



## Phosphatidylserine/phosphatidylcholine microvesicles can induce preeclampsia-like changes in pregnant mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 尾松, 公平 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/291">http://hdl.handle.net/10271/291</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 461号	学位授与年月日	平成18年 3月15日
氏 名	尾 松 公 平		
論文題目	Phosphatidylserine/phosphatidylcholine microvesicles can induce preeclampsia-like changes in pregnant mice (フォスファチジルセリン／フォスファチジルコリン微小顆粒を妊娠マウスに投与すると妊娠高血圧症候群様症状を惹起する)		

博士(医学) 尾 松 公 平

## 論文題目

Phosphatidylserine/phosphatidylcholine microvesicles can induce preeclampsia-like changes in pregnant mice  
(フォスファチジルセリン／フォスファチジルコリン微小顆粒を妊娠マウスに投与すると妊娠高血圧症候群様症状を惹起する)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

妊娠高血圧症候群(妊娠中毒症)は妊娠20週以降に母体にはじめて高血圧を認めるか、高血圧の増悪を認める疾患である。その病態の本体は血管内皮障害と考えられ、それを来たしうる原因として交感神経感受性の亢進、母体の栓友病をはじめとする過凝固状態などがあげられる。また他の病因として着床の適応不全、免疫学的胎児許容機構の破綻、細胞性免疫を司るTh1細胞と液性免疫を司るTh2細胞のバランスのTh1免疫優位状態などが挙げられる。また本症候群を呈する胎盤病理組織では胎盤内虚血、血栓、血管炎、サイトトロホプラスト細胞の子宮筋層への浸潤不良などの胎盤内循環不全像を呈する。胎盤内の血流は抗凝固蛋白であるアネキシンVが絨毛細胞に多く存在し流動性を調節しているといわれている。このアネキシンVは、細胞膜構成要素の一つで凝固系を活性亢進するフォスファチジルセリン(PS)と結合し凝固亢進を抑制することが知られている。そこで他の細胞膜構成要素であるフォスファチジルコリン(PC)とPSのミセルを母獣に投与することで胎盤内の流動性に影響を与え過凝固状態を誘発し妊娠中の母体に血圧上昇を誘発することができるか否か妊娠ICRマウスを用いて検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

本実験については、当施設の動物実験倫理委員会の承認を得た。まずPSとPCを1対4の割合で混合し10mg/mlのPSPCミセルを作成した。ICRマウスは妊娠5日頃に受精卵が子宮の脱落膜に浸潤し、妊娠9日から10日に胎盤形成期となり妊娠14日目頃になると胎盤の大きさはほぼ一定となる。妊娠ICRマウスに妊娠5.5日から16.5日まで連日PSPC100 $\mu$ lを尾静脈から静注(N=6)し、対照として連日生理食塩水100 $\mu$ lを尾静脈より静注した(N=10)。収縮期血圧(SBP)はソフトロン社のBP-98A(非観血血圧測定装置)を用いて尾動脈圧を測定した。妊娠17.5日にジエチルエーテル吸入麻酔下に開腹し、卵巣動静脈、子宮動静脈を一旦クランプし、心腔より採血、膀胱穿刺にて採尿後、子宮を摘出し、胎仔体重・胎盤重量を測定した。血漿アンチトロンビン活性(AT)、トロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT)、血小板数及び尿蛋白を測定した。一部の胎盤は、免疫組織学的検索のためホルマリン固定した。統計学的検定は、血圧を二元配置分散分析、その他はウェルチのt検定を用いた。また、p値0.05未満を統計学的に有意差有りと判定した。

### 〔結果〕

妊娠5.5日、17.5日におけるSBPは、それぞれ生理食塩水(コントロール)群 $102 \pm 6$ mmHg、 $101 \pm 6$ mmHg、PSPC群 $102 \pm 8$ mmHg、 $124 \pm 3$ mmHgで妊娠後半期に有意に上昇した( $p < 0.01$ )。胎仔体重は、コントロール群 $1.31 \pm 0.13$ g、PSPC群 $1.20 \pm 0.13$ gで有意に減少( $p < 0.0001$ )。胎盤重量は、コントロール群 $0.14 \pm 0.03$ g、PSPC群 $0.13 \pm 0.02$ gで有意に減少( $p < 0.001$ )。TATは、コントロール群 $7 \pm 4$ ng/ml、PSPC群 $23 \pm$

16ng/mlで有意に増加( $p<0.05$ )。血小板数は、コントロール群 $102\pm 31$ 万/ $\mu\text{l}$ 、PSPC群 $88\pm 31$ 万/ $\mu\text{l}$ で有意に減少( $p<0.05$ )。ATは、コントロール群 $89\pm 11\%$ 、PSPC群 $76\pm 13\%$ で有意差は認められず、尿蛋白においても、コントロール群 $26\pm 12$ g/dl、PSPC群 $86\pm 64$ g/dlで有意差は認められなかった。胎盤の組織像には瀰漫性にフィブリン沈着が認められ、特にPSPC群で著明であった。

