

発時に提案した。

(倫理面への配慮)

学内倫理委員会の規約に沿い、個人情報
情報の適正な扱いを行った。

C. 研究結果

動脈管開存が必要な症例では、持続
点滴ルートの確保が、経過日数のとと
もに困難になった。静脈の蛇行や、血
管腔の狭小化があることもあった。プ
ロスタグランディン E の投与により
無呼吸発作が頻発した。プロスタグラ
ンディン E による動脈管拡張効果が
十分に得られない症例もあった。

D. 考察

現在はプロスタグランディン E の持
続点滴静注が唯一の治療であるが、新
生児に持続点滴ルートを確実に確保
することが困難であること、点滴ルー
トからの感染が大きな問題である。ま
た、プロスタグランディン E は作用時
間が短く点滴もれが起こった際は、循
環動態を維持するために緊急で再度

点滴ルートを確保しなければならず、
患児の生命に大きな危険を伴う。さら
にプロスタグランディン E の持続点
滴に対して、効果的に動脈管が拡張し
なくなってくるケースも見受けられ
る。本研究で石川らの開発した、アデ
ニル酸シクラーゼサブタイプ選択的
刺激薬は、作用時間が長く、かつ受容
体のダウンレギュレーションも避け
られるため、従来のプロスタグランデ
イン E に比べ、効果的な動脈管拡張薬
と考えられた。

E. 結論

本研究で開発した、アデニル酸シク
ラーゼサブタイプ選択的刺激薬は、効
果的な動脈管拡張薬と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 岩本眞理、西澤崇、新村一郎、他：運動誘発性発作を呈するQT延長症候群の運動負荷心電図の特徴について 日本小児循環器学会雑誌 26巻1号 p67-72, 2010
 2. 住友直方、岩本眞理、他：上室性期外収縮・心房細動・心房粗動、小児不整脈の診断・治療ガイドライン 日本小児循環器学会雑誌 Supplement, 2010 September
 3. 岩本眞理：不整脈 一最新主要文献と解説一 総合小児科診療のための小児科学レビュー 2010 p49-53, 2010. 4
2. 学会発表
1. 渡辺重朗, 岩本眞理, 市川泰広, 志水直, 佐近琢磨, 新村一郎 肥大型心筋症の初期心電図変化についての検討. 日本心電学会、2010.9、大分
 2. 笠間啓一郎, 松木佑介, 南智行, 鈴木伸一, 磯松幸尚, 益田宗孝, 市川泰広, 渡辺重朗, 西澤崇, 岩本眞理. 三尖弁への介入が必要であった心室中隔欠損症に合併した活動期感染性心内膜炎の外科治療. 第46回日本小児循環器学会、2010.7、千葉
 3. 南智行, 松木佑介, 笠間啓一郎, 鈴木伸一, 磯松幸尚, 市川泰広, 渡辺重朗, 西澤崇, 岩本眞理, 益田宗孝. 大動脈輪拡張症、大動脈弁閉鎖不全症を伴う小児 Marfan 類似疾患に対する外科治療経験. 第46回日本小児循環器学会、2010.7、千葉
 4. 市川泰広, 市川泰広, 渡辺重朗, 西澤崇, 岩本眞理, 益田宗孝, 三浦倫一, 柳貞光. 薬剤抵抗性の先天性QT延長症候群(LQT3)に対して、植え込み型除細動器(ICD)を植え込んだ1女児例. 第46回日本小児循環器学会、2010.7、千葉
 5. 松木佑介, 南智行, 笠間啓一郎, 鈴木伸一, 磯松幸尚, 益田宗孝, 市川泰広, 渡辺重朗, 西澤崇, 岩本眞理. 未破裂で診断された

Valsalva 洞動脈瘤 4 症例の外科的検討. 第 46 回日本小児循環器学会、
2010.7、千葉

6. 笠間啓一郎, 松木佑介, 南智行, 鈴木伸一, 磯松幸尚, 益田宗孝, 咲間裕之, 市川泰広, 渡辺重朗, 西澤崇, 岩本眞理. 動脈スイッチ手術の遠隔成績 最近 10 年間の検討. 第 46 回日本小児循環器学会、2010.7、千葉

7. 第 3 回横浜小児先端医療セミナー、「動脈管を知る」小児循環器の臨床から、市川泰広、2010 年 9 月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

