

一酸化窒素合成酵素阻害剤投与妊娠ラットの胎盤の 超微形態学的変化について

埼玉医科大学産科婦人科学教室 (主任: 畑 俊夫教授)

大 澤 洋 之

Study on the Morphological Changes in the Placenta of Rats Administered Nitric Oxide Synthase Inhibitor

Hiroyuki OSAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical School, Saitama

(Director : Prof. Toshio Hata)

概要 一酸化窒素 (nitric oxide : NO) の合成酵素である nitric oxide synthase (NOS) を阻害することにより, NO 産生を抑制した妊娠ラットを作成し, 胎盤の形態学的変化を検討した. 妊娠12日目のSD系ラットの皮下に NOS の阻害剤である N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) をそれぞれ0mg/day (コントロール: A 群), 3mg/day (B 群), 25mg/day (C 群) の濃度で持続投与した. 投与前後の経時的血圧の変化を測定した. 妊娠18日目に各群の胎仔, 胎盤を摘出し, 胎盤の組織学的変化を光顕ならびに超微形態学的に観察, 比較検討し, 以下のような結果を得た.

1. ラットの血圧は A 群に比較して, B 群, C 群の順に濃度依存性に上昇した.

2. 胎盤の光顕所見において, B 群, C 群ともに巨細胞は空胞変性し, その数は減少していた. また胎盤迷路の結合織は水腫状で, 絨毛間腔は狭小化しており, トロフォブラスト細胞の核は pycnotic になっていた. さらに胎仔側の血管は狭小化していた. また C 群のそれらの変化は最も強く示されていた.

3. 電顕所見としては, 光顕所見に加えトロフォブラスト細胞母体側表層にフィブリンが沈着しており, 母体血の凝固系の亢進, 血流の異常, トロフォブラスト細胞の抗凝固能の低下などが示唆されていた. また胎仔血管内皮細胞は厚さが不規則で, B 群ではこぶ状に突出, C 群では内皮細胞内の小器官が減少し, 中間径フィラメントが増生しており, 局所循環の制御機構の破綻が示唆された.

以上のように, 一酸化窒素合成酵素阻害剤を投与した妊娠ラット胎盤の変化はヒト妊娠中毒症の変化に極めて類似しており, NO の産生低下が妊娠中毒症の病態形成に深く関与していることが推察された.

Synopsis To clarify the roles of nitric oxide synthase (NOS) during pregnancy, histopathological changes in the placenta were observed after the administration of an NOS inhibitor [N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)] to rats. L-NAME was infused subcutaneously from day 12 of gestation at stable concentrations of 3mg/day (group B) or 25mg/day (group C) until day 18 when the placentae were removed. The mean systolic blood pressures in groups B and C were higher than in the controls (group A). By both light and electron microscopy, morphological changes were observed and compared to those of human placenta in preeclampsia. In groups B and C, light microscopy showed that giant cells were vacuolated, degenerated and decreased in number. In the labyrinth, the stroma was extremely edematous, and the intervillous space and fetal vessels were narrowed. Electron microscopy showed that micro-fibrin clots were deposited on the maternal surface of trophoblasts. The endothelial cells of fetal vessels were irregular in shape. In group B the endothelial cells had knotty projections. In group C the number of organelles was decreased in endothelial cells, and intermediate filaments were increased. These findings suggest that decreased NO production may cause changes similar to those found in preeclampsia. Treatment with NOS inhibitor may be used in an animal model for preeclampsia.

Key words: Nitric oxide synthase inhibitor • Preeclampsia • Rat • Placenta

緒 言

妊娠中毒症は周産期医学の進歩により激減したとはいえ、未熟児出生、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、胎児仮死等のリスクは高率であり、いまだ母児管理上の重大な問題の一つである。一方その病因に関しては以前よりさまざまな物質が関与すると考えられてきた。最近では妊孕現象における生理的变化に対する適合不全としてとらえることが主流となってきている。レニン-アンギオテンシン系を介する循環系の障害、プロスタサイクリン/トロンボキサン A₂ の不均衡、あるいはフリーラジカルの関与などが近年提唱されている。またこのような状況下に存在する妊娠中毒症胎盤には、肉眼的、光顕的、超微形態学的に多くの障害が起こっており、それらの観察所見が多くの研究者によって発表されている。しかし、発症のメカニズムについてはいまだに明確な意見の一致を得るには至っていない。そこで血管内皮依存性弛緩因子である一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の産生低下と妊娠中毒症の関連に注目した。NO は何らかの原因による血流の増加により、血管が筋原性に収縮した際、内皮細胞がずり応力の増加を感知して内皮細胞から放出され、血管を拡張し、筋原性収縮による血管抵抗の上昇を打ち消し、末梢血流の調節因子として働いている¹⁾。またアンギオテンシン II、エンドセリンなどの血管収縮・血小板凝集物質の作用を緩衝し、生理的状态における血管系の非血栓性を保っている²⁾³⁾。これらの相互の関係から NO が妊娠中毒症の病態に深く関与していることが示唆される。

