

# 神経伝達物質関連遺伝子多型と老齡ザルの行動特性

分担研究者 村山美穂（岐阜大学農学部）

研究要旨： 高齡による痴呆症などの中枢神経系の機能障害には個体差が大きい。本研究では、ヒトの性格や脳機能障害に関連すると報告されている脳内神経伝達物質関連遺伝子について非ヒト霊長類を用いて解析し、これらの遺伝子型とサルの性格や高齡化に伴う行動の変化との関連を明らかにすることを目的としている。サル類におけるこれら遺伝子型と行動特性の関係が明らかになれば、痴呆症などの発症機序の解明や、予防・治療法の開発において、モデル動物としてのサル類の有用性がより一層高まると考えられる。本年度は、18種の非ヒト霊長類においてドーパミントランスポーター（DAT1）、セロトニンレセプター（5-HTR2A）、コレシストキニン（CCK）遺伝子の多型領域をPCR増幅し、塩基配列を決定した。

## A. 研究目的

ヒトでは神経伝達物質関連遺伝子に多型が存在することが報告されており、そのうちのいくつかでは遺伝子型と気質・性格や、パーキンソン病やアルツハイマー病等の脳機能障害との相関が示唆されている。神経伝達物質に対する感受性や伝達物質量を調整する能力が遺伝子型によって相違していると考えられるが、詳細なメカニズムについてはまだ不明な点が多い。本研究では、非ヒト霊長類における神経伝達物質関連遺伝子の多型性について解析し、サル類の性格、高齡化に伴う行動変化を推定する指標となりうるかを調べ、老化モデル動物としてのサル類の遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。昨年度報告したD4ドーパミンレセプター、セロトニントランスポーター遺伝子に加え、ドーパミントランスポーター（DAT1）、セロトニン

レセプター（5-HTR2A）、コレシストキニン（CCK）遺伝子について、カニクイザルをはじめとする18種の非ヒト霊長類において解析した。

## B. 研究方法

ヒト DAT1 遺伝子には、3' 非翻訳領域に反復配列多型が存在する。3-11 回の反復数を持つ対立遺伝子が報告されており、反復数 10 回の対立遺伝子が高頻度を占め、反復数 11 回の対立遺伝子を持つヒトではパーキンソン病の罹患率が高いと報告されている（Le Couteur et al., 1997）。また、ヒト 5-HTR2A 遺伝子のエクソン部分には塩基置換多型 102-T/C が存在し、アルツハイマー病の幻視、幻聴の症状がある患者は無い患者に比べて C を持つ割合が高いとの報告がある（Holmes et al., 1998）。ヒト CCK 遺伝子

のプロモーター領域には Sp1 結合部位 (GGGCGG) に塩基置換多型 C/T が存在し、男性では CC 型は CT 型、TT 型に比べて楽観的な性格との報告がある (原田, 1997)。また孤発性パーキンソン病患者は健常者に比べて T を持つ割合が高く、また幻覚症状のある患者は無い患者に比べて T を持つ割合が高いとの報告がある (原田, 2000)。ヒト塩基配列に基づき、これら遺伝子の多型領域を増幅するプライマーを合成し、PCR 増幅を行った。増幅産物の塩基配列を決定し、多型性の有無を調べた。特に DAT1 については類人猿 87 頭、カニクイザル 100 頭など、多数個体の解析を行った。

### C. 研究結果

非ヒト霊長類における DAT1、5-HTR2A、CCK 遺伝子の PCR 増幅に成功した。DAT1 遺伝子の反復配列数の変異について、表 1 にまとめた。反復回数には種間変異が大きく、大型類人猿では 1-2 回反復型のみ認められた。一方、テナガザルは多型性に富んでおり、5-13 反復型が認められた。カニクイザル 100 頭では、12 回反復数を持つ遺伝子がほとんどであった。PCR 産物の塩基配列の解析から、ヒト配列との相同性は高く、ヒト-カニクイザル間では 81.8% であった。図 1 にヒトとカニクイザルの塩基配列を示す。旧世界ザルの多様な種および、新世界ザルのリスザルにおいても反復領域の存在が確認されたが、原猿類では今のところ PCR 増幅に成功していない。

5-HTR2A 遺伝子の多型部位については、ヒトでは C 対立遺伝子は約 60% 存在するが、カニクイザル 16 頭ではすべて C 型が観察された。CCK 遺伝子多型部位については、ヒトでは C と T 対立遺伝子の頻度はおよそ 6 : 4 であるが、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、テナガザル各 1 頭の塩基配列の解析から、いずれも C 型が観察された。塩基配列の比較から、5-HTR2A ではヒト-カニクイザル間 92.1%、CCK ではヒト-ゴリラ間 98.9% と、いずれも高い相同性が認められた。

### D. 考察

DAT1 遺伝子について、非ヒト霊長類における反復領域の存在をはじめ明らかにし、類人猿の数種において多型性を確認した。系統的にヒトに近い大型類人猿は、以前に報告したドーパミン D4 レセプター遺伝子、セロトニントランスポーター遺伝子では、反復数、塩基配列ともに、ヒトと相似していたが、DAT1 遺伝子は前述の例とは異なり、大型類人猿には 1-2 回反復型の対立遺伝子のみが見出され、ヒトとは大きく異なっていた。むしろカニクイザルなどマカク類では、反復数は 11-12 回であり、ヒトと同様多くの反復数を持つ対立遺伝子が存在していた。