取得予定なし

2. 実用新案登録

取得予定なし

3. その他

次ページに入院症例の内訳を示す。

2010年 横浜市立大学附属病院小児循環器統計

総入院数 233+12 例・緊急入院 40 例

先天性心疾患、川崎病；心臓カテーテル検査総数 123 件

VSD 21 件、MCLS 9 件、TOF 7 件、ASD 3 件、PS 3 件、PDA 2 件、AS 1 件、

その他 77 件

インターベンション(48 件)

PTA for PA branch stenosis	19 件	PTA for BTS conduit	2 件
PTA for supra PS	1 件	BAS	7 件
PTV for v-PS	6 件	coil embolization for PDA	2 件
PTA for supra AS	1 件	coil embolization for BTS	1 件
PTV for v-AS	1 件	coil embolization for collateral artery	4 件
PTA for CoA	3 件	POBA for MCLS CAL	1 件

※新生児 8 名、<3 歳 20 名

不整脈;心臓カテーテル検査総数 6 件

循環器内科入院にて EPS/CA/PMI を施行した。

CHD 術後 SSS	1 件	EPS+PMI
PSVT	3 件	EPS+CA
AT	1 件	EPS+CA
VT	1 件	EPS+CA

2010年 小児心臓手術 総件数 90件、緊急手術 21件

2次孔 ASD	7件	LSVC ligation	1件
VSD (含 IE 合併 1件)	25件	TAPVR PVO release	1件
Subclavian flap	2件	Williams	2件
Total arch repair (end to end anastomosis)	2件	PDA ligation	5件
AP window	1件	TV plasty	1件
Jatene	3件	PA/Pvalve plasty	5件
Norwood	1件	MV plasty	6件
DKS +RV-PA shunt	1件	MVR	1件
TCPC	3件	AVR (弁輪拡大 2件)	5件
TCPC conversion	2件	Bentall	1件
bidirectional Glenn	1件	CABG	1件
modified BTS	7件	CRT implantation	2件
TOF/DORV ICR	2件	PMI	2件
PA banding	10件	その他	

*成人先天性心疾患手術症例 14件を含む

関連研究

先天性心疾患について

先天性心疾患の中で血行動態が動脈管開存によって安定が保たれる組み合わせがみられる。それらは大きく2種類のパターンに分けられる。まず体循環が動脈管依存性である場合と肺循環が動脈管依存性である場合である。いずれも重症な先天性心疾患であるが、前者は左心低形成症候群・大動脈離断複合・大動脈縮窄複合に代表される左心系全体の低形成をきたしている疾患群で順行性血流が少ないために動脈管を介して肺動脈の一部の血流を体血管に補うために動脈管開存が必要となる。後者は肺動脈閉鎖・重症肺動脈狭窄に代表される肺血流が極端に少ないために動脈管を介して肺血流を補うために動脈管開存が必要となる。内蔵錯位症候群では大部分で複雑心奇形を伴い、上記に示したような動脈管依存性の血行動態を呈することは少なくない。循環動態を維持するうえで動脈管を開いておく

ために臨床の場ではプロスタグランジン E1 の持続点滴を施行するが、このほかに肺動脈圧と体血圧のバランスも血行動態に大きく影響する。体循環を維持するために動脈管を開いている場合には肺血圧は高めに維持しておかないと肺への血流が増大して低心拍出と肺血流増大による心不全の進行をきたすし、逆に肺血流を保つために動脈管を開いている場合には肺動脈圧が高すぎると肺への血流は十分に流れない。このような場合に循環動態を安定させるために補助療法として NO 吸入療法・低酸素換気療法を併用することがある。

また内蔵錯位症候群では2心室修復が不可能なこともしばしばみられ、最終的に肺動脈は心室を経由せず体静脈を直接肺動脈に吻合する Fontan 型の手術での修復となる。術後早期には肺への血流がスムーズに流れるようになるまで肺動脈圧を下げる工夫が必要になる。この場合に NO 吸入療法が著効することが少なからずみられ、ま

だ保健適応となっていないこの治療についての臨床的検討を行っている。

複雑心奇形で最終的に Fontan 型手術を終了した後も長期予後についてさまざまな問題がある。術後遠隔期の不整脈はそのうちのひとつであり、頻脈発作の程度によっては生命に関わる問題になることもある。私たちは先天性心疾患に関わる医師を対象として不整脈の診断・治療のガイドライン作成を行った。基礎心疾患のある不整脈（とくに上室性）の部分について紹介する。

