

学位論文題名

Teratogenicity of nitrous oxide

(亜酸化窒素の催奇性)

学位論文内容の要旨

亜酸化窒素は、今日に至るまで150年以上にわたって広く臨床麻酔で使用されている。しかしながら、亜酸化窒素は動物実験による催奇性が証明されており、その妊婦への使用の是非がこれまでにたびたび論争されてきた。にもかかわらず、亜酸化窒素による催奇性のメカニズムはこれまでよく解明されていなかった。一連の研究においてラットの *in vivo* 及び *in vitro* の実験モデルを用いて、そのメカニズムを研究し、その成果をこの論文に要約した。

これまでにわかっている亜酸化窒素の生化学的な作用は、メチオニン合成酵素阻害作用である。亜酸化窒素は、この酵素の助酵素であるビタミン B<sub>12</sub> を不活化することによってメチオニン合成酵素の活性を阻害し、生体内の DNA 合成障害とメチル反応障害を引き起こす。このどちらもが、成長を阻害し奇形を誘発すると考えられている。そこで、メチオニン合成酵素の生成産物である葉酸化合物やメチオニンを投与することによって、亜酸化窒素の催奇性を阻害することができるという仮説をたて、検証した。

一方、メカニズムは未だに解明されていないが、亜酸化窒素の生理学的な作用として交感神経刺激作用がある。このことから、交感神経刺激作用によって子宮血流量が低下し催奇性が誘発される、という仮説をたてた。この検証のために、子宮血流量を改善することが報告されているアドレナリン作動性  $\alpha_1$  受容体 (以下  $\alpha_1$  受容体) 阻害薬を投与し、亜酸化窒素の催奇性に対する影響を調べた。さらに、亜酸化窒素によって誘発される内臓転位症が  $\alpha_1$  受容体刺激作用によるという仮説をたて、一連の実験を行った。

*In vivo* の実験モデルは、1967年に Fink らが確立したものを応用した。Fink らは、妊娠ラットの胎生9日目に、50-75%亜酸化窒素を48時間以上にわたって暴露させ、胎生21日目(予定出産日の一日前)に胎児の成長過程を精査すると、高頻度の骨格異常や成長障害が見られることを確立した。本研究では、75%亜酸化窒素の24時間暴露をさまざまな胎生日に行い、それら以外にも奇形が誘発されるかどうかを調べた。それに加えて、亜酸化窒素暴露と同時に様々な薬物投与を行い、それぞれの催奇作用に対する阻害の有無を調べた。

*In vitro* の実験モデルは、1970年代に New らによって確立された「Whole Embryo Culture System」(全胚芽培養)を応用した。妊娠ラットの胎生8あるいは9日目に全胚

芽を顕微鏡下に摘出し、回転式培養ボトルを用いて48-72時間にわたって培養し、胚芽の成長過程を顕微鏡下に精査した。亜酸化窒素は培養ボトルの中のガス層に飽和させ、また培養液中に種々の薬物投与を行うことによって、それぞれの薬物の亜酸化窒素による催奇作用に対する阻害の有無を調べた。この実験モデルの有利な点は、母体を介した間接作用を排除することによって、亜酸化窒素の胚芽への直接作用を調べることができるということと、種々の薬物の効果を系統的により容易に調べることができるということである。

*In vivo* の実験モデルを使用した実験から、次のような結果が得られた。亜酸化窒素に対する催奇作用が強く誘発されるのは、胎生8, 9, 及び11日目である。胎生8日目の亜酸化窒素暴露によって、流産、軽度の骨格異常(肋骨及び椎骨の異常)、そして内臓転位症が誘発される。内臓転位症の誘発は今までに報告のない新しい発見であった。胎生9日目の亜酸化窒素暴露によって、重度の骨格異常が誘発される。胎生11日目の亜酸化窒素暴露によって、流産のみが誘発される。葉酸化合物の投与は、軽度の骨格異常は阻害したが、他の催奇作用に対しては効果がなかった。フェノキシベンザミン(長時間作用性 $\alpha_1$ 受容体阻害薬)は、流産と軽度の骨格異常は阻害したが、他の催奇作用に対しては効果がなかった。

*In vitro* の実験モデルを使用した実験からは、次のような結果が得られた。メチオニン投与によって、内臓転位症以外の亜酸化窒素によるほとんどの催奇作用が阻害された。それに対し、葉酸化合物の投与はほとんど効果がなかった。*in vivo* と *in vitro* の実験モデルでは、観察される催奇作用が異なることに留意する必要がある。 $\alpha_1$ 受容体阻害薬であるプラゾシン(フェノキシベンザミンより特異性の高い $\alpha_1$ 受容体阻害薬)が亜酸化窒素による内臓転位症を阻害した。 $\alpha_1$ 受容体刺激薬であるフェニレプリンのみでも内臓転位症を誘発した。さらに、そのメカニズムに細胞内カルシウムの増加によるカルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ2型の活性化が関与していることを証明した。