非翻訳領域に存在する反復配列は、遺伝子の転写活性や mRNA の寿命に影響を及ぼす可能性がある。DAT1 は、パーキンソン病の原因物質のひとつといわれる  
1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-

tetrahydropyridine (MPTP) の代謝産物 MPP<sup>+</sup>の吸収に関与する。ヒトの 11 回反復遺伝子では DAT1 が多くつくられ、多量の MPP<sup>+</sup>が神経細胞に取り込まれる結果、パーキンソン病を発病しやすくなるのかもしれないとの指摘もある (Le Couteur et al., 1997)。チンパンジーやゴリラでは反復回数 1-2 回と、ヒトや他の霊長類よりも少ない反復数を持つ遺伝子型が観察されたのに対し、カニクイザルはヒトよりさらに多い 12 回反復型の対立遺伝子を高頻度に保有していたことから、パーキンソン病研究のモデル動物としては大型類人猿より有用かもしれない。

5-HTR2A および CCK 遺伝子については、今後、個体数を増やして多型性の有無を調査したい。脳内神経伝達物質関連遺伝子における多型性は他にも知られており、各霊長類におけるこれらの遺伝子についても解析してゆきたい。

#### E. 結論

神経伝達物質関連遺伝子が性格や高齢化に伴う行動変化に与える影響を明らかにするために、非ヒト霊長類において、DAT1 などの遺伝子多型領域を解析した。その結果、パーキンソン病の発症に関わると推察されている DAT1 遺伝子は、チンパンジーなどの大型類人猿よりもむしろカニクイザルの方がヒトに近似していることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikura, S., Terao, K., Matsuzaki, I., Inoue-Murayama, M., and Murayama, Y.: U5 monoclonal antibody identifies a novel lymphocyte surface antigen preferentially expressed in human circulating natural killer cells with high cytotoxic activity. *Immunology* 96: 485-490, 1999.
- 2) 井上 (村山) 美穂・竹中修: 遺伝子から見た霊長類の社会行動の進化. 科学 69 (4): 393-397, 1999.
- 3) Murayama, Y., Mukai, R., Inoue-Murayama, M., and Yoshikawa, Y.: An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. *Clinical and Experimental Immunology* 117: 504-512, 1999.
- 4) Niimi, Y., Inoue-Murayama, M., Murayama, Y., Ito, S., and Iwasaki, T.: Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden retriever and Shiba. *Journal of Veterinary Medical Science* 61: 1281-1286, 1999.
- 5) Wakao, K., Matsuzaki, I., Terao, K., Inoue-Murayama, M., Shimojo, N., and Murayama, Y.: Involvement of granzyme B expression in the enhancement of natural killer activity by beta-endorphin. *Brain, Behavior, and Immunity* (in press).
- 6) Inoue-Murayama, M., Sugimoto, Y., Niimi, Y., and Aso, H.: Type XVIII

collagen was newly organized during bovine adipogenesis. Differentiation (in press).

- 7) Murayama, Y., Terao, K., and Inoue-Murayama, M.: Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. *Human Immunology* (in press).
- 8) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Takenaka, O., Okada, K., Matsuzaki, I., Ito, S., and Murayama, Y.: Allelic variation of the serotonin transporter gene polymorphic region in apes. *Primates* (in press).

## 2. 学会発表

- 1) 新美陽子、井上-村山美穂、竹中修、村山裕一：類人猿におけるセロトニントランスポーター遺伝子多型の進化。第 15 回日本霊長類学会大会、宮崎大学、1999 年 6 月。
- 2) 井上-村山美穂：家畜のゲノム解析について～岐阜大学遺伝資源学分野における取り組み～。平成 11 年度東海畜産学会春期研究発表会、岐阜、1999 年 7 月。
- 3) 新美陽子、井上-村山美穂、村山裕一、伊藤慎一、岩崎利郎：イヌ D4 ドーパミン受容体遺伝子多型領域の解析。第 128 回日本獣医学会大会、熊本市産業文化会館、1999 年 10 月。
- 4) M. Inoue-Murayama, Y. Niimi, O. Takenaka, and Y. Murayama : EVOLUTION OF PERSONALITY-RELATED GENES IN PRIMATES. COE 国際シンポジウム 類人猿の進化と人類の成立、犬山市国際観光センター、1999 年 11 月。
- 5) 新美陽子、加藤和実、岩崎利郎、伊藤慎一、井上-村山美穂：犬の性格遺伝子の解析。第 6 回ヒトと動物の関係学会大会、東京大学、2000 年 3 月（予定）。
- 6) Kayang, B. B., Inoue-Murayama, M., Nomura, A., Kimura, K., Takahashi, H., Mizutani, M., and Ito, S.: Development and characterization of japanese quail microsatellite markers and their applicability to chicken. 日本畜産学会第 97 回大会、京都大学、2000 年 3 月（予定）。
- 7) 高橋秀彰、加藤克典、佐藤正寛、峰沢満、村山美穂、松田洋一、都築政起：ニワトリマイクロサテライトマーカーの大量開発。日本畜産学会第 97 回大会、京都大学、2000 年 3 月（予定）。
- 8) 麻生 久、野村 将、田原浩司、村山美穂、杉本喜憲、高野昇一、山口高弘：生体内における脂肪前駆細胞の存在様式。日本畜産学会第 97 回大会、京都大学、2000 年 3 月（予定）。