1 : NO 吸入療法

NO は強力な血管拡張作用をもち内因性にも血管内皮より分泌されることも知られている。NO 吸入療法は吸気ガス内への投与によって体血管には作用させずに肺血管に選択的に NO を供給することにより体血圧を下げずに肺血管抵抗を下げる効果がある¹。

【対象と方法】2008 年 10 月から 2011 年 3 月までの 2 年 5 カ月で NO 吸入療法を施行したのは 37 例であっ

た。施行時の年齢は 5 カ月～22 歳（平均 2 歳）で、NO 吸入療法の適応は 35 例が先天性心疾患の心臓術後で 6 例は体静脈-肺動脈吻合（グレン手術・T C P C 手術）にたいして施行。29 例は術後肺高血圧にたいして施行。その他では、拡張型心筋症の肺高血圧合併の 1 例と先天性心疾患で気管出血後の肺高血圧の 1 例に施行。33 例で血圧・心拍数・中心静脈圧など血行動態の改善が得られた。4 例では効果みとめず中止した。有害現象・副作用はみられていない。NO 濃度は低濃度に限定し（1～40ppm）、NO 投与中のモニタリング（NO・NO₂ など）・メトヘモグロビンの定期的なチェックなどにより合併症や副作用をおこさずに管理が可能であった。【課題】P P H N にたいする NO 吸入療法は保険適応となったが、新生児以外での適応はなく先天性心疾患術後の小児における保健適応はまだ認められていない。ヨーロッパでは適応拡大がなされが、本邦でも適応拡大への検討が望まれる。

2：低酸素換気療法

小児の先天性心疾患のうち肺体血流比が増大するために、低心拍出の心不全のコントロールが困難な症例に限って施行している²。その代表的な疾患は左心低形成症候群や大動脈離断・大動脈縮窄複合のように体循環系の低形成・低還流と肺血流増大を伴うものである。実際に施行したのは2例（HLHS, c TGA）であるが、この治療の必要度の高いと考えられた4例は低酸素換気療法のスタンバイのみで実際には使用せずに経過した。

施行例ではこの治療によって術後の血行動態の安定が得られた。合併症は認めていない。今後は術前管理においても有効で安全な使用法の工夫を続けて適応のある症例に限って施行する。

小児不整脈の診療：

基礎心疾患のある場合

A. 上室期外収縮

基礎心疾患・誘因がある場合にはその治療や誘因の除去が優先されるが、

Fontan 型術後例では頻発する上室期外収縮により、血行動態や心機能に影響を及ぼす可能性が高い。

薬物治療の実際（図1）

Fontan 術後など、上室期外収縮が発作性心房細動、心房粗動を誘発する場合には、自覚症状の有無にかかわらず薬物治療を考慮する。心機能が正常の場合、第一選択薬はβ遮断薬、第二選択薬は slow drug、第三選択薬が intermediate drug となる。軽度心機能低下では第一選択薬はβ遮断薬、第二選択薬は intermediate drug 第三選択薬は slow drug となる。中等度異常の心機能低下がある場合 intermediate drug の中から選択する。心不全合併例ではジギタリスや少量のβ遮断薬も考慮する³。

B. 心房細動

小児や若年者において基礎心疾患のない孤立性心房細動は極めて稀で、通常は基礎心疾患があつて心房負荷や心房拡大・線維化等を伴っているなど病的な心房においてみられる。心

房細動をきたしやすい疾患は、僧帽弁疾患、心筋症による心不全（とくに肥大型心筋症）、右房拡大を伴った Fontan 術後例、甲状腺機能亢進症、高血圧等があげられる^{4, 5}。また不整脈・突然死・けいれん等の家族歴を有する症例のなかに心房細動が遺伝性不整脈である可能性がある⁶。

心房細動では主に血行動態の障害と塞栓症が問題となる。心室の興奮が不規則で時に過剰な頻脈をきたす。頻脈が 30 秒未満の短いイベントであれば無症状であることが多いが、発作が長く続くと血行動態の破綻を来し、動悸・倦怠感・食欲不振・胸部圧迫感・息切れ・失神・心不全・心停止などの症状を呈する。