Yallampalli and Garfield⁴⁾は一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) の阻害剤 (N^G-nitro-L-arginine methyl ester: L-NAME) を妊娠18日目から投与し、妊娠中毒症症状の発症が妊娠後期に起こるようなモデルを作成しているが、ヒト妊娠中毒症の妊娠中期発症型のものに近似させること、growth spurt 直前までの変化がどの程度起こっているかをみることは有意義なことであると考え、妊娠中期より L-NAME を投与し growth spurt の始まった日に、すでに胎盤に変化がきているかどうかを検討するための実験を計画

した。そこで、L-NAME を妊娠ラットに妊娠12日目から投与し、NO 産生を抑制し、妊娠18日目に各群の胎仔、胎盤を摘出し、血圧の変化および胎盤の形態学的変化について検討した。

研究方法

12週齢の体重200g~250g の SD 系ラットを用い、実験に先立ち膣スミアにて少なくとも2周期の正確な性周期を有することを確認後、発情前期に雄性 SD 系ラットと交配し、翌朝膣スミアにて精子を確認したものを妊娠0日目とした。妊娠12日目ラット皮下に、Osmotic minipump (Alzet, model2ML2, 5 μ l/hr) を生理食塩水のみ充填して移植したものをコントロール (A 群) とした。

L-NAME (Sigma 社) については、Osmotic minipump を用いて3mg/day (B 群)、25mg/day (C 群) の濃度で各条件10匹ずつ持続投与した。L-NAME の投与量は Yallampalli and Garfield⁴⁾ や Molnár et al.⁵⁾ の報告を参考とした。さらに L-NAME の直接作用を検討するための一助として、N^G-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME) を L-NAME と同様に3mg/day (D 群)、25mg/day (E 群) の濃度で各条件5匹ずつ持続投与した。各群とも投与前、および投与後経日的に尾動脈収縮期圧を測定した。尾動脈収縮期圧の測定には拡張型マルチチャンネル非観血血圧心拍数計測解析装置 (PS-600型) (理研開発) を使用した。妊娠18日目に各群の胎仔、胎盤をエーテル麻酔下に摘出した。摘出した胎仔の重量を測定した。統計学的解析は student *t* 検定を用いた。胎盤は10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後パラフィン包埋、5 μ m の薄切切片を作成し HE 染色にて光学顕微鏡にて観察した。超微形態学的解析は、組織を2.5%グルタルアルデヒド固定後1%四酸化オスミウムにて二重固定、エポン包埋後超薄切片を作成し、酢酸ウラン、クエン酸鉛にて染色し、電子顕微鏡日立 H-7000にて観察した。