表1 ドーパミントランスポーター遺伝子の反復配列数

分類	種名	調査数	反復配列数												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ヒト科	ヒト (日本人)	117						2	8		16	203	5		
オランウータン科	チンパンジー	15	27*	3											
	ボノボ	3	6												
	ゴリラ	14		28*											
	オランウータン	20	2	38											
テナガザル科	フクロテナガザル	16				30	2								
	ミユラーテナガザル	13							12	2	2	3	6	1	
	シロテナガザル	6									8*		4		
オナガザル科	カニクイザル	100												1*	199*
	ニホンザル	1													2
	トンケアンザル	1													2
	チベットザル	1													2
	シシオザル	1													2
	ベニガオザル	1													2
	ドリル	1									1			1	
	パタスザル	2								4					
	ミドリザル	2					4*								
	アオザル	1									2				
オマキザル科	リスザル	1			2*										

数値は対立遺伝子数を示す

\*: 塩基配列を確認

Human GCCTGTGGGTCCTTGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG

Cynomorgus monkey .....A.C....GC

1  
 AGGAGCGTGTCTATCCCCGGACGCATGCAGGGCCCCCAG -----  
 .....A.....T.....-.A..... AGAAGTGTGTCTATTCCCAGATGCATGCAGGGCCCCCGC

-----  
 AGGAGCGTGTACTACCCCGGACTCATGCAGGGC-CCCAC 2  
 AGGAGCGTGTCTATCCCCGGACGCATGCAGGGCCCCCAG  
 ...T.T.....T.....T.....-.-----

3  
 AGGAGCATGTCTATCCCTGGACGCATGCAGGGCCCCCAG 4  
 AGGAGCGTGTACTACCCAGAACGCATGCAGGGCCCCCAG  
 .....G.....T..C...A.....-.A..... .....A...C.....CAG.T.....-.-----

5  
 AGGAGCGTGTACTACCCAGGACGCATGCAGGGCCCCCAG 6  
 TGGAGCGTGTACTACCCAGGACGCATGCAGGGCCCCCAG  
 ..CT.T...C...T...CA..T.....-.----- A...T...C...TT...C.....-.A.....

7  
 AGGAGCGTGTCTATCCCCGGACCGGACGCATGCAGGGCCCCCAG 8  
 AGGAGCGTGTACTACCCAGGACGCATGCAGGGCCCCCAG  
 .....A.....-----T.....-.----- .....A.....

9  
 AGGAGCGTGTACTACCCAGGATGCATGCAGGGCCCCCAG 10  
 AGGAGCGTGTACTACCCAGGACGCATGCAGGGCCCCCA  
 ..A..A...C...T...C...C.....-.----- .....A.....T.....A.....

3'  
 TGCAGGCAGCCTGCAGACCAACACTCTGCCTGCCCTTGAGCCGTGACCTCCAGGAAG  
 ....C....G.....-.....

図1 ドーバミントランスポーター遺伝子の反復領域の塩基配列

ヒトの10回反復（上）とカニクイザル12回反復（下）の塩基配列の比較を示す。・は上と同じ、-は欠失を表す。枠内はプライマーの塩基配列。

# カニクイザルにおける遺伝的連鎖地図の構築

国枝哲夫（岡山大学農学部）

## 研究要旨

老人病及び加齢性疾患と類似する遺伝病に関連する遺伝子を明らかにする目的で、カニクイザルの染色体連鎖地図の作成を進めた。その結果、カニクイザルにおいてはヒトの第7の染色体の約117cM、および第21染色体の約22cMに対応する領域が同一の染色体上に存在していることが確認された。したがって、ヒト7染色体と第21染色体のかなりの部分に対応する領域がカニクイザルの第2染色体に含まれていること、さらにその境界はカニクイザル染色体上約16cMの領域に存在することが明らかとなった。また、APP遺伝子等、ヒトの疾患に関与する第21染色体上の遺伝子はいずれもカニクイザルにおいては第2染色体に存在することが示唆された。

## A.研究目的

本研究は、カニクイザル染色体の連鎖地図を構築することにより、カニクイザルの種々の形質の遺伝学的解析を行うためのシステムを確立することを目的とする。具体的には上記目的のため、ヒトの特定の染色体に位置づけられているマイクロサテライト遺伝子座と対応するマイクロサテライトDNAを用いてカニクイザルの遺伝学的連鎖地図を構築し、ヒトとカニクイザルの染色体の対応を明らかにすること、これらを用いた連鎖解析により、網膜黄斑変性の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかにすることを目的とした。

国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターにて維持されているカニクイザルに出現した遺伝性の網膜黄斑変性はヒトの網膜黄斑変性の病態を解析する上で重要なモデル動物

として期待されている。すでにヒトにおいては、遺伝性の網膜黄斑変性である1型、2型、3型、4型の各Stargardt's病、Best's病、North Carolina黄斑変性、Butterfly-shaped色素変性等の疾患の原因遺伝子の染色体上の位置が明らかとなっていることから、カニクイザルの黄斑変性の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかにすることにより、本疾患がこれらヒトの疾患と同一の遺伝子の変異に起因しているのか否かを明らかにすることが可能である。また、マカカ属サルの染色体とヒト染色体を比較したとき、多くの染色体については1対1の対応関係があるが、カニクイザルの第2染色体はヒトの第7および第21染色体が融合したような形態であることをすでに昨年度の研究においてあきらかとしている。これらのヒトとカニクイザルで一致しない染色体において