塞栓症は心房内での血液うっ滞により血栓形成が生じるためにおこる。左房内の血栓は動脈塞栓の原因となるが、とくに脳梗塞は最も重大な合併症である。

・薬物治療の実際 (図 2)

心房細動の治療は①心室レートのコ

ントロール (レートコントロール) ②除細動 (リズムコントロール) ③抗凝固療法などを個々の症例に応じて組み立てる。血行動態が破綻してショック・急性肺水腫など緊急治療が必須の場合は電氣的除細動を行なうが、血栓塞栓症のリスクがあるため抗凝固療法が不十分であればレートコントロールを優先する。

基礎疾患のある場合はまずその原因を改善する治療を検討する。肥大型心や不全心ではアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、β 遮断薬などの使用を検討する。僧帽弁閉鎖不全にたいする僧帽弁形成術や僧帽弁置換術などの手術・Fontan 術後の巨大右房にたいする両大静脈肺動脈吻合術への変換 (TCPC conversion) など外科的治療についても検討する。次にレートコントロール治療が薦められるが、症状が強い場合には洞調律維持が必要となる場合がある。不全心では心房細動がしばしばマクロリエ

ントリーにより生じており K チャネル遮断薬の効果が期待される。薬としてはアミオダロン・ソタロール（不全心除く）・ベプリジルが相当するが、現在心房細動に対する保険適応が認められているのは肥大型心筋症におけるアミオダロンと持続性心房細動にたいするベプリジルだけである。アミオダロンは心房細動を合併した心不全の洞調律復帰⁷や慢性心不全の心房細動新規発生の予防に有効であった⁸と報告されている。

5) 抗凝固療法

塞栓症を起こしやすい危険因子を持っている場合は原則としてワーファリンを投与する。危険因子には塞栓・血栓症の既往、弁膜症、心不全、高血圧などがある。プロトロンビン時間で INR2.0～3.0 を目標とするが、機械弁の場合は 2.5～3.5 にする。

心房細動が 48 時間以上持続例では血栓塞栓症の回避のために事前の十分な抗凝固療法が必要である。最低 3 週間以上の十分なワーファリン療法

または経食道心エコー検査で左心耳内血栓のないことを確認した後に直ちにヘパリン投与開始して早期に除細動を行なう。除細動後に新たに心房内血栓が形成される可能性があることより、除細動後最低 4 週間はワーファリンを投与し、4 週間洞調律が維持されていれば抗凝固療法を終了してもよい。

C. 心房粗動

心房粗動は心房レートの高い (> 240 拍/分) きわめて規則的な上室頻拍と定義される。心房粗動が心房頻拍と異なるのは心房レートが高めである点である。心電図は典型的な例では基線が鋸歯状であることが特徴である。

通常型は心房粗動のなかで最も多く認められるもので右房内のマクロリエントリーであり、解剖学的峡部（下大静脈—三尖弁輪間）を含む三尖弁周囲を心尖部からみて反時計回りに興奮が旋回して II・III・aVF 誘導で陰性鋸歯状波を呈する。術後の拡大した右房においては（Fontan 術後な

ど) このリエントリー回路が安定しており心房粗動がおきやすい状態となっている⁹。非通常型は三尖弁周囲を時計回りに興奮が旋回して陽性鋸歯状波を呈するものや他に右房上部・右房自由壁・左房内のリエントリーを機序とするものなどがある。開心術後に右房壁の切開創(癒痕組織)を周回するリエントリーを機序とする心房粗動も非通常型の原因として重要であり、切開線リエントリー頻拍と呼ばれる。

病態・臨床的意義

心房粗動は房室伝導の程度によって症状が規定される。

最も多くみられる通常型では粗動時の心房は約 300/分、房室伝導は 2 : 1 で心室の心拍数は 150/分程度の心電図が典型的であるが粗動波 (F 波) が QRS に重なるために診断がつかず、心拍数 150/分の上室性頻拍症と誤って診断される場合がある。若年者では運動時など房室伝導が良好になると 1 : 1 伝導となって心拍数は 300/分に

