

称号及び氏名	博士（獣医学）	市川 あおい
学位授与の日付	平成30年2月28日	
論文名	抗真菌剤ケトコナゾールのラット胎盤に及ぼす影響に関する研究	
論文審査委員	主査	玉田 尋通
	副査	山手 丈至
	副査	岡田 利也

論文要旨

緒言

胎盤は胚の着床後に発生する哺乳類特有の器官であり、母体と胎子間の免疫寛容や物質輸送を担う他、内分泌器官として妊娠維持に寄与する。母体が摂取した化学物質や薬物に血液を介して直接曝露されることにより、胎盤に形態的・機能的変化が誘起されるが、その病態の発生機序は不明な点が多い。

胎盤発育に関連するホルモンとしてエストロジェンが知られている。代表的なエストロジェンとして estradiol-17 β (E₂) が挙げられるが、母体の血中 E₂ 濃度は妊娠後期に増加し、分娩の開始と子宮の血流量増加に関与するものと考えられている。一方、妊娠ラットに E₂ を投与すると胎盤の発育が抑制され、E₂ 抗体を投与すると胎盤重量が増加することから、E₂ の欠乏による胎盤の肥大は血中 E₂ 濃度低下に対する代償性的変化と考えられているが、その機序は明らかでない。

一方、代表的なイミダゾール系抗真菌薬であるケトコナゾール (KTZ) を妊娠したラットやマウスに投与すると胎子の死亡、奇形、発育遅延等が惹起されることが報告されており、また、KTZ はステロイドホルモンの生合成経路においてリアーゼやアロマターゼの作用を抑制してテストステロンやエストロジェ

ンの合成を阻害することが知られている。

以上を踏まえ、本研究は胎盤の形態と組織に及ぼす KTZ 投与の影響を調べると共に、胎盤の変化とエストロジェンや胎盤血流量ならびに胎盤発育関連因子等の遺伝子発現との関係を調べ、KTZ 処置によって胎盤に起こる変化の発生機序を明らかにすることを目的とした。

第 1 章：KTZ 投与が妊娠後期の胎盤に及ぼす影響

第 1 節：胎盤発育に影響を及ぼす KTZ の投与量及び投与時期の検討

25 あるいは 50 mg/kg の KTZ 懸濁液を妊娠 10-19 日に 1 日 1 回経口投与して妊娠 20 日に胎子と胎盤を調べたところ、50 mg/kg 投与群では全胎子が死亡したが、25 mg/kg 投与群では胎子の死亡はみられず、KTZ の分散剤のみを投与した対照群と比べて胎盤重量が増加した。この結果から、以下の実験では KTZ の投与量を 25 mg/kg とした。次に、KTZ によって胎盤重量の増加が誘起される感受期を明らかにするために、妊娠 9-11 日、12-14 日または 15-17 日に KTZ を投与して妊娠 20 日の胎盤重量を測定したところ、妊娠 12-14 日の投与によってのみ胎盤重量が対照群よりも増加した。妊娠 12-14 日投与群では妊娠 14 日の投与 4 時間後の血中 E₂ 濃度は対照群と比較して有意に低値であった。これらの結果から、KTZ 投与による胎盤重量増加には有効な期間があり、KTZ 投与後には母体の血中 E₂ 濃度が低下することが明らかになった。

第 2 節：KTZ 投与（妊娠 12-14 日）後の胎盤の経時的変化

妊娠 12-14 日に KTZ を投与し、妊娠 14、16、18 及び 20 日に胎盤の重量、直径及び厚さを測定したところ、これらの値は妊娠 16-20 日に対照群と比べて有意に増加した。また、胎盤を組織学的に精査したところ、妊娠 16 日より胎盤迷路部において絨毛間腔の拡張が観察され、妊娠 20 日まで持続した。KTZ 投与群では妊娠 14 日の投与 4 時間後の胎盤迷路部において、対照群と比較して母体の赤血球が減少し、有核の胎子赤血球が増加した。これらの結果は KTZ 投与によって、母体側の胎盤血流量が減少した可能性を示唆する。一方、KTZ 投与群では妊娠末期の胎盤基底部分において、対照群では退縮していたグリコーゲン細胞の遺残がみられた。

第 2 章 KTZ 投与による胎盤変化に対する E₂ 併用投与の影響

第 1 節：KTZ 投与による胎盤の形態的变化への E₂ 併用投与の影響

妊娠 12-14 日に KTZ を経口投与すると同時に E₂ を 0 (KTZ+0E₂ 投与群)、0.1 (KTZ+0.1E₂ 投与群)または 1 (KTZ+1E₂ 投与群) µg/匹/日の割合で持続的に皮下投与し、妊娠 20 日に胎盤重量を測定した。対照群には KTZ と E₂ の両者の溶媒のみを投与した。KTZ+0E₂ 投与群の胎盤重量は対照群と比べて有意に増加したが、E₂ の投与量に依存して胎盤重量は低下し、KTZ+1E₂ 投与群では対照群と差がなかった。