、カニクイザルとヒトの染色体の正確な対応関係を明らかとすることは、カニクイザル染色体の遺伝学的な連鎖地図を構築する上で重要であるだけでなく、霊長類の染色体の進化的な変化について考察する上でも重要な知見を与えるものと思われる。すでに、そこで本年度は、カニクイザルの疾患の原因遺伝子が上記のヒトの疾患の原因遺伝子と同一の染色体上の位置に存在するか否かを調べるとともに、カニクイザルの第2染色体を対象とし、カニクイザルとヒトの染色体の正確な対応関係を明らかとすることを試みた。

#### B.研究方法

それぞれ単一の雄に由来する網膜黄斑変性の3家系70個体を含む、8家系の計175個体について、血液より常法によりDNAを抽出し、ヒト第1, 4, 6, 7, 13, 21染色体の領域上のマイクロサテライト遺伝子座用のプライマーをアイソトープラベルし、PCR法による増幅を行った。PCR反応は1.5mM MgCl<sub>2</sub>の反応液中にてアニーリング55℃1分、伸長反応72℃2分、変性92℃15秒の条件にて行った。PCR産物を5%変性ポリアクリルアミドゲルにて1500V、4時間電気泳動の後、X線フィルムに露光し、得られたバンドについて各個体のタイピングを行った。得られた結果について、父親から子供への対立遺伝子の伝達様式に基づいて連鎖解析を行い、各マーカー同士の連鎖を求めるとと

もに、網膜黄斑変性の発生との連鎖を求めた。

#### C.研究結果

ヒト第7, 21染色体上のそれぞれ82, 34のマイクロサテライトマーカーについて、カニクイザルにおいても対応するマイクロサテライトDNAが存在し、多型性を示すか否かを検討した結果、34, 16の断片にて個体間の多型性が認められた。これらのうち、本研究に用いた家系の父親においてヘテロ接合の状態であり、連鎖解析の有効であることが推測された。第7, 21染色体上の7, 4遺伝子座について、各個体のタイピングを行い各遺伝子座の間の組換え率をもとめ、単一のカニクイザル第2染色体の連鎖地図を確立した。連鎖地図上での各遺伝子座は配置はD7S555 - D7S512 - D7S2209 - D7S1790 - D7S821 - D7S495 - D7S667 - D21S212 - D21S1252 - D21S1440 - D21S1446の順であった。5遺伝子座は約100cMの範囲内に分布し、隣接する各2遺伝子座間の距離は0から26.5cMの範囲であった。D21S1259, D21S1409, D7S1869, D7S559については他の遺伝子座と有為な連鎖は認められなかった。また、網膜黄斑変性の家系の中で疾患の発生とこれらカニクイザル第2染色体上のマーカーとの間には有為な連鎖は認められなかった。

さらにヒト第1, 4, 6, 13染色体上のそれぞれ24, 15, 23, 13のマイクロサテライトマーカーに



ついて、同様に検討した結果、それぞれ10, 6, 11, 18のプライマーにおいて個体間の多型性が認められ、本研究に用いた家系の連鎖解析の有効であることが推測された6, 1, 3, 2遺伝子座について、これらのマイクロサテライトマーカ―を用いて網膜黄斑変性の家系の連鎖解析を行った。その結果いずれの染色体上のマーカ―でも本疾患の発生との間に有為な連鎖は認められなかった。

#### D. 考察

染色体上でのマイクロサテライトDNAの位置は哺乳類の近縁種間で保存されることから、同一のプライマーを用いることにより、互いに対応する位置に存在するマイクロサテライトDNAを検出することが可能である。本研究ではヒト第7, 21染色体上のマイクロサテライト遺伝子座用のプライマーを用いることにより、カニクザルの第2染色体上に存在すると考えられるの11遺伝子座よりなる単一の遺伝学的連鎖地図が構築された。その結果、カニクザルにおいてはヒトの第7の染色体の約117cM, および第21染色体の約22cMに対応する領域が同一の染色体上に存在していることが確認された。したがって、ヒト7染色体と第21染色体のかなりの部分に対応する領域がカニクザルの第2染色体に含まれていること、さらにその境界はカニクザル染色体上でD7S667とD21S212の間約16cMの領域に存在することが明らかとな

った。以上の結果、本研究においてカニクザルの第2染色体とヒトの第7および第21染色体との正確な対応関係を明らかとされ、これらの知見は霊長類の染色体の進化的な変化について考察する上で重要であると考えられた。また、APP遺伝子等、ヒトの疾患に関与する第21染色体上の遺伝子はいずれもカニクザルにおいては第2染色体に存在することが示唆された。

ヒトの第1染色体にはカニクザルの疾患と類似した病態を示すヒトの遺伝性の網膜黄斑変性であるStargardt病1型の原因遺伝子が、同様に第4染色体にはStargardt病4型の、第6染色体にはStargardt病3型およびNorth Carolina黄斑変性、Butterfly-shaped色素変性の、第13染色体にはStargardt病2型の原因遺伝子が存在することが知られている。本研究ではこれらのヒト遺伝性黄斑変性の原因遺伝子が存在する領域のマイクロサテライトマーカ―を用いて、カニクザル網膜黄斑変性との連鎖を調べたところ、いずれの染色体においても有為な連鎖は認められず、上記の遺伝子がカニクザルの網膜黄斑変性の原因である可能性は低いと考えられた。しかし、上記染色体のうち第4および第6染色体のマーカ―は、ヒトの疾患原因遺伝子とはまだかなり離れているため、今後、より近接するマーカ―を用いて正確な解析を行う必要があるものと考えられた。

