いて、動脈管の内径を測定した。また、この部位からもう少し切り進め、左右の肺動脈の起始部を認め、さらに1本の肺動脈となったとこ

ろで肺動脈の内径を同様に測定した。得られた動脈管および肺動脈の内径から、“動脈管内径/肺動脈内径”比（以下 DA/PA 比）を算出した。

2.3) 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。

3. 結果と考察

L-NAME 非投与群では、indomethacin（1および 10 mg/kg）投与後24時間の胎子動脈管は無処置対照群と同様に拡張していた。L-NAME 投与群では、indomethacin（1および 10 mg/kg）投与後24時間の胎子動脈管内径はそれぞれの投与量における投与後3時間での値と同等の低値であり、無処置対照群と比較して有意な低値を示していた。また、indomethacin を投与せず L-NAME を投与した群においても胎子動脈管内径は無処置対照群と比較して有意な低値を示した。

生体内において、NO は L-アルギニンを基質として NO 合成酵素（NOS）の触媒作用によって産生される。NOS には、3種類のアイソフォームが存在しており、それぞれ eNOS（血管内皮型）、nNOS（神経型）および iNOS（誘導型）と呼ばれている。これの中で、eNOS は血管内皮細胞に発現しており、内皮細胞で NO が産生されると隣接する血管平滑筋細胞に拡散し、平滑筋を弛緩させることで血管を拡張させる。胎子動脈管においても、ヒツジにおいて動脈管内皮細胞と動脈管内の栄養血管内皮に、動脈管内に栄養血管が存在しないマウスにおいて動脈管内皮細胞に eNOS が局在することが報告されている [5-7]。

本研究では、胎子動脈管の母体 indomethacin 投与による収縮から再び拡張するまでの回復過程において、NO が関与しているかどうかについて indomethacin による収縮が最も強く発現する indomethacin 投与後3時間に NO 合成酵素（NOS）阻害剤である L-NAME を投与しその後の動脈管の変化を検討した。その結果、妊娠20日の母ラットに indomethacin 1 および 10 mg/kg を投与し、その3時間後に L-NAME を投与すると、その子の動脈管は indomethacin の投与後24時間（L-NAME の投与後21

時間)において、対照群と比較して有意な低値を示し、動脈管は収縮していた。観察された胎子動脈管の収縮の程度は、indomethacin 投与後3時間でみられた収縮とほぼ同等であり、indomethacin による収縮が持続し再拡張過程にはないことが明らかとなった。この結果は、胎子動脈管の indomethacin による収縮からの再拡張過程に NO が関与していることを示すものである。

L-NAME を妊娠 20 日に単回投与した群においても、対照群と比較すると胎子動脈管内径は有意な低値を示し、L-NAME にも妊娠末期のラット胎子動脈管の収縮作用があることが認められた。前述のとおり、NO は、プロスタグランジン E₂ とともに胎生期の動脈管の拡張維持をになう調節因子であることはすでに報告されている [8, 9]。しかしながら、これらの報告によるとラットにおいて胎子動脈管のプロスタグランジン E₂ と NO による調節は、胎齢 19 日までの未成熟な時期では NO が優位であり、20 日以降の妊娠末期の胎子においてはプロスタグランジン E₂ が優位にその調節を行っているという。本研究においても、L-NAME の単独投与によっても胎子動脈管は収縮したが、その程度は DA/PA 比でみた場合、対照群の 1.056 ± 0.019 に対して L-NAME 投与群で 0.952 ± 0.021 と軽度なもので、L-NAME の NO 合成阻害による胎子動脈管への影響は胎齢 20 日では強く発現しておらずこれまでの報告を支持する結果であった。一方、indomethacin 投与後3時間に L-NAME を投与した群では、DA/PA 比でみた場合、1 mg/kg 投与群で 0.852 ± 0.067 、10 mg/kg 投与群で 0.480 ± 0.064 と、L-NAME だけによる収縮に比べ強く収縮しており、さらに、indomethacin 投与後3時間での強い収縮が持続する。これらの結果は、胎齢 20 日から 21 日において正常な胎子において NO は動脈管の拡張維持に補助的に作用しているだけなので、阻害されてもその影響は軽度であるが、indomethacin による収縮からの回復過程においては NO が積極的に関与しているために、L-NAME の NO 合成阻害作用によって NO による拡張作用が全く発現できず動脈管の収縮が持続されることを裏付けるものである。

以上のとおり、以上のとおり、胎子動脈管の母体 indomethacin 投与による収縮から再び拡張するまでの回復過程において NO のが重要な役割を担って

いることが示唆された。

4. 要 約

胎子動脈管の母体 indomethacin 投与による収縮から再び拡張するまでの回復過程における NO の関与を検討するために、indomethacin による収縮が最も強く発現する indomethacin (1 and 10 mg/kg) 投与後3時間に NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤である N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 50 mg/kg) を投与しその後の動脈管の変化を観察した。

妊娠 20 日の母ラットに indomethacin を投与し、その3時間後に L-NAME を投与すると、その子の動脈管は indomethacin の投与後24時間 (L-NAME の投与後21時間)において、対照群と比較して有意な低値を示し、動脈管は収縮していた。観察された胎子動脈管の収縮の程度は、indomethacin 投与後3時間でみられた収縮とほぼ同等であり、indomethacin による収縮が持続し再拡張過程にはないことが明らかとなった。

以上のとおり、胎子動脈管の母体 indomethacin 投与による収縮から再び拡張するまでの回復過程において NO のが重要な役割を担っていることが示唆された。

文 献

- 1) Cocceani, F., Olley, P. M. *Can J Physiol Pharmacol*, 51: 220-225, 1973.
- 2) Clyman, R. I., Manuay, F., Roman, C., Pudolph, A. M. *Prostaglandins*, 16: 259-264, 1978.
- 3) Arishima, K., Yamamoto, M., Takizawa, T., Ueda, T., Kusanagi, M., Eguchi, Y. *Acta Anatomica*, 142: 231-235, 1991.
- 4) Kantrowitz, F., Robinson, D.R. McGuire, M.B. *Nature*, 258: 737-739, 1975.
- 5) Clyman, R. I., Waleh, N., Black, S. M., Riemer, R. K., Mauray, F., Chen, Y. Q. *Pediatr Res*, 43: 633-644, 1998.
- 6) Kajino, H., Chen, Y. Q., Chemtob, S., Waleh, N., Koch, C.J., Clyman, R. I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: R278-286, 2000.
- 7) Richard, C., Gao, J., LaFleur, B., Christman, B. W., Anderson, J., Brown, N., Reese, J. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R652-R660, 2004.
- 8) Momma, K., Toyono, M. *Pediatr Res*, 46: 311-315, 1999.
- 9) Takizawa, T., Kihara, T., Kamata, A., Yamamoto, M., Arishima, K. *J Vet Med Sci*, 62: 707-710, 2000.