研究成績

1. 血圧の変化

A 群と比較して、L-NAME 投与群では持続投与開始日の翌日である妊娠13日目から妊娠18日目にかけて有意な血圧の上昇を認めた (図1)。

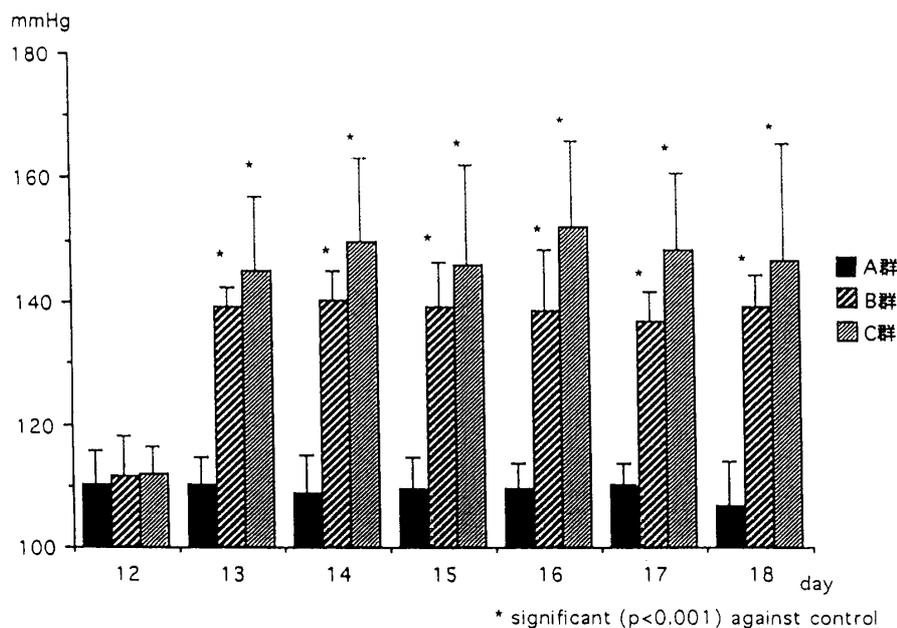


図1 一酸化窒素合成酵素阻害剤投与妊娠ラットの血圧の変化

D-NAME 投与群 (D 群, E 群) では A 群と比較して有意な血圧の上昇は認めなかった。

2. 胎仔体重の変化について

B 群では胎仔体重は 2.512 ± 0.162 g (Mean \pm SD; $n=132$) であり, A 群と比較して有意差を認めなかった。しかし, C 群では 2.304 ± 0.134 g ($n=126$) であり, A 群と比較して有意な体重の低下を認めた ($p < 0.001$) (図 2)。

各群の胎仔数は A 群: 12.8 ± 1.6 (Mean \pm SD; $n=10$), B 群: 13.2 ± 1.0 ($n=10$), C 群: 12.6 ± 1.8 ($n=10$) であり各群における母体 1 匹あたりの胎仔数に有意差は認められなかった。

3. 胎盤形態について

1) A 群

光顕的に母体側より巨細胞層, 栄養海綿層, 迷路層の構造が観察された (写真 1-i)。

迷路層は超微形態学的にやや明るい細胞質を有するトロフォブラスト内層と, やや暗い細胞質を有するトロフォブラスト中層およびトロフォブラスト外層のいわゆる 3 層構造を示していた。また, 胎仔血管内皮細胞はほぼ一定の厚さを保っていた (写真 2)。

2) B 群

光顕的に A 群と比較すると, 巨細胞は空胞変性

胎仔体重

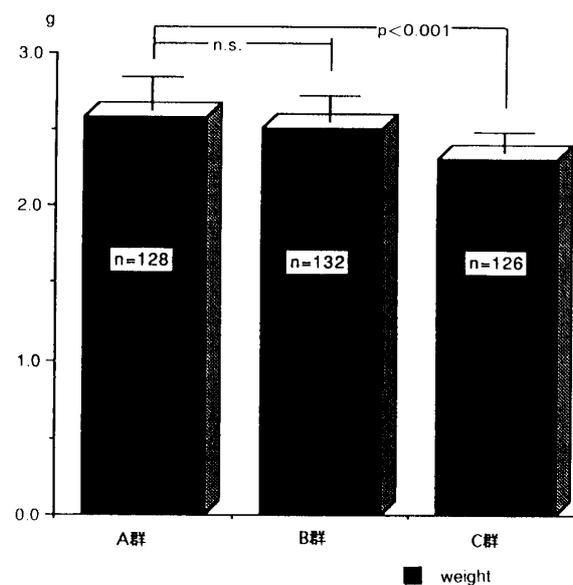


図2 一酸化窒素合成酵素阻害剤投与妊娠ラット胎仔体重の変化

し, 細胞個々の大きさは縮小, 核も萎縮しており, その数も減少していた。また迷路層の結合織は水腫状で, 絨毛間腔は狭小化しており, トロフォブラスト細胞の核は pycnotic になっていた。さらに胎仔血管内腔は狭小化していた (写真 1-ii)。

