

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. Constrictive effect of a selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitor, piroxicam, and a selective COX-2 inhibitor, etodolac, on the ductus arteriosus (DA) was investigated in the rat.

Rats were given piroxicam (10, 30, 100 mg/kg) or etodolac (10, 30, 100 mg/kg) on day 21 of pregnancy, and fetal ductus arteriosus (DA) was studied with a whole-body freezing method. All piroxicam-treated groups and the 30 mg/kg and 100 mg/kg etodolac-treated groups showed a significant constriction of the DA 3 hours dose-dependently after maternal each COX inhibitor treatment.

These results indicate that both COX-1 and COX-2 selective inhibitor induce constriction of the fetal DA in a dose-dependent manner as well as non-selective COX inhibitors when administered in late stage of gestation and that both COX-1 and COX-2 regulate ductus arteriosus tone in the fetal rat.

1. 目的

プロスタグランジン (PG) E₂ 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が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 PGE₂ 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。近年、COX には2種類のアイツフォームが存在することが明らかにされ、それらはそれぞれ COX-1, COX-2 と呼ばれている。COX-1 は、構成型でありも

ともと生体に存在し、これによって生成される PG などは消化管の粘膜保護や血圧・血流の維持などのさまざまな生理的機能の調節に関与している。一方、COX-2 は誘導型であり炎症時においてサイトカイン、エンドトキシンなどによって誘導され、炎症部位の PG 産生に関与している。本研究では、動脈管調節因子としての COX の2つのアイツフォーム、COX-1 および COX-2、に着目し、選択的 COX-1 阻害薬 piroxicam と選択的 COX-2 阻害薬 etodolac を用いて、これらのラット胎子動脈管に対する機能を検討するとともに動脈管における COX-1 および COX-2 の局在を明らかにすることを目的とした。

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) 使用薬物

被験物質としてpiroxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2H-1,2benzo-thiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide, Sigma Aldrich社)およびetodolac ((±)-1,8-diethyl-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-b]indole-1-acetic acid, Sigma Aldrich社), 溶媒として5%アラビアゴム(関東化学(株))溶液を用いた。

2.3) 実験方法

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検の3時間前の午前10時にpiroxicamおよびetodolacをそれぞれ10 mg/kg, 30 mg/kg及び100 mg/kgの用量で母体に単回経口投与した。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匹選り観察を行った。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。また、一部の胎子については動脈管を摘出し4%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋し、薄切後、常法に従って抗COX-1血清および抗COX-2血清を用いて免疫染色を行った。

2.4) 統計学的解析方法

得られたデータは、各群の平均値を算出し、一元配置分散分析を行い、群間に差のみられたものについては、さらにTukeyの多重比較検定によって各群間の差の検定を行った。有意水準は5%とした。

3. 結果と考察

3.1) 胎子動脈管内径の変化

Piroxicam投与群：すべてのpiroxicam投与群において対照群と比較して胎子動脈管内径は有意な低値を示した。また、その変化は用量依存的に認められた。

Etodolac投与群：Etodolac 30 mg/kg投与群およびetodolac 100 mg/kg投与群において対照群と比較して胎子動脈管内径は有意な低値を示した。また、その変化は用量依存的に認められた。Etodolac 10 mg/kg投与群の胎子動脈管内径は対照群との間に有意な変化はみられなかった。

3.2) DA/PA比の変化

Piroxicam投与群：すべてのpiroxicam投与群において対照群と比較してDA/PA比は有意な低値を示した。また、その変化は用量依存的に認められた。

Etodolac投与群：Etodolac 30 mg/kg投与群および

etodolac 100 mg/kg 投与群において対照群と比較して DA/PA 比は有意な低値を示した。また、その変化は用量依存的に認められた。Etodorac 10 mg/kg 投与群の DA/PA 比は対照群との間に有意な変化はみられなかった。

3.3) COX-1, COX-2の動脈管における局在

種々の染色条件を用いて、免疫染色を行ったが動脈管に COX-1 および COX-2 の局在を確認することができなかった。

本研究で得られた結果から、インドメタシンに代表される COX-1 と COX-2 の両アイソフォームを阻害する NSAIDs を妊娠末期のラットに投与した場合と同様に、選択的 COX-1 阻害薬および選択的 COX-2 阻害薬を妊娠末期のラットに投与するとその子の動脈管が収縮することを明らかにした。一方で、動脈管における COX-1 および COX-2 の局在ならびに選択的 COX-1 および COX-2 阻害薬投与後の発現動態の変化を免疫組織学的に検索することも目的としたが、結果的にその局在を確認することができなかった。COX-1 および COX-2 は他の動物では、胎子の動脈管に発現量のごくわずかであるもののその局在が報告されていることから [5], ラット胎子動脈管における COX-1 および COX-2 の局在についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

4. 要約

選択的 COX-1 阻害薬 piroxicam と選択的 COX-2 阻害薬 etodolac のラット胎子動脈管に及ぼす影響について検討した。Piroxicam および etodolac において、用量依存的に胎子動脈管は収縮した。一方、免疫組織学的に、動脈管における COX-1 および COX-2 の局在を検索してみたが、その局在を確認することができなかった。本研究では、動脈管における COX-1 および COX-2 の局在を明らかにできなかったが、COX-1 あるいは COX-2 のどちらかの COX のアイソフォームが阻害されても胎子動脈管が収縮することが示され、これらの両方のアイソフォームがともに動脈管の調節に機能し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., Manuary, 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., Hardy, P., Waleh, N., Chen, Y. Q., Mauray, F., Fouron, J. C., Chemtob, S. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 276: R913-R921, 1999.