もなり血圧低下・失神などの重篤な症状を呈する場合がある。小児や若年者は房室伝導が良好であり粗動時の 1 : 1 房室伝導は特に注意すべき点である。逆に睡眠中は房室伝導が 3 : 1 や 4 : 1 などがみられる。心房粗動は出生時や日齢 1 にみられる場合がある (特に先天性心疾患がある児) が幼児や思春期ではきわめて少ない¹⁰。新生児の心房粗動はいったん治まると通常は再発しない。基礎心疾患のない健康小児の場合には他の全身疾患 (内分泌・リウマチ・代謝性疾患・神経筋疾患) に伴っている可能性がある。開心術後で右房切開線周囲を旋回するマクロリエントリーでは心房レートと房室伝導によって症状が規定される。

3. 治療の実際 (図 3)

血行動態が不安定な場合 : 心不全やショック (血圧低下) をきたしている場合など不安定な血行動態では静脈麻酔後、心電図 R 波に同期して DC (1J/kg: 成人では 50J) により速やかに粗動を停止させる。

血行動態が安定している場合：心室レートが 100/分以上ではまずレートコントロールを目的として房室結節を抑制する薬物（β 遮断薬・ジゴキシン・ベラパミル・ジルチアゼム・ベプリジル）を投与する。2 歳以下では前述したように Ca チャネル遮断薬は心血管系の虚脱をきたすことがあるため投与に注意する¹¹。

洞調律復帰を目的とした薬物治療：第一選択としては心房筋の不応期延長を目的として中等度以上の K チャネル遮断作用を持つ薬物を選択する。静注薬ではプロカインアミド・ニフェカレント、経口薬ではプロカイン

アミド・キニジン・ベプリジル・ソタロールなどである。第二選択は峡部緩徐伝導の抑制を目的とし解離速度の比較的遅い Na チャネル遮断薬 (intermediate ~ slow drug) を用いる。

カテーテルアブレーション：心房粗動にたいするカテーテルアブレーションは有効性が高く比較的安全に施行できることより、抗不整脈薬治療の効果が十分でなく体重が 25~30kg 以上であれば有効な治療法として検討すべきである。

参考文献

- 1) Anderson JR, Nawarskus JJ. Pharmacotherapeutic management of pulmonary arterial hypertension. *Cardiol Rev* 2010 18(3): 148-162
- 2) Toiyama K, Hamaoka K, Oka T, Kobayashi N, et al. Changes in

cerebral oxygen saturation and blood flow during hypoxic gas ventilation therapy in HLHS and CoA/IAA complex with markedly increased pulmonary blood flow. *Circ J.* 2010; 74(10); 2125-31

- 3) Task force of the working group on arrhythmias of the European

- Society of Cardiology: The Sicilian Gambit: A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their action on arrhythmogenic mechanisms. *Circulation* 1991; 84: 1831-1851
- 4) 外山淳治, 小川聡、笠貫宏、大江透、ほか: 循環器病の診断と治療に関するガイドライン (1999-2000年度合同研究班報告) 心房細動治療 (薬物) ガイドライン. *Jpn Circ J* 2001; 65(Suppl V): 931-978
- 5) Kantoch MJ. Supraventricular tachycardia in children. *Indian J Pediatr* 2005. 72: 609-619
- 6) Vignati G. Pediatric arrhythmias: which are the news? *J Cardiovascular Med* 2007. 8: 62-66
- 7) Deedwania PC, Singh BN, Ellenbogen K, et al: Spontaneous conversion and maintenance of sinus rhythm by amiodaone in patients with heart failure and atrial fibrillation: observstions from the Veterans Affairs congestive heart failure trial of antiarrhythmic therapy (CHF-STAT). *Circulation* 1998; 98: 2574-2579
- 8) Singh SN, Poole J, Anderson J, et al: Role of Amiodarone or implantable cardioverter/defibrillator in patients with atrial fibrillation and heart failure. *Am Heart J* 2006; 152: e7-e11
- 10) Fazio G, Visconti C, D'Angelo L, et al: Pharmacological therapy in children with atrial fibrillation and atrial flutter. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 770-775
- 11) Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, et al: ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients with Atrial Fibrillation - Executive Summary: A Report of

the American College of
Cardiology/American Heart
Association Task Force on
Practice Guidelines and the
European Society of Cardiology
Committee for Practice
Guidelines (Writing Committee to

Revise the 2001 Guidelines for
the Management of Patients With
Atrial Fibrillation): Developed in
Collaboration With the European
Heart Rhythm Association and
the Heart Rhythm Society.
Circulation 2006; 114: 700-752