超微形態学的に胎仔血管は収縮していた。血管内皮細胞は, 厚さが一定しておらず, 内腔に向かっ

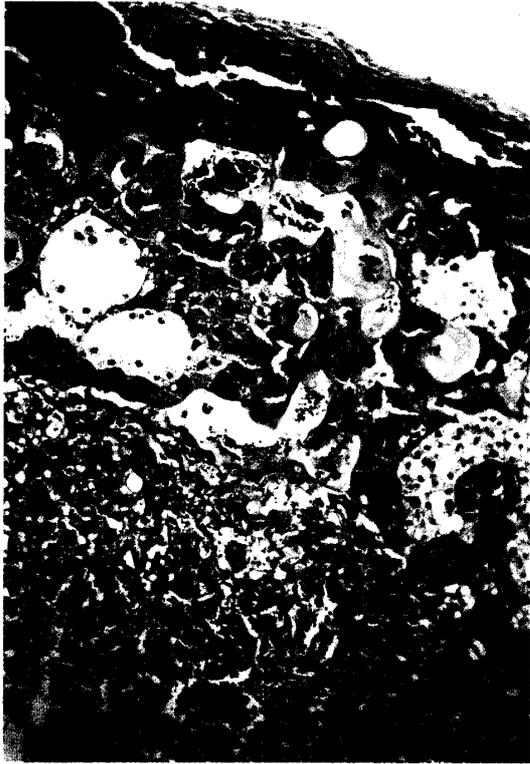


写真1-i A群ラット胎盤
上から巨細胞層, 栄養海綿層, 迷路層を示す, ×400



写真1-iii C群ラット胎盤
巨細胞および迷路層の変化はB群よりさらに顕著である, ×400

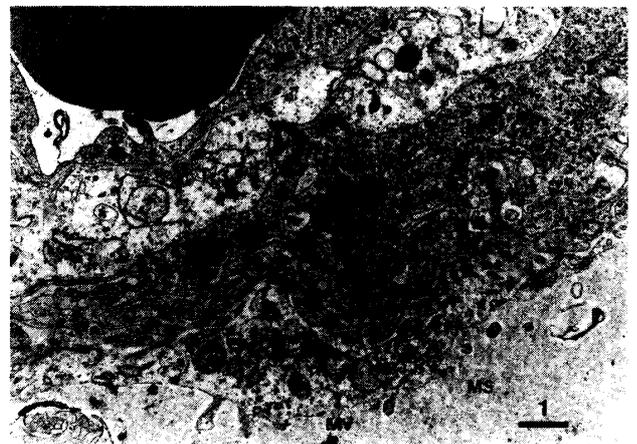


写真2 A群ラット胎盤迷路層
トロフォブラストは3層構造を示している。胎仔血管内皮細胞の厚さはほぼ一定である, ×6,000

写真1-ii B群ラット胎盤
巨細胞数は減少, 核は萎縮している。迷路層の結合織は水腫状になっている。また, 絨毛間腔は狭小化している。トロフォブラスト細胞の核は pycnotic になっている, ×400