## E. 結論

カニクザルの染色体連鎖地図の作成を進めた。その結果、カニクザルではヒトの第7の染色体、および第21染色体に対応する領域が同一の染色体上に存在していることが確認され、カニクザルの第2染色体に含まれていることが明らかとなった。また、APP遺伝子等、ヒトの疾患に関与する第21染色体上の遺伝子はいずれもカニクザルにおいては第2染色体に存在することが示唆された。

## F. 研究成果

1. A locus responsible for arrest of spermatogenesis is located on rat chromosome 12. Noguchi, J., Kobayashi, E., Shimada, A., Kikuchi, K., Kaneko, H., Takahashi, H., Ikadai, H. and Kunieda, T., 1999. *Mamm. Genome* 10, 189-190.
2. Localization of a locus responsible for the bovine chondrodysplastic dwarfism (bcd) on chromosome 6. Yoneda, K., Moritomo, Y., Takami, M., Hirata, S., Kikukawa, Y., and Kunieda, T., 1999. *Mamm. Genome* 10, 597-600.
3. A locus responsible for hypogonadism (hgn) is located on rat chromosome 10. Suzuki, H., Kokado, M., Saito, K., Kunieda, T., and Suzuki, K., 1999. *Mamm. Genome* 10, 1106-1107.
4. Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. Kunieda, T., Ide, H., Nakagiri, M., Yoneda, K., Konfortov, B., and Ogawa, H. 1999. *Anim. Genet* in press
5. Cloning of bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle. Kunieda, T., Nakagiri, M., Takami, M., Ide, H., and Ogawa, H. 1999. *Mamm. Genome* 10, 1146-1149.
6. The down-regulated in adenoma (Dra) gene encoding intestine-specific anion transporter maps to mouse chromosome 12. Kunieda, T., Takahashi, K., Tsuji, T., Schweinfest, C.W. and Katoh, H. 2000. *Exp. Anim.* 49, 67-68.
7. Allele-specific polymerase chain reaction for identifying carriers of Chediak-Higashi syndrome in Japanese black cattle. Nakagiri, H., Kunieda, T., Ide, H., Yoneda, K., Takami, M., and Ogawa, H. 1999. *Anim. Sci. J.* 70, 372-374.
8. Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine chromosome 1. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Asahina, S., Nishimori, K., Kazuhiro, K., Kunieda, T., Sasaki, Y. *Mamm. Genome* in press
9. Approximation for variance of inbreeding based on multiple paths of pedigree. Oikawa, T., Kunieda, T.,

Sato, T. Anim. Sci. J. in press

10. Hirschsprung 病 (Aganglionosis) 国枝哲夫, 筏井洋, 唐木英明 1999  
Molecular Medicine 36, 132-135.
11. ムコ多糖症 VI (Maroteaux-Lamy 症候群) 国枝哲夫, 吉田緑, 崎山武志 1999 Molecular Medicine 36, 136-139.

## メスおよび卵巣摘出メス・ニホンザルにおける動脈硬化症モデルの作成に関する研究、とくにエストロゲンの抗動脈硬化作用について

鳥居 隆三 (滋賀医科大学医学部附属動物実験施設)

ニホンザルのメス個体に2%コレステロール食を摂取させることにより、血清脂質のT.chol、TG、apolipo-Bの増加と、HDL-chol、apolipo-A1の減少等が見られ、また血管内視鏡観察によって血管壁に著明なアテロームの形成を確認できたことから、動脈硬化症モデルが出来たと判断できた。

さらに、卵巣摘出したメス・ニホンザルに2%コレステロールとともにエストロゲンを摂取させたところ、T.chol増加抑制の傾向やapolipo-A<sub>1</sub>、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加抑制の傾向がみられ、また血管内視鏡観察においても、1年を経過して個体においても血管内腔のアテロームの形成は極めてわずかであるなど、エストロゲンの抗動脈硬化作用を示唆する成績が得られた。

キーワード:ニホンザル、動脈硬化症、血管内視鏡、血清脂質、エストロゲン

### A. 研究目的

ヒトにおける心血管系病変の発症率は、閉経前の若年女性では男性に比べて低いが、その男女差は加齢に伴い減少し、とくに閉経後の女性においては、動脈硬化性病変が急増することが知られている。また近年閉経後の女性に対してホルモン療法が欧米で積極的に行われるようになった結果、臨床、疫学方面から動脈硬化に対する性ホルモンである女性ホルモン(エストロゲン)の抑制効果が議論されるようになってきた。

本年度は動脈硬化性病変の発症にエストロゲンがどの様に関与するのか、とくに抗動脈硬化作用を有するのか否かを明らかにすることを目的として、ニホンザルの動脈硬化症モデルに用いて検討を行った。

すなわち、昨年度、オス・ニホンザルに2%コレステロール食を摂取させることにより血中脂質、とくにコレステロールの増加に伴い血管内腔にはアテロームが形成されることを血管内視鏡によっても確認出来、動脈硬化症モデルの作成に成功した。そこで本年度は昨年度と同じ方法を用いてメス・ニホンザルにおいて動脈硬化症モデルを作成出来るか否かを確認し、さらに卵巣摘出した個体に、2%コレステロール食およびエストロゲンの投与を行い、その時の血中脂質の動態と血管内腔の変化を観察することによって、エストロゲンの抗動脈硬化症作用の有無を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