図1 上室期外収縮の治療

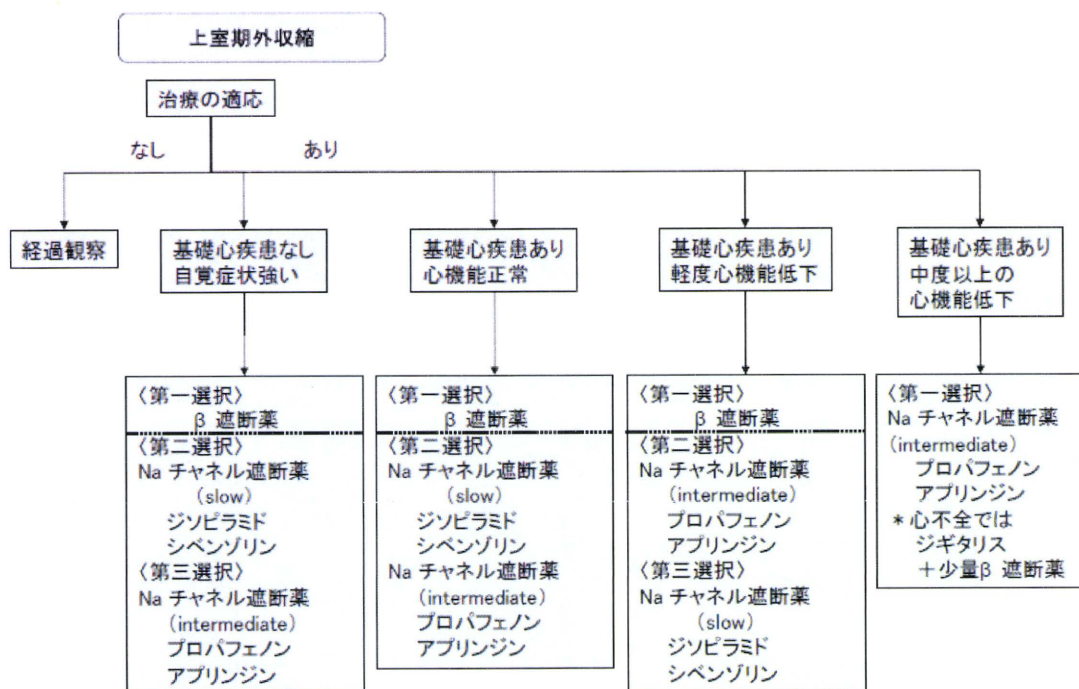


図2 心房細動の心拍数調節

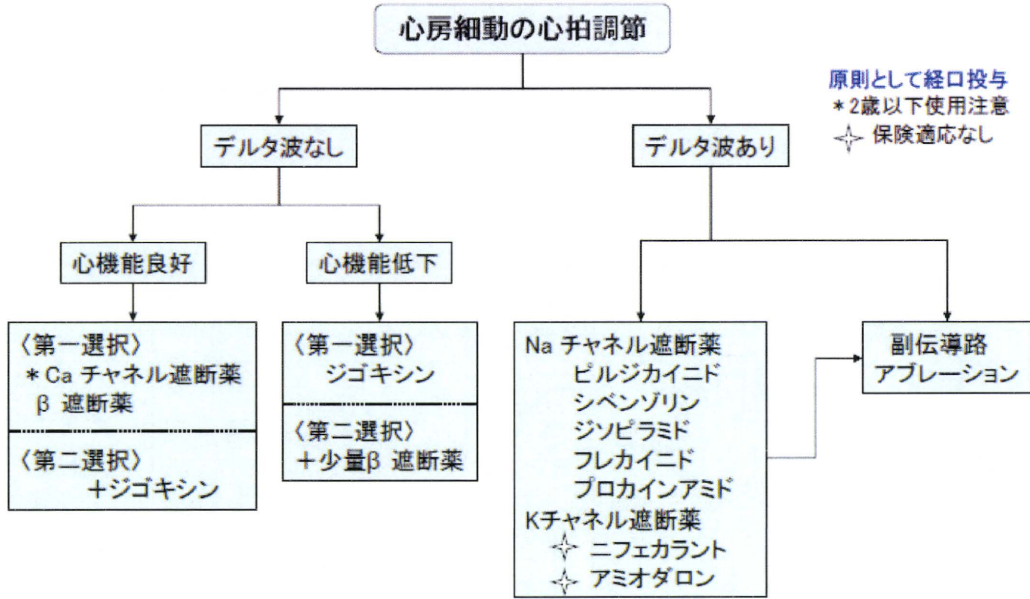
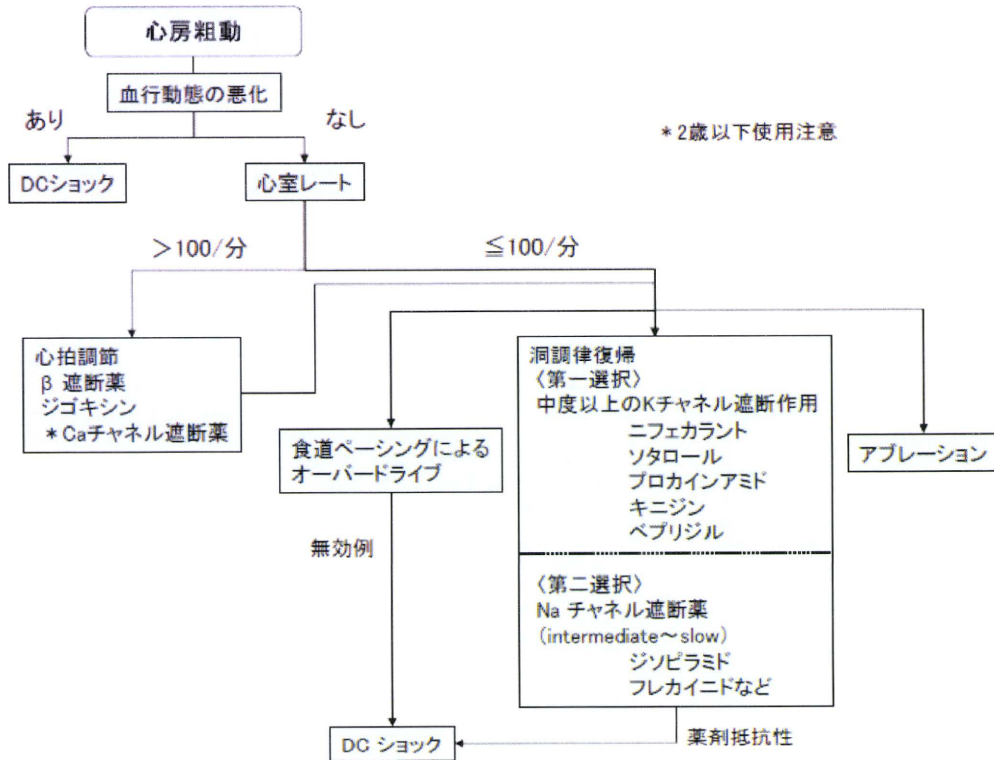


図3 心房粗動の治療



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

動物実験による検討を中心とした内臓錯位症候群に対する

新規治療薬の開発に関する研究

研究分担者 横山 詩子 横浜市立大学医学部循環制御医学 講師

研究要旨

内臓錯位症候群は先天性心疾患が合併するが、その多くは動脈管に血流が依存する血行動態を有する。そのため、手術までの間、本来出生後に閉鎖する動脈管を開存させておく必要があり、現在はプロスタグランジン E 製剤が唯一の治療薬として用いられている。しかしながら短時間作用で副作用もあり、効果的に動脈管を開存させる薬剤が望まれている。本研究では、2型と6型アデニル酸シクラーゼに対して選択性のある薬剤を開発し、その薬剤が動脈管を効果的に開存させる効果があることを明らかにした。

A. 研究目的

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈をバイパスする血管であり、出生後は速やかに閉鎖する。動脈管の閉鎖の過程には、次の二つの機序が関与している。① 出生直後からプロスタグラン

に② 出生前からプロスタグランジン E 刺激により平滑筋細胞からヒアルロン酸が分泌されることにより、平滑筋細胞の遊走に基づく内膜肥厚が生じ、完全に内腔が閉鎖する。生後の動脈管の閉鎖遅延（動脈管開存症）は、未熟児で循環不全などを引き起こし、生命予後を左右するため直ちに閉鎖