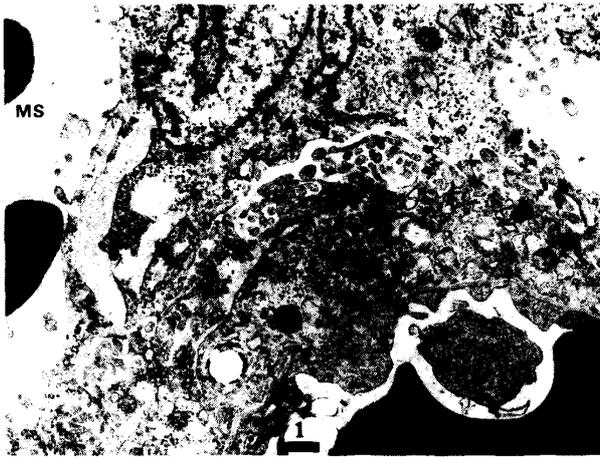


写真3 B群ラット胎盤迷路層 1

トロフォブラスト外層は菲薄化している。胎仔血管内皮細胞の厚さは不規則で、こぶ状に突出している。
×6,000

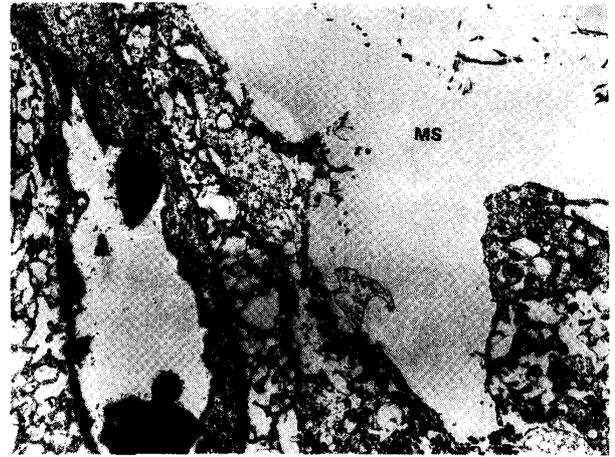


写真5 C群ラット胎盤迷路層-1

トロフォブラスト外層の microvilli は高度に減少しておりその部にフィブリンの沈着が認められる。
×4,000

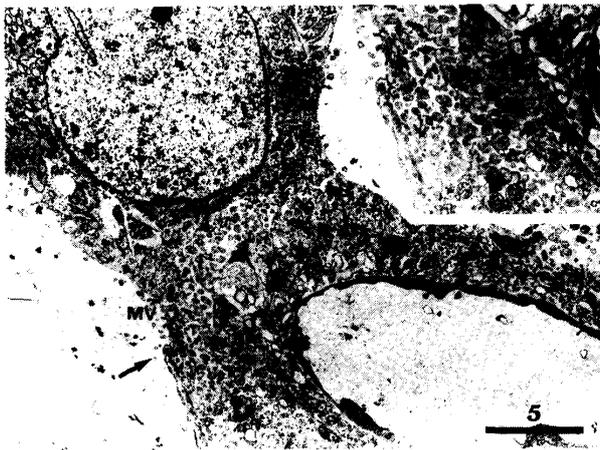


写真4 B群ラット胎盤迷路層 2

トロフォブラスト外層の microvilli は減少している。しかし、右上 insetのごとく中層では microvilli の増生が認められる。×3,000, 右上 inset ×5,000

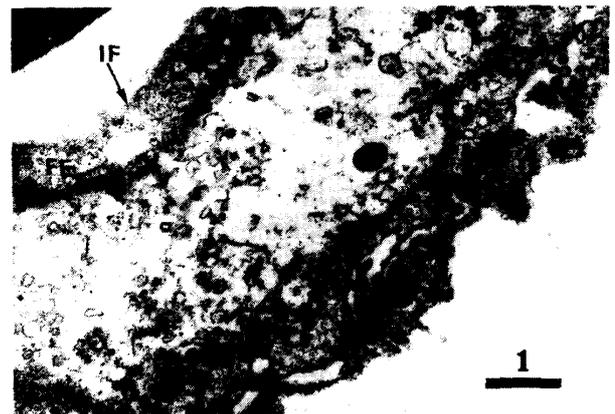
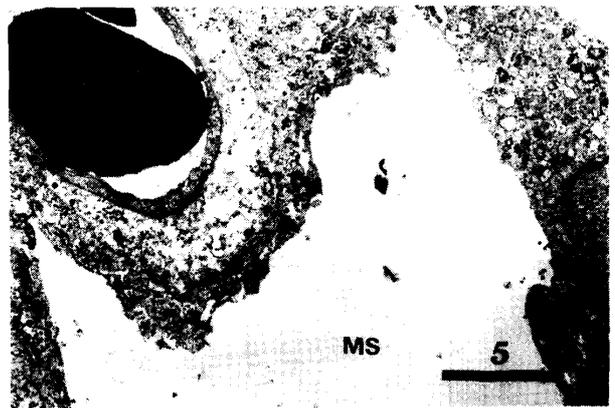


写真6 C群ラット胎盤迷路層-2

上段：トロフォブラスト内層は水腫化している。下段：胎仔血管内皮細胞は伸展し、中間径フィラメントが増生している。上段×3,000, 下段×8,000

てこぶ状に突出している像が観察された。また、A群で観察されたトロフォブラスト3層構造の外層の部分が菲薄化しており、妊娠18日目にもかかわらずA群の妊娠21日目に娩出された胎盤の像と同様な像を示していた(写真3)。

また迷路層の他の部においてトロフォブラスト外層の microvilli の明らかな減少が観察されたが、写真4の inset に示すごとく中層のトロフォブラストでは障害された表層の細胞の代償をするかのように microvilli の増生が起こっていた(写

真4).

3) C 群

光顕的に巨細胞数の減少と迷路層の変化はB群と比較してさらに著しく、巨細胞は連続性を失い、ほぼ消失している部分も認められた(写真1-iii).