### B. 研究方法

本実験で用いたコレステロール食は、2%コレステロールを通常飼料(オリエンタル酵母(株)、P S)に噴霧コーティ

ングする方法により作成し、普通食と同じ20g/kg/頭/日を給餌した。また補助食として1頭に付きバナナ1本とサツマイモ100gを与えた。

実験は、1)メス個体における動脈硬化症モデルの作成、および2)卵巣摘出メス個体における動脈硬化症モデルの作成、について検討を行った。

#### 1)メス個体における動脈硬化症モデルの作成

成熟メス・ニホンザル2頭に2%コレステロール食を給餌し、適時血管内視鏡による血管内腔の観察と血清脂質の分析を行った。血清脂質は、総コレステロール(T.chol)、トリグリセライド(TG)、HDL-コレステロール(HDL-chol)、リポ蛋白(a)、アポリポ蛋白 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>およびB(apolipo-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> & B)の分析を行った。

#### 2)卵巣摘出メス個体における動脈硬化症モデルの作成

成熟メス・ニホンザル8頭の、両側の卵巣摘出を行い、エストロゲン分泌がなくなったことを確認した約1ヵ月以降に、人工血管吻合手術を行い、A)通常食、B)2%コレステロール食、C)通常食+エストロゲン、D)2%コレステロール食+エストロゲン、の4群各2頭ずつに分けてそれぞれの飼料を連日与えた。

その後、継時的に昨年度に確立した血管内視鏡による血管内腔の観察を行い、アテロームの発現の有無と血清脂質(総コレステロール(T.chol)、トリグリセライド(TG)、HDL-コレステロール(HDL-chol)、リポ蛋白(a)、アポリポ蛋白 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>およびB(apolipo-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> & B))の分析を行った。

なお、エストロゲンはプレマリン(武田薬品(株))を1頭あたり0.3125mgを、連日バナナと共に摂取させた。

### C. 研究結果

#### 1)メス個体における動脈硬化症モデルの作成(図-1)

メス・ニホンザルにおいても、オスと同じくコレステロール食を給餌した2ヶ月後頃からT.cholは著明に増加し、またTGおよびapolipo-Bの増加と、HDL-cholおよびapolipo-A<sub>1</sub>の減少が見られた。大動脈の内腔は、6ヶ月後頃には腎動脈、上腸間膜動脈、腹腔動脈等の主要分岐起始部、腰動脈起始部等に黄白色の隆起したアテロームの発現を認めた。

この様に、血中脂質は高脂血症の様相が見られ、これを裏付けるように血管内腔においてはアテロームの発現が認められ、メスニホンザルにおいても動脈硬化症のモデルを作成することが出来た。

#### 2)卵巣摘出メス個体における動脈硬化症モデルの作成

##### A)通常食(図-2&3)

卵巣摘出後の血清脂質は、通常食を給餌した個体では、T.cholには大きな変動が見られなかったが、apolipo-A<sub>1</sub>の減少、TGの増加、HDL-cholの減少等の傾向がみられ、動脈硬化症の発症に繋がる様相がみられた。一方、血管内腔は卵巣摘出後1年目の観察においても上腸管膜動脈分岐部にアテロームの形成がわずかに見られる程度であった。

##### B)2%コレステロール食(図-4&5)

卵巣摘出個体に、2%コレステロール食を給餌した個体においては、2ヶ月後頃からT.cholの著明な増加に加えて、TG、apolipo-Bの増加、HDL-chol、apolipo-A<sub>1</sub>の減少がみられた。また血管内腔は2%コレステロール食を給餌3ヶ月後頃からアテロームの形成が見られるようになり、1年を経過したものでは腎動脈、上腸管膜動脈、腹腔動脈の分岐部には著明

な動脈硬化性病変のアテローム形成が見られた。

#### C) 通常食+エストロゲン (図-6 & 7)

卵巣摘出した個体に、エストロゲンのみの投与を行った個体においては、T.chol、TG、apolipo-Bの増加、apolipo-A<sub>1</sub>の減少に対して、血中のエストロゲン値の増加とともに、T.chol、TG、apolipo-Bの減少、apolipo-A<sub>1</sub>の増加の傾向が見られた。また血管内腔においては、エストロゲン投与1年目においても、アテロームの形成は全く見られなかった。

#### D) 2%コレステロール食+エストロゲン (図-8 & 9)

卵巣摘出し、2%コレステロール食とエストロゲンを同時に投与した個体においては、T.cholは速やかに増加したが、1頭では血中のエストロゲン値の増加によって、T.chol抑制の傾向がみられ、また他の1頭でもapolipo-A<sub>1</sub>、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加に対する抑制が見られる傾向にあった。

一方、血管内腔の変化は投与1年目においても2%コレステロール食投与個体に見られたようなアテロームの形成も抑制されているかのように、その発現はわずかなものに止まっていた。

#### D. 考察

昨年度、オス・ニホンザルにおいて動脈硬化症モデル動物を作成出来たが、同じ方法によりメスの個体においても作出出来るか否か検討した。その結果、2%コレステロール食投与によって、T.chol、TG、apolipo-Bの増加とHDL-chol、apolipo-A<sub>1</sub>の減少が見られ、同時に腎動脈、上腸管膜動脈、腹腔動脈の分岐部には著明な動脈硬化性病変のアテローム形成がみられ、ニホンザルのメス個体にお