対照群、KTZ+0E₂投与群、及びKTZ+1E₂投与群の妊娠14日の投与4時間後における胎盤迷路部の組織像から母体と胎子の赤血球数、胎子血球が通る絨毛血管腔及び母体血球で満たされた絨毛間腔の面積をそれぞれ測定したところ、KTZ+0E₂投与群では対照群と比較して絨毛血管腔面積が有意に増加し、胎子赤血球数も増加したが、母体赤血球数と絨毛間腔の面積は減少した。一方、KTZ+1E₂投与群では絨毛血管腔の面積及び赤血球数は対照群と比較して差が無く、絨毛間腔の面積は対照群よりも増加した。これらの結果から、KTZは母動物の血中E₂濃度の低下を介して母体から胎盤へ流入する血液量を減少させ、胎盤迷路部における母体と胎子の血流に変化を惹起している可能性が示唆された。また、胎盤基底部では、KTZ+0E₂投与群において妊娠20日にみられたグリコーゲン細胞の遺残がE₂を併用投与すること（KTZ+1E₂投与群）で阻止された。

グリコーゲン細胞におけるグルコース貯留及び放出は主に胎盤迷路部のグルコース輸送担体1(GLUT1)によって調節されていることから、胎盤のGLUT1を免疫染色して観察したところ、対照群では絨毛の母体側及び胎子側の細胞で明らかな免疫反応がみられた。一方、KTZ+0E₂投与群では母体側及び胎子側の両方の細胞で免疫反応が非常に弱く、KTZ+1E₂投与群ではおおむね対照群と同等の免疫反応が認められた。これらの結果から、KTZ投与による胎盤基底部のグリコーゲン細胞の遺残にGLUT1の発現が関与する可能性が示唆された。

第2節 胎盤の血流量に及ぼすKTZとE₂の影響

マイクロスフェア法を用いて対照群、KTZ+0E₂投与群、およびKTZ+1E₂投与群の妊娠14日の投与前、投与4、8および24時間後の胎盤の母体側血流量を調べた。その結果、投与前の血流量は群間で差はなかったが、KTZ+0E₂投与群では投与4時間後の血流量が投与前と比較して低下し、対照群と比べて有意に低かった。KTZ+1E₂投与群では、KTZ投与後も血流量に変化はなく、すべての測定時間において対照群と比べて差はみられなかった。これらの結果から、KTZは血中E₂濃度の低下を介して母体の胎盤血流量を一過性に減少させる可能性が推察された。

第3節 胎盤の酸素欠乏状態に及ぼすKTZとE₂の影響

低酸素マーカーであるピモニダゾールを用いて胎盤の酸素供給状態を調べたところ、KTZ+0E₂投与群ではKTZ投与4から5時間後に対照群と比較して迷路部の栄養膜細胞に強い免疫反応がみられた。一方、KTZ+1E₂投与群ではKTZ+0E₂投与群と比較して免疫反応が軽度であり、対照群と同等の染色強度であった。これらの結果から、KTZ投与によって胎盤の細胞が低酸素状態になるが、E₂を併用投与すると酸素供給が改善されるものと考えられた。

第3章：胎盤発育関連因子の遺伝子発現に及ぼすKTZの影響

胎盤発育に vascular endothelial growth factor (VEGF)、placental growth factor (PLGF)、endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF) 等の増殖因子が関与することが報告されている。さらに、血管拡張因子として知られる一酸化窒素 (NO) は胎盤の発育や機能に密接に関与することから、ラット胎盤における各種増殖因子とその受容体および NO 合成酵素の遺伝子発現に及ぼす KTZ 投与 (妊娠 12-14 日) の影響を妊娠 14 日の KTZ 投与前、投与 4、8、24 時間後、および妊娠 21 日に調べた。その結果、ラットの胎盤で強く発現することが報告されている VEGF164、Flk-1 (VEGF レセプター)、PLGF、EG-VEGF および PKR1 (EG-VEGF レセプター) の mRNA 発現量はすべての妊娠日時に対照群と KTZ 投与群との間に差は認められなかった。一方、KTZ を投与したラットの胎盤基底部分における eNOS mRNA 量は投与 4 および 24 時間後に対照群よりも有意に減少し、iNOS mRNA 量は、妊娠 15 日と 21 日で対照群と比べてそれぞれ有意な減少および増加を示した。これらの結果から KTZ 投与による胎盤の変化に各種増殖因子およびそれらの受容体の遺伝子発現量は関与しないが、NO 合成が何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

総括

1. ラットの妊娠 12-14 日に KTZ (25 mg/kg/日) を経口投与すると、妊娠 16-20 日の胎盤重量が増加した。また、妊娠 14 日の投与 4 時間後に胎盤迷路部において母体赤血球数の著しい減少と胎子赤血球数の増加がみられ、妊娠末期には胎盤迷路部の絨毛間腔の拡張と胎盤基底部分におけるグリコーゲン細胞の遺残が認められた。
2. KTZ 投与は母体血中 E₂ 濃度を減少させ、胎盤の母体側血流量が一時的に低下して胎盤に低酸素状態を誘起することが示唆された。
3. KTZ 投与後の胎盤における変化は、E₂ の併用投与により回復した。
4. KTZ 投与による妊娠末期の胎盤におけるグリコーゲン細胞の遺残に GLUT1 が関与する可能性が示唆された。
5. KTZ 投与による胎盤の変化に胎盤における eNOS および iNOS の遺伝子発現量の変化が関与する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