超微形態学的にB群と比較してさらに著しくトロフォブラスト外層のmicrovilliは減少しており、その部位にフィブリンの沈着が観察された(写真5).

母体血と胎仔血との間の構造が最も薄くなった部では、胎仔血管内皮細胞周囲のトロフォブラスト内層は水腫化していた。水腫化した細胞質では小器官は粗造になり、粗面小胞体(rER)は減少、リボゾームも減少していた。さらに胎仔血管内皮細胞に中間径フィラメント(IF)の増生が起こっていた(写真6).

4) D 群および E 群

A群と比較して形態学的変化は観察されなかった。

考 案

妊娠中毒症は“学説の疾患”と称されるように、その病態論について多数の報告がなされてきた。現在のところ血管内皮細胞の障害、末梢血管の攣縮に基づく循環調節機構の破綻が中心となつていふと考えられる。循環調節因子の一つとして、NOに注目した。

1980年にFurchgott and Zawadzki⁶⁾によって血管内皮依存性弛緩因子(Endothelium-derived relaxing factor: EDRF)が報告され、1987年にPalmer et al.⁷⁾によりEDRFの本態はNOであることが判明し、NOの生体内における多彩な役割ならびに多種の疾患との関連が注目されるようになった。産婦人科領域においても家兎妊娠中はNO産生が上昇しているとの報告⁸⁾があり、NOは妊娠期間中における循環系や凝固系を中心とする母体の生理的变化に対して深く関与している可能性があると考えられる。さらに妊娠ラットにNOSの阻害剤であるL-NAMEを投与すると高血圧が誘導され、IUGRが生ずるとYallampalli and Garfield⁹⁾は報告しており、NO産生の低下が

妊娠中毒症の病因の一因として深く関与していると推察される。また、Osmotic minipumpを妊娠ラット皮下に移植し、L-NAMEを10 μ g/minの濃度で持続投与した場合、尿中硝酸排泄量は3 μ mol/dayであり、コントロール(6 μ mol/day)と比較して有意に減少していたとの報告⁹⁾や妊娠16日目のラットにOsmotic minipumpを皮下に埋没し、コントロールには生理食塩水を、対象群にはL-NAMEを0.25, 0.5, 1.0mg/hrの濃度で持続注入すると、各群における尿中cGMP濃度はL-NAMEの濃度依存性に低下したとの報告¹⁰⁾があり、L-NAMEを投与すると生体内でのNO産生はL-NAMEの濃度依存性に抑制されると考えられる。

本研究ではNO産生低下と妊娠中毒症の関連を解明するため、NO産生を抑制した妊娠ラットの変化とヒト妊娠中毒症における変化との類似性について比較検討した。

1. 母体側絨毛表面へのフィブリンの沈着について

ヒト妊娠中毒症胎盤において平野¹¹⁾は末固定組織凍結法にてmicrovilliの減少が観察されたと述べている。L-NAMEを投与した妊娠ラット胎盤においてもmicrovilliの減少が観察され、さらにその部でヒト妊娠中毒症胎盤においてよく観察されるフィブリン沈着が認められた。

2. 胎仔血管内皮細胞の形態について

A群の胎仔血管内皮細胞はほぼ一定の厚さを保っていたが、B群においては内皮細胞の厚さは一定しておらず、内腔に向かって突出しているような像が認められた。逆にC群ではむしろ血管は収縮能を失い、拡張しており、内皮細胞が剥離してしまったような像を呈する部が認められた。また内皮細胞の小器官は減少しており、IFの増生が認められた。内皮細胞の突出は畑ら¹²⁾や田中¹³⁾の実験で正常妊娠胎盤をカテコールアミンにてインキュベートすると内皮細胞がアクチンフィラメントの集団によってこぶ状に突出する像がみられたということより、毛細血管の収縮亢進による変化と考えられる。渡邊¹⁴⁾はヒト妊娠中毒症重症例では胎児血管内皮細胞のIFの著しい増加を認めた

と報告している。本研究においてもC群では変性した血管内皮細胞にIFの増加を認めた。この群の血管においては、正常妊娠でみられるような弛緩・収縮の制御は不可能になっているものと推察される。