#### 〔考察〕

血液検査所見にて血小板数の有意な減少、TATの有意な増加を認めた。また胎盤の組織学的検索においては、PSPC群で迷路層、胎盤内血管にフィブリン沈着が顕著に認められた。これは妊娠初期からのPSPCミセルの投与により、凝固系の活性亢進、トロンビンの生成、フィブリン血栓の生成を来とし、母獣に血液過凝固状態、そしてアネキシンVにて保たれていた胎盤内血流の流動性のバランスが崩れ胎盤内の凝固亢進、胎盤内虚血を呈したためと考えられる。胎仔体重、胎盤重量の低下は子宮胎盤循環不全の結果と考えられ、妊娠後期の母獣の血圧上昇については胎盤内過凝固、虚血により胎盤から直接または間接的に昇圧物質が生成された可能性を示唆するものである。

#### 〔結論〕

PSPCの妊娠初期からの妊娠マウスへの投与は、胎仔胎盤の発育不良、TATの増加、血小板数の減少を来すと共に妊娠マウスの血圧を上昇させた。このことから胎盤内の血小板活性化・凝固促進はヒトにおいても妊娠高血圧症候群を発症させる可能性が推察された。

## 論文審査の結果の要旨

妊娠高血圧症候群(妊娠中毒症)発症における胎盤内血栓形成の関与を検討する為に、申請者は胎盤内血栓形成マウスモデルを用い、母体血液循環、胎児発育、胎盤形成への影響を検討した。妊娠高血圧症候群は妊娠20週以降に初めて高血圧を発症するか、高血圧の増悪を認める疾患であり、その病態発現には母体の血管内皮障害が深く関与するとされるがその詳細は不明である。本症候群の胎盤では、血栓形成、血管炎、サイトトロホプラスト細胞の子宮筋層への浸潤不良、等々胎盤内循環不全像を呈する事が知られ、胎盤虚血が本症候群発症に関わるとされる。申請者は凝固系活性化因子であるフォスファチジルセリン(PS)/フォスファチジルコリン(PC)ミセルを妊娠マウス尾静脈より反復投与し、胎盤内血栓形成の有無、母体の血圧上昇、蛋白尿出現等を解析する事により、胎盤内血栓形成の妊娠高血圧症候群発症への関与を検討した。

申請者は本学動物実験倫理委員会の承認を得て下記の実験を行った。PS/PC(1/4)ミセル(10mg/ml)100 $\mu\text{l}$ をICRマウス尾静脈より妊娠5.5日から16.5日迄連日投与(N=6)し、妊娠経過中の収縮期血圧の変動を検討した。コントロールとして同量の生理的食塩水を連日投与した(N=10)。妊娠17.5日にジエチルエーテル吸入麻酔下に膀胱穿刺による採尿、子宮摘出を行い、胎仔体重・胎盤重量を測定した。また心腔穿刺により得られた血漿中のアンチトロンビン活性(AT)、トロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT)、血小板数を測定した。その結果申請者は以下の結果を得た。(1)PS/PC投与群ではコントロール群に比し収縮期血圧が妊娠後半期に有意( $p<0.01$ )に上昇した。尿タンパク量においては優位差は認めなかった。(2)胎仔重量( $p<0.0001$ )及び胎盤重量( $p<0.01$ )はPS/PC群で有意に少なかった。(3)PS/PC群で母体血中血小板数は有意に少なく( $p<0.05$ )、TATは有意な高値( $p<0.05$ )を示したが、AT活性に有意差は無かった。(4)胎盤

の絨毛管腔にフィブリン沈着を認め、これはPS/PC群において有意に多かった。

以上より申請者は、妊娠初期からのPS/PC投与により母獣での凝固活性が亢進し、胎盤内にフィブリン血栓を形成したことにより、収縮期血圧の上昇、胎仔・胎盤重量の低下という妊娠中毒症類似の症状が得られたとしている。

これらの事実より、胎盤内の血小板活性化・凝固促進はヒトにおいても妊娠高血圧症候群を発症させる可能性が推察されるとした。

審査委員会では、妊娠マウスにPS/PCを投与する事により妊娠高血圧症候群モデルマウスを確立した事、また、胎盤内血栓形成がその病態に深く関与している事を明らかにした点を高く評価した。また、申請者は光増感法を用いた胎盤循環不全モデルを用いて本機構の重要性を更に追求している姿勢も高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 妊娠中毒症の定義が妊娠20週以降の高血圧である理由
- 2) 子癇の定義と原因
- 3) 妊娠中毒症の血管内皮障害の原因
- 4) 確立された妊娠中毒症の動物モデルはあるか
- 5) 本妊娠中毒症モデルの妥当性
- 6) コントロール実験(生食投与)の妥当性
- 7) PS/PCの比率を1/4にした理由
- 8) PS/PCの尾静脈投与で胎盤に選択的に血栓ができる理由
- 9) 高血圧の程度と蛋白尿の程度は相関するか
- 10) フィブリン沈着の有無の解析に抗フィブリノーゲン抗体を用いる妥当性
- 11) アンチトロンビンの投与により高血圧発症が抑制された理由
- 12) 胎盤循環障害により体循環が影響される理由

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野哲盟	
	副査	間賀田泰寛	副査 本郷輝明