胎盤は母体と胎子との間の物質輸送や免疫寛容を担う他、内分泌器官として妊娠維持に寄与する。母体が摂取した多くの化学物質や薬物が胎盤に形態的・機能的変化を誘起することが知られているが、その病態の発生機序は不明な点が

多い。一方、胎盤発育に関連するホルモンとしてエストロジェンが知られており、代表的なエストロジェンであるエストラジオール-17 β (E_2)を妊娠ラットに投与すると胎盤の発育が抑制され、 E_2 抗体を投与すると胎盤重量が増加することが報告されている。また、代表的なイミダゾール系抗真菌薬であるケトコナゾール(KTZ)はステロイドホルモンの生合成経路においてリアーゼやアロマターゼの作用を抑制してテストステロンやエストロジェンの合成を阻害するが、KTZを妊娠中のラットやマウスに投与すると胎子の死亡、奇形、発育遅延等が惹起されることが知られている。以上を踏まえ、本研究はKTZ処置によって胎盤に起こる変化とその発生機序を明らかにすることを目的としている。

第1章ではラットに25 mg/kgのKTZ懸濁液を妊娠12日から14日まで毎日経口投与することによりKTZの分散剤のみを投与した対照群よりも妊娠16-20日における胎盤の重量、直径および厚さが増加し、胎盤迷路部の絨毛間腔が拡大することを示した。また、胎盤重量がKTZ投与によって影響を受ける時期は妊娠12-14日に限られていること、妊娠14日の投与4時間後には血中 E_2 濃度は対照群と比較して有意に低値であること、妊娠14日の投与4時間後の胎盤迷路部では対照群と比較して母体の赤血球数が減少し、胎子赤血球数が増加することを明らかにした。さらに、KTZ投与により、妊娠末期の胎盤基底部分において、対照群では退縮するグリコーゲン細胞の遺残がみられることを示した。

第2章では、妊娠12-14日にKTZを経口投与すると同時に E_2 を持続的に皮下投与すると、KTZ投与でみられた妊娠20日の胎盤重量の増加と胎盤迷路部の絨毛間腔の拡大が抑制されること、および妊娠14日の投与4時間後における胎盤迷路部のKTZ投与による母体の赤血球数の減少と胎子赤血球数の増加が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、KTZは母体の血中 E_2 濃度の低下を介して母体から胎盤へ流入する血液量を減少させ、その後の胎盤変化を誘起する可能性を示唆した。また、胎盤基底部分では、 E_2 の併用投与により妊娠20日にみられたグリコーゲン細胞の遺残が阻止されることを明らかにした。さらに、グルコースの貯留と放出に関与するグルコース輸送担体1(GLUT1)を免疫染色して観察し、KTZ投与による胎盤基底部分のグリコーゲン細胞の遺残にGLUT1の発現が関与する可能性を示唆した。次にマイクロスフェア法を用いて胎盤の血流量を調べ、KTZは血中 E_2 濃度の低下を介して母体の胎盤血流量を一過性に減少させることを示した。血流量低下に関連して、胎盤の酸素供給状態を低酸素マーカーのピモニダゾールを用いて調べ、KTZ投与によって胎盤の細胞が低酸素状態になるが E_2 を併用投与すると酸素供給が改善されることを示した。

第3章では、胎盤発育に関与するvascular endothelial growth factor(VEGF)、placental growth factor、endocrine gland-derived VEGF、及びそれらの受容体の胎盤におけるmRNA量を測定し、これら因子の遺伝子発現量は妊娠12-14日のKTZ投与によって影響を受けないことを示した。また、KTZ投与群では、血管

拡張因子として知られる一酸化窒素（NO）の合成酵素である **endothelial NO synthase (eNOS)** の胎盤基底部分における mRNA 量は対照群と比べて妊娠 14 日の **KTZ** 投与 4 および 24 時間後に有意に減少し、**inducible NO synthase (iNOS)** の mRNA 量は妊娠 15 日と 21 日でそれぞれ減少および増加することを示した。

以上のように、本研究は **KTZ** の妊娠 12 日から 14 日の連日投与は母体血中 **E2** 濃度を低下させることにより、胎盤の母体側血流量を一時的に低下して胎盤に低酸素状態を誘起すること、また、妊娠末期の胎盤迷路部における絨毛間腔を拡張すると共に胎盤基底部分におけるグリコーゲン細胞の遺残を誘起して胎盤重量を増加することを明らかにした。また、これらの変化に胎盤の **eNOS** および **iNOS** の遺伝子発現量の変化が関与する可能性とグリコーゲン細胞の遺残に **GLUT1** が関与する可能性を示唆した。

これらの研究成果は、**KTZ** が胎盤に及ぼす変化とその機序の一端を明らかにしたものであり、ヒトや家畜の薬剤による胎盤変化の機序解明に向けた一つの道筋を拓いていることから医学・獣医学の発展に大きく貢献すると判断される。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。