いても動脈硬化症モデルを作成することが出来た。

次に、エストロゲンの抗動脈硬化作用について検討すべく、成熟個体の卵巣を摘出した個体について検討を加えた。その結果、卵巣摘出後、通常食を摂取させた個体では、apolipo-A<sub>1</sub>の減少やTGの増加、HDL-cholの減少傾向がみられ、動脈硬化症の発症に繋がる様相がみられたが、約1年間の観察においては血管内腔に変化は見られなかった。

卵巣摘出個体に2%コレステロール食を投与した2頭では、2ヶ月後頃からT.cholの著明な増加に加えて、血管内腔は3ヶ月後頃からアテロームの形成が見られるようになった。これは、卵巣摘出しない個体に比べて約1ヶ月早く高脂血症とアテローム形成が出現する傾向にあることを示していた。

一方、エストロゲンのみを投与した個体においては、投与1年程度の期間においては、卵巣摘出個体と大きな差は見られず、これはまたエストロゲンの悪影響がないことをも意味していた。

2%コレステロール食とエストロゲンを同時に摂取させた個体においては、T.chol抑制の傾向やapolipo-A<sub>1</sub>、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加抑制の傾向がみられたが、血清脂質においては著明な改善効果としては見られなかった。しかし、血管内腔は1年を経過したものにおいても、アテロームの形成は極めてわずかであり、動脈硬化病変の抑制が明らかに認められた。

以上のように、エストロゲンの抗動脈硬化作用が示唆される成績が得られた。しかし、いまだ1年の実験期間であることと、例数も各群2頭であることから、十分な成績が得られたとはいえず、引き

続き経過の観察を行わねばならないと考える。また、エストロゲンの投与方法としてバナナに混入させる方法を用いたが、本薬剤は苦みが強く連日の投与において、忌避する個体もありその結果血中でのエストロゲン値が高値を維持できない個体も見られ、今後投与方法を検討する必要がある。また、実験個体を増やし、さらに継続して観察する事によってエストロゲンの効果をより明確にしたい。

#### E. 結論

ニホンザルのメス個体に2%コレステロール食を摂取させることにより、血清脂質のT.chol、TG、apolipo-Bの増加と、HDL-chol、apolipo-A<sub>1</sub>の減少等が見られ、また血管内視鏡による腹腔動脈の血管内腔の観察から血管壁に著明なアテロームの形成を確認できたことから、動脈硬化症モデルが出来たと判断できた。

さらに、エストロゲンの抗動脈硬化作用を確認するため、卵巣摘出したメス・ニホンザルに2%コレステロールとともにエストロゲンを摂取させたところ、T.chol抑制の傾向やapolipo-A<sub>1</sub>、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加抑制の傾向がみられ、また血管内視鏡観察では1年を経過したものにおいても、アテロームの形成は極めてわずかであり、エストロゲンの抗動脈硬化作用を示唆する成績が得られた。

#### F. 引用文献

- 1) Riedel, M., Rafflenbeul, W. & Lichtlen, P., Ovarian sex steroids and atherosclerosis, Clin.Investig., 71, 406-412, 1993.
- 2) Davidson, M.H., Testolin, L.M., Maki, K.C., Duvillard, S. & Drenman, K.B., A comparison of estrogen replacement,

pravastatin, and combined treatment for the management of hypercholesterolemia in postmenopausal women, Arch. Intern. Med., 157, 1186-1192, 1997.

#### G. 発表論文

##### 1. 論文発表

- 1) 池田識道、鳥居隆三、血管内視鏡による動脈硬化性病変の生体内継時的観察、脈管学、39 (10) , 513-518, 1999.

##### 2. 学会発表

- 1) Ikeda N. & Torii, R., Angioscopic evaluation of the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on atherosclerosis in Japanese monkeys, Proceeding of the fifth Saratoga international conference on atherosclerosis, 59, 1999.
- 2) 池田識道、奥村悟、神吉豊、野田信一、加藤美保子、田仲伸行、辻村吉紀、鳥居隆三(1999)、雌ニホンザルを用いた動脈硬化作成実験とエストロゲンの抗動脈硬化作用に関する検討、第40回日本脈管学会総会。