今回の一連の研究によって、多くのメカニズムが亜酸化窒素による催奇性の原因として関与していることが証明された。その中でも大きな要素は、亜酸化窒素の、1)メチオニン合成酵素阻害作用、2)交感神経刺激作用、の二つである。メチオニン合成酵素阻害作用は、DNAの合成障害とメチル反応障害を引き起こす。特に後者は、亜酸化窒素による催奇性の最も重要な要素である。交感神経刺激作用は、母体の子宮血流量低下と胎児に対する直接の $\alpha_1$ 受容体の活性化を引き起こす。特に後者は、内臓転位症を誘発する。メチオニンの亜酸化窒素による催奇性を阻害するメカニズムをさらに解明していくのが、今後の課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劍 物 修  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## Teratogenicity of nitrous oxide

(亜酸化窒素の催奇性)

まず、学位論文の要旨について以下のような発表が行われた。

一連の研究においてラットの *in vivo* 及び *in vitro* の実験モデルを用いて、亜酸化窒素による催奇性のメカニズムを研究した。これまでに解明されている亜酸化窒素の生化学的な作用はメチオニン合成酵素阻害作用である。そこでメチオニン合成酵素の生成産物である葉酸化合物やメチオニンを投与することによって、亜酸化窒素の催奇性を阻害することができるという仮説をたて検証した。一方、メカニズムは未だに解明されていないが、亜酸化窒素の生理学的な作用として交感神経刺激作用がある。このことから交感神経刺激作用によって子宮血流量が低下し催奇性が誘発されるという仮説をたて、アドレナリン作動性  $\alpha_1$  受容体 (以下  $\alpha_1$  受容体) 阻害薬の亜酸化窒素の催奇性に対する影響を検討した。さらに亜酸化窒素によって誘発される内臓転位症が  $\alpha_1$  受容体刺激作用によるという仮説をたて一連の実験を行った。

*In vivo* の実験モデルは、1967年に Fink らが確立したものを応用した。*In vitro* の実験モデルは、1970年代に New らによって確立された Whole Embryo Culture System (全胚芽培養) を応用した。

*In vivo* の実験モデルを使用した実験から、次のような結果が得られた。亜酸化窒素暴露によって、流産、軽度および重度の骨格異常、そして内臓転位症が誘発された。葉酸化合物の投与は、軽度の骨格異常の誘発を抑制したが他の催奇作用は抑制しなかった。 $\alpha_1$  受容体阻害薬であるフェノキシベンザミンは、流産と軽度の骨格異常の誘発を抑制したが他の催奇作用は抑制しなかった。*In vitro* の実験モデルを使用した実験からは、次のような結果が得られた。メチオニン投与によって内臓転位症以外の亜酸化窒素による催奇作用が抑制された。それに対し葉酸化合物は催奇作用を抑制しなかった。フェノキシベンザミンより特異性の高い  $\alpha_1$  受容体阻害薬であるプラゾシンが、亜酸化窒素による内臓転位症の誘発を抑制した。逆に  $\alpha_1$  受容体刺激薬であるフェニレフリンが内臓転位症を誘発した。さらに、そのメカニズムに細胞内カルシウムの増加によるカルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ 2 型の活性化が関与していることを証明した。

今回の一連の研究によって、多くのメカニズムが亜酸化窒素による催奇性の原因として関与していることが証明された。その中でも大きな要素は、亜酸化窒素の1)メチオニン合成酵素阻害作用、2)交感神経刺激作用の二つである。メチオニン合成酵素阻害作用は、DNAの合成障害とメチル反応障害を引き起こす。特に後者は亜酸化窒素による催奇性の最も重要な要素である。交感神経刺激作用は、母体の子宮血流量低下と胎児に対する直接の $\alpha_1$ 受容体の活性化を引き起こす。特に後者は内臓転位症を誘発する。亜酸化窒素による催奇性をメチオニンが抑制するメカニズムをさらに解明していくのが今後の課題である。

以上が学位論文の要旨に関する発表であり、この発表について主査および副査からの質疑があった。

まず、副査の吉岡教授より、1)亜酸化窒素による催奇性は、投与される亜酸化窒素の濃度に依存するか、2)亜酸化窒素に交感神経刺激作用があるとする、そのメカニズムはいかなるものが考えられるか、3)亜酸化窒素による催奇性にはエンブリオの時期に $\alpha_1$ 受容体を介したCaM kinaseの活性化が関与しているとするれば、亜酸化窒素以外の物質でもCaM kinaseを活性化するのは内臓転位症を誘発しうるのか、といった質問があった。

続いて、副査の本間教授より1)臨床的に亜酸化窒素は催奇性を持つことが示されているか、2)内臓転位症の誘発は亜酸化窒素に特異的な作用なのか、あるいは他の麻酔薬でも誘発しうるのか、3)子宮血流の低下はいろいろな要因で起こりうるが、なぜ亜酸化窒素による子宮血流低下は催奇性の原因となり得ると考えられるか、4)鳥類における催奇性との関連、などに関する質問があった。

最後に主査の劔物教授より1)*in vivo*と*in vitro*で結果が異なる点についてはどのように説明できるのか、2)この研究結果より導出される亜酸化窒素の臨床使用における問題点(妊娠する可能性のある患者への投与の可否)に関する質問があった。

以上の質問に対して申請者は、自らの実験結果と過去の文献を引用し、おおむね適切に回答した。

この論文は亜酸化窒素が催奇性をもつことを明らかにし、またその機序についても解明したことで評価され、今後、他の薬剤による催奇性の機序解明への応用や、亜酸化窒素の臨床における適切な使用方法の確立に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。