ヒトとラットでは胎盤形成の根本的な形態学的な違いがあり、Syncytial knotの増生は認められなかった。

ラット胎盤の特徴的所見として巨細胞がある。相馬¹⁵⁾は、巨細胞がPlacental Lactogenを産生している可能性があるとして述べているが、今回の研究においてL-NAMEを投与したラットの胎盤において、明らかな巨細胞数の減少、細胞自身の変性を認めた。これもヒト妊娠中毒症に認められる胎盤機能不全と深く関わりをもっているものと推察される。

以上のように本実験における妊娠ラットの胎盤の変化は多くの点でヒト妊娠中毒症胎盤との共通点が認められた。

これらの組織変化についてNO産生抑制によるものか、あるいはL-NAMEの直接作用によるものかという疑問が残る。そこでL-NAMEの直接作用についての検討をするための一助としてD-NAMEを投与した実験を行ったが、それらの妊娠ラットにおいてはA群と比較しても有意な血圧の上昇、および胎盤の形態学的変化は認められなかった。したがって本実験における妊娠ラット胎盤の変化はNO産生抑制による可能性が高いと考えられる。

血管内皮細胞はプロスタサイクリンやNOなどの弛緩因子とトロンボキサンA₂やエンドセリンなどの収縮因子を産生しており、それらのバランスによって血管のホメオスタシスが保たれていると考えられている。前述したようにNOは生体内では血管弛緩因子として、またアンギオテンシンIIやエンドセリンなどの血管収縮、血小板凝集作用をもつ物質の緩衝作用が認められており、血管のホメオスタシスの維持に重要な役割の一端を担っていると考えられている。L-NAMEを投与し、NO産生を抑制した本実験における妊娠ラット胎盤の組織変化の発現機序はこれらの相互

作用によることが示唆される。

以上のようにL-NAMEを投与し、NO産生を抑制した妊娠ラットの変化はヒト妊娠中毒症の変化と多くの類似点があり、妊娠中毒症モデルの一つとして有用である可能性が示唆された。

稿を終えるに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った畑俊夫教授、相馬廣明教授、ならびに本学第1解剖学教室金子勝治教授に深甚なる謝意と敬意を表します。

また直接本研究に御指導を頂いた飯田幸雄先生に深謝いたしますとともに、御協力頂いた産婦人科学教室、第1解剖学教室の方々に厚く御礼申し上げます。

略語

FE：胎児血管内皮細胞，Tr1：トロホプラスト外層，Tr2：トロホプラスト中層，Tr3：トロホプラスト内層，MS：母体血腔，MV：microvilli，F：フィブリン，IF：中間径フィラメント

文 献

1. Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1990; 261: H2016—H2023
2. 飯田幸雄, 畑俊夫. 特集/胎盤の生化学—最近の知見, 一酸化窒素合成酵素. *産婦人科の世界* 1994; 46: 761—766
3. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109—142
4. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1316—1320
5. Molnár M, Süttö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1458—1466
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373—376
7. Palmer RMJ, Ferrige AC, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524—526
8. Sladek SM, Regenstein AC, Lykins D, Roberts JM. Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of

- pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1285-1291
9. *Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD.* Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993; 7: 566-571
 10. **高木健次郎, 佐藤和雄.** 妊娠中毒症の成因, 病態. <特集> 妊娠中毒症の管理. *産婦人科治療* 1995; 71: 366-372
 11. **平野正子.** 妊娠中毒症胎盤絨毛組織の超微形態学的研究—とくに一般二重固定法と未固定組織凍結法による差について—. *日産婦誌* 1989; 41: 550-556
 12. **畑 俊夫, 佐藤正仁, 疋田美直, 池田秀造, 川田 晃.** 女性生殖器疾患14. 妊娠中毒症胎盤. 日本医科大学 WHO 電顕診断学センター編 電子顕微鏡診断学—基礎と実際— 東京: 藤田企画出版, 1986; 552-553
 13. **田中敏幸.** 未固定組織凍結法による妊娠中毒症胎盤絨毛の毛細血管内皮細胞の超微形態学的研究. *日産婦誌* 1988; 40: 1543-1549
 14. **渡邊芳明.** 絨毛内胎児毛細血管内皮細胞の microfilament と中間径 filament—超微形態学的ならびに免疫組織化学的研究—. *日産婦誌* 1989; 41: 257-264
 15. **相馬廣明.** 胎盤の比較解剖学. 現代産科婦人科学大系, <年間追補 A> 東京: 中山書店, 1978 (No. 7767 平8・5・20受付)