

NO 生成阻害剤と非選択的及び
選択的シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤の
併用による動脈管収縮作用

学位論文内容の要旨

<はじめに>

胎児動脈管はプロスタグランジン E により拡張し、その合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することで収縮する。また動脈管は一酸化窒素 (NO) によっても拡張し、NO 合成阻害剤である N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により収縮する。COX には COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソザイムが存在する。COX-2 選択的阻害剤は COX-1 阻害による消化管、血小板などへの副作用が少ない抗炎症剤として、慢性関節リウマチなどの治療薬に使用されはじめている。rofecoxib は近年開発された COX-2 選択的阻害剤で、動脈管収縮作用を有する。現在未熟児動脈管開存症の治療に用いられている indomethacin は、COX-1、COX-2 の両方を阻害するため、消化管出血等の副作用がある。L-NAME はエンドトキシンショックでの使用報告があり臨床使用へ向けて研究が進んでいる。

rofecoxib、indomethacin、L-NAME による動脈管収縮作用は投与量依存性であり、低量では十分な収縮が得られない。

今回、rofecoxib 0.3mg/kg と L-NAME 3mg/kg および indomethacin 0.3mg/kg と L-NAME 3mg/kg の併用を行い、低量での併用による動脈管収縮作用を検討した。

<対象と方法>

rofecoxib 0.3mg/kg と L-NAME 3mg/kg、indomethacin 0.3mg/kg と L-NAME 3mg/kg の単独投与と併用を行った。

雌雄別の場所で飼育したラット (Wistar rats) を午後 8 時から午前 8 時までの間の 1 夜間同じ飼育場所に収容し性交を促した。その後膣スミアに精子を確認した場合を妊娠 0 日とした。ラットの妊娠期間は 21.5 日である。

それぞれを単独に投与した群と、併用した群で、投与後 2 時間、4 時間、8 時間後に頸椎脱臼法をした後、帝王切開を施行し胎仔を迅速に娩出した。娩出直後の胎仔を -80°C のドライアイス-アセトン溶液に投入して全身急速凍結法で固定した。凍結固定した胎仔の胸部全額面をマイクロトームで切り、顕微鏡下に断面上の主肺動脈 (P) と動脈管 (D) の内径を計測して動脈管/主肺動脈内径比 (D/P ratio) を求

めた。それぞれを単独に投与した群と併用した群での D/P ratio の比較は unpaired-t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

妊娠時期での収縮の違いを観察するため、以下の実験を施行した。全ての実験で投与後 2 時間、4 時間、8 時間後の D/P ratio を計測した

1) 妊娠の 21 日目(満期近く)の親ラットに、rofecoxib 0.3mg/kg を胃内注入し、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。2) 妊娠の 19 日目(満期以前)の親ラットに、rofecoxib 0.3mg/kg を胃内注入し、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。3) 妊娠 21 日目の親ラットに、indomethacin 0.3mg/kg を胃内注入し、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。4) 妊娠 19 日目の親ラットに、indomethacin 0.3mg/kg を胃内注入し、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。

<結果>

胎仔は全例が奇形のない心臓大血管を有した。

- 1) rofecoxib と L-NAME の投与では 19 日、21 日ともに、2 時間後、4 時間後、8 時間後の全ての時間で、併用で単独投与より有意に動脈管は収縮していた。
- 2) indomethacin と L-NAME の投与では 19 日、21 日ともに、全ての時間で併用で単独投与より有意に動脈管は収縮していた。
- 3) COX 阻害剤の収縮は 21 日で 19 日より強く認められ、L-NAME の収縮は 19 日で 21 日より強く認められた。併用では 19 日、21 日ともに単独投与に対し全ての時間で有意に収縮していた。

<考察>

今回の実験では、indomethacin 0.3mg/kg、rofecoxib 0.3mg/kg、L-NAME 3mg/kg を用いた。妊娠満期で、COX 阻害剤である indomethacin と rofecoxib が L-NAME より強い収縮作用を持ち、妊娠満期以前では L-NAME が COX 阻害剤より強い収縮作用を示した。indomethacin と L-NAME、rofecoxib と L-NAME の併用では妊娠時期に関わらず、ともに単剤投与時に比べ有意に動脈管収縮をきたした。

これまでの報告から、今回の投与量は最大収縮が得られる量に達しておらず、今回の実験でも単独投与においては十分な収縮が得られなかった。また L-NAME と COX 阻害剤では胎仔動脈管収縮作用に妊娠時期による差があり、L-NAME は妊娠満期以前で強い収縮作用を有し、COX 阻害剤は妊娠満期で強い収縮作用を有することが報告されている。胎盤でのプロスタグランジン産生が妊娠後期から満期に増加すること、NO が一般的に細胞増殖と線維化とアポトーシスを抑制することなどから、胎生期の動脈管維持と出生後の動脈管閉鎖に対しては合目的な変化であると思われるが、この詳細な機序は不明である。

indomethacin は未熟児動脈管開存症には 0.1~0.4mg/kg で用いており、rofecoxib はアメリカでは成人で 12.5~50mg/day で用いている。このことから今回の投与量は実際に投与可能な量と考えられる。一方、L-NAME はエンドトキシンショック時の臨床例での使用が報告されているが、副作用の問題が大きく、現時点での早産児への投与は安全性の確認が不可欠である。

今回の結果は、未熟児動脈管開存症の治療において、COX 阻害剤と NO 合成阻害剤である L-NAME の併用は、患児の在胎週数によらず治療効果が期待できることを示