図-1 メス・ニホンザルへの 2%コレステロール食 投与後の  
 血中脂質の動態

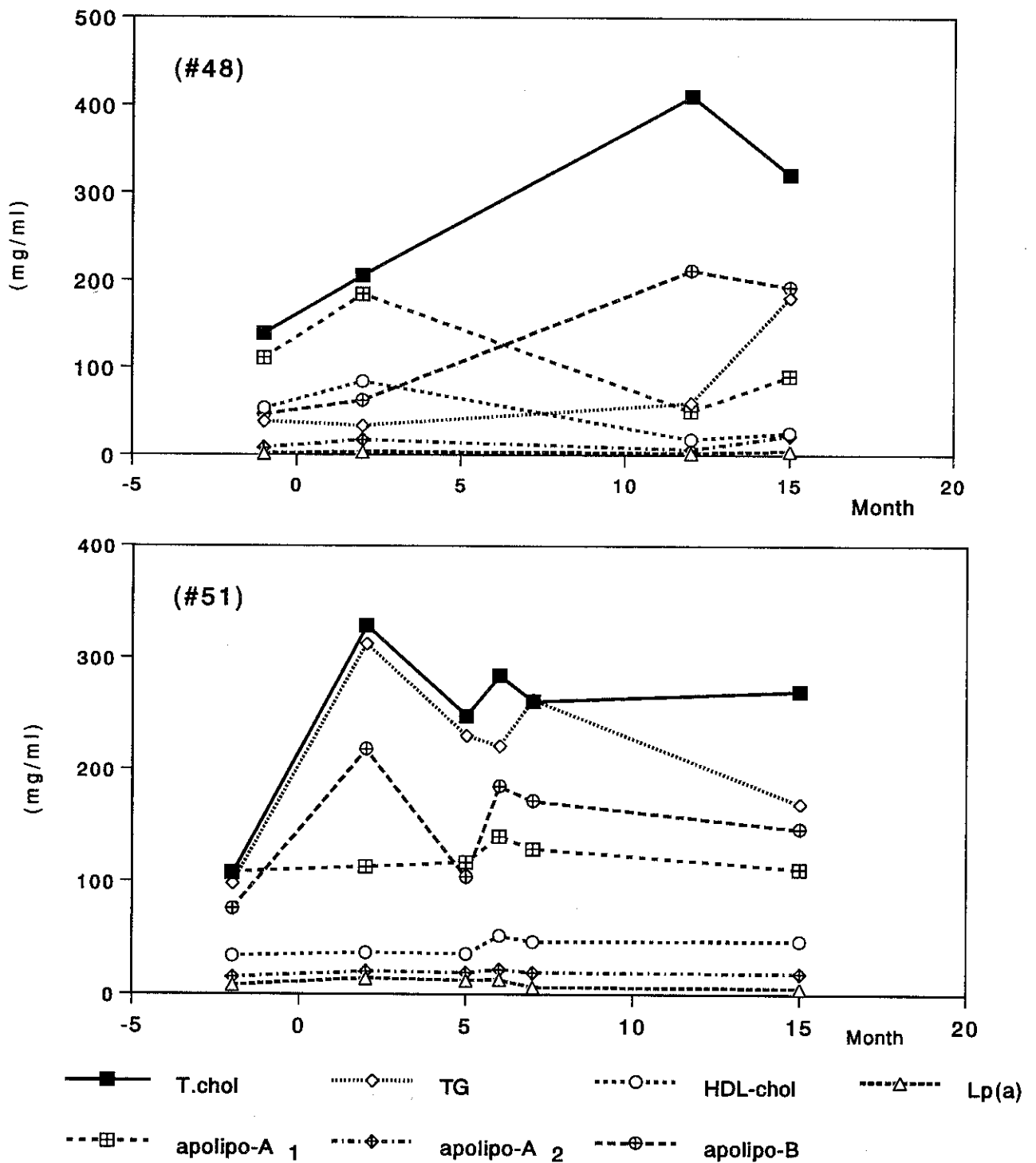
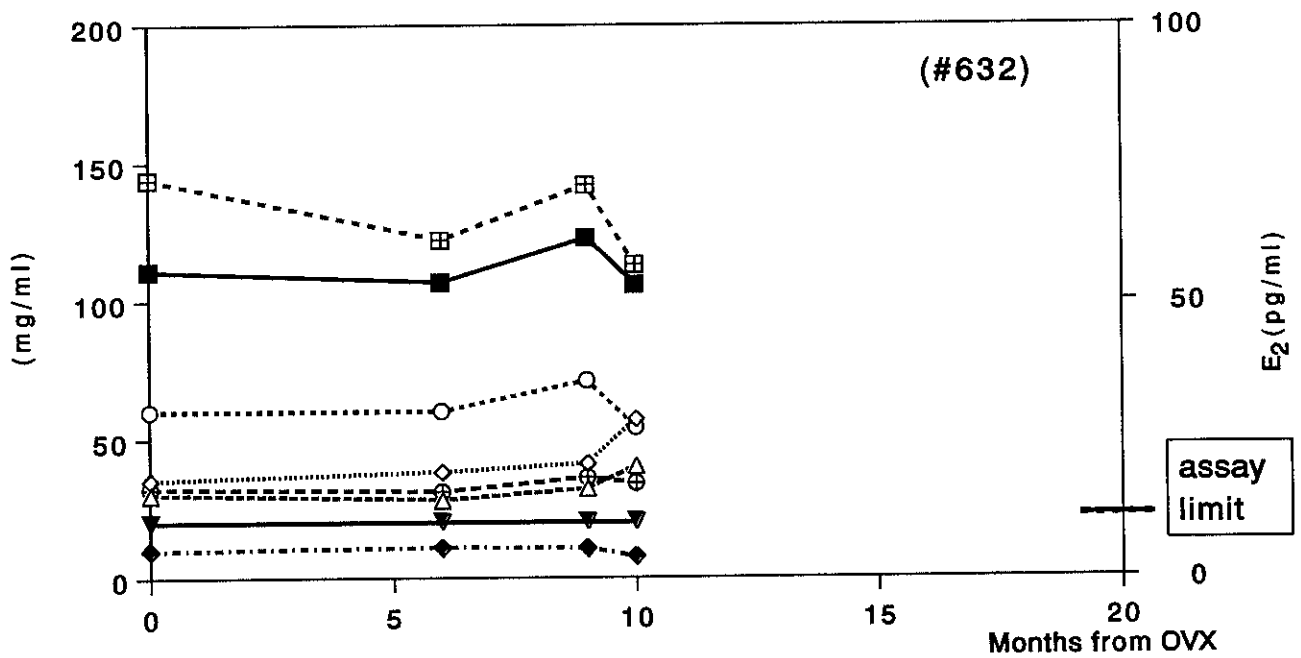