させる必要がある。一方、内臓錯位症候群には、体または肺循環経路に高度狭窄や閉鎖を有する複雑心奇形を合併し、そのような患児では、生命を維持するための初期治療として、動脈管を開存させたままにして、必要な体または肺血流を補う必要がある。したがって、動脈管閉鎖の詳細な機序を理解し、動脈管を効果的に開存させる薬剤を開発することは、小児医療上非常に重要である。先行研究で、プロスタグランジン E 受容体 EP4 シグナルは動脈管の拡張だけではなく、ヒアルロン酸の産生亢進による内膜肥厚形成にも関与していることが明らかになった。EP4 シグナルの下流でサイクリック AMP を産生する酵素であるアデニル酸シクラーゼ (AC)アイソフォームは 9 種類あり、その役割や発現部位に特異性がある。しかし、動脈管でのアデニル酸シクラーゼアイソフォームの役割は明らかにされていない。そこで、我々は各アデニル酸シクラーゼアイソフォームの動脈管における血管拡張作用および、ヒアルロン酸産生と内膜肥厚形成への作用を検討し、効

果的な動脈管開存をもたらす動脈管選択的な薬剤を開発することを目的とする。

B. 研究方法

I. 実験材料

試薬

フォルスコリン(Fsk)誘導体である 6-[N-(2-isothiocyanatoethyl)aminocarbonyl] forskolin (FD1)^{9) 11)} および 6-[3-(dimethylamino)propionyl]-14 15- dihydroforskolin (FD6)⁹⁾は日本化薬(東京)から提供を受けた。Fsk (F6886)は SIGMA (USA) から購入した。プロスタグランジン E₁ (PGE₁, 38903)は Calbiochem (ドイツ)から購入した。

実験動物と組織

全ての動物実験は横浜市立大学の倫理的規約を遵守して行った。本実験では全て日本 SLC (静岡)より購入した妊娠 Wistar rat を使用した。動脈管および大動脈の組織は胎生 19 日、胎生 21 日、生後 0 日(出生直後: 出生後 6 時間以内)の胎仔および新生仔から摘出された。胎生 19 日は未熟動脈管

で、胎生 21 日は成熟動脈管として使用した。

AC5 遺伝子欠損マウス (AC5KO)¹²⁾は本研究室の奥村敏准教授、AC6 遺伝子欠損マウス (AC6KO)¹³⁾は Kirk Hammond 博士から提供して頂いた。

II. 実験方法

ラット動脈管平滑筋細胞の初代培養

¹⁴⁾

初代培養には胎生 21 日の Wistar rat の動脈管を用いた。摘出した動脈管を 800 μ l の collagenase-dispase 混合試薬 [1.5 mg/ml の collagenase-dispase (Roche、スイス)と 0.5mg/ml の elastase type II-A (SIGMA) と 1mg/ml の trypsin inhibitor type I-S (SIGMA) と 2mg/ml の bovine serum albumin fraction V (SIGMA) を Hanks' balanced salt solution (SIGMA)に溶解した液]を 1.5ml チューブに入れ、37°Cで 15 分間反応させた。細胞懸濁液を 37°C、1000rpm で遠心し、上清を取り除き、collagenase II 混合試薬 [1mg/ml の collagenase II

(Worthington)と 0.3mg/ml の trypsin inhibitor type I-S (SIGMA) と 2mg/ml の bovine serum albumin fraction V (SIGMA) を Hanks' balanced salt solution (SIGMA)に溶解した液]を 1.5ml チューブに入れた。37°Cで 12 分間反応させ、数回ピペティングして、poly-L-lysine (SIGMA)でコーティングした 35mm 組織培養用ディッシュに播種し、37°C、5%CO₂-21%O₂のインキュベーターで培養した。培養液は 10%の fetal bovine serum:FBS (EQUITECH-BIO. INC)と 100 U/ml の penicillin・streptomycin (SIGMA、USA)を溶解した Dulbecco's Modified Eagle Medium:DMEM (SIGMA)を使用した。培養液を 2-3 日毎に交換し、90%の細胞密度になった時点で継代を行い、本研究では 4 から 6 継代目の平滑筋細胞を使用した。

total RNA 抽出

氷上において動脈管組織、培養平滑筋細胞を PBS で 1-2 回洗浄後、TRIzol® (Invitrogen)を加えてセルス