峻する。また両者の併用により、それぞれの投与量を減量できれば、副作用の軽減も期待できる。L-NAME での副作用の問題が残っているが、副作用の少ない COX-2 選択的阻害剤である rofecoxib と NO 合成阻害剤である L-NAME の併用は将来的に未熟児動脈管開存症の治療法として期待できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

NO 生成阻害剤と非選択的及び

選択的シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤の

併用による動脈管収縮作用

胎児動脈管はプロスタグランジン E で拡張し、その合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害すると収縮する。また動脈管は一酸化窒素(NO)によっても拡張し、NO 合成阻害剤である N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により収縮する。COX には COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソザイムが存在する。COX-2 選択的阻害剤は COX-1 阻害による消化管、血小板などへの副作用が少ない抗炎症剤として、慢性関節リウマチなどの治療薬に使用されはじめている。rofecoxib は近年開発された COX-2 選択的阻害剤で、動脈管収縮作用を有する。現在未熟児動脈管開存症の治療に用いられている indomethacin は、COX-1、COX-2 の両方を阻害するため、消化管出血等の副作用がある。L-NAME はエンドトキシンショックでの使用報告があり臨床使用へ向けて研究が進んでいる。rofecoxib、indomethacin、L-NAME による動脈管収縮作用は投与量依存性で、低量では十分な収縮が得られない。申請者は、これらの薬物の低量併用における動脈管収縮作用を検討した。

1) 妊娠の 21 日目(満期近く)の親ラットに、rofecoxib 0.3mg/kg を胃内注入、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。2) 妊娠の 19 日目(満期以前) の親ラットに、rofecoxib 0.3mg/kg を胃内注入、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。3) 妊娠 21 日目の親ラットに、indomethacin 0.3mg/kg を胃内注入、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。4) 妊娠 19 日目の親ラットに、indomethacin 0.3mg/kg を胃内注入、L-NAME 3mg/kg を腹腔内注入した。投与後 2 時間、4 時間、8 時間後に頸椎脱臼法をした後、帝王切開で胎仔を迅速に娩出した。娩出直後の胎仔を-80℃のドライアイス-アセトン溶液で全身急速凍結法で固定後、胎仔の胸部前額面をマイクロームで切り、顕微鏡下に断面上の主肺動脈(P)と動脈管(D)の内径を計測して動脈管/主肺動脈内径比(D/P ratio)を求めた。それぞれを単独に投与した群と併用した群での D/P ratio の比較は unpaired-t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

1) rofecoxib と L-NAME の投与では 19 日、21 日ともに、2 時間後、4 時間後、8

時間後の全ての時間で、併用では単独投与より有意に動脈管は収縮した。

- 2) indomethacin と L-NAME の投与では 19 日、21 日ともに、全ての時間で、併用では単独投与より有意に動脈管は収縮した。
- 3) COX 阻害剤の収縮は 21 日で、19 日より強く認められ、L-NAME の収縮は 19 日で、21 日より強く認められた。併用では 19 日、21 日ともに単独投与に対し全ての時間で有意に収縮していた。

以上から、妊娠満期では、COX 阻害剤が L-NAME より強い収縮作用を示し、妊娠満期以前では L-NAME が COX 阻害剤より強い収縮作用を示すこと、両者の併用は妊娠時期に関わらず、単剤投与時に比べ有意に動脈管収縮をきたすことが明らかとなった。L-NAME と COX 阻害剤では胎仔動脈管収縮作用に妊娠時期による差があり、L-NAME は妊娠満期以前で強い収縮作用を有し、COX 阻害剤は妊娠満期で強い収縮作用を有することは既に報告されている。胎盤でのプロスタグランジン産生が妊娠後期から満期に増加すること、NO が一般的に細胞増殖と線維化とアポトーシスを抑制することなどから、胎生期の動脈管維持と出生後の動脈管閉鎖に対しては合目的的な変化であると思われる。indomethacin は未熟児動脈管開存症には 0.1~0.4mg/kg で用いており、rofecoxib はアメリカでは成人で 12.5~50mg/day で用いている。このことから今回の投与量は人の早産児にも投与可能な量と考えられる。一方、L-NAME はエンドトキシンショック時の臨床例での使用が報告されているが、副作用の問題が大きく、現時点での早産児への投与は安全性の確認が不可欠である。しかし、未熟児動脈管開存症の治療において、COX 阻害剤と NO 合成阻害剤である L-NAME の併用は、患児の在胎週数によらず治療効果が期待できることを示唆する。また両者の併用により、それぞれの投与量を減量できれば、副作用の軽減も期待でき、将来的に未熟児動脈管開存症の治療法として期待できると考えられる。

公開発表に際し、副査の安田慶秀教授から、動脈管と他の動脈との間で薬物反応性の差がでる機序、組織学的な差、NO 産生と内皮細胞成熟との関係などについて、副査の北畠顕教授から NO 阻害剤の副作用、NO 阻害剤投与と生体における NO 産生変化との相関などについて、ついで主査の小林邦彦教授から、胎児での研究の早産児への応用の問題点、今後の研究の方向性などについて質問があった。最後にフローアから、動脈管の変化時の分子生物学的変化について質問があったが、申請者は、自験例や文献を引用して概ね妥当な回答を行った。

本研究は、未熟児動脈管開存症の薬物治療に対する基礎的研究で、今後の副作用の少ない有効な治療法としての併用療法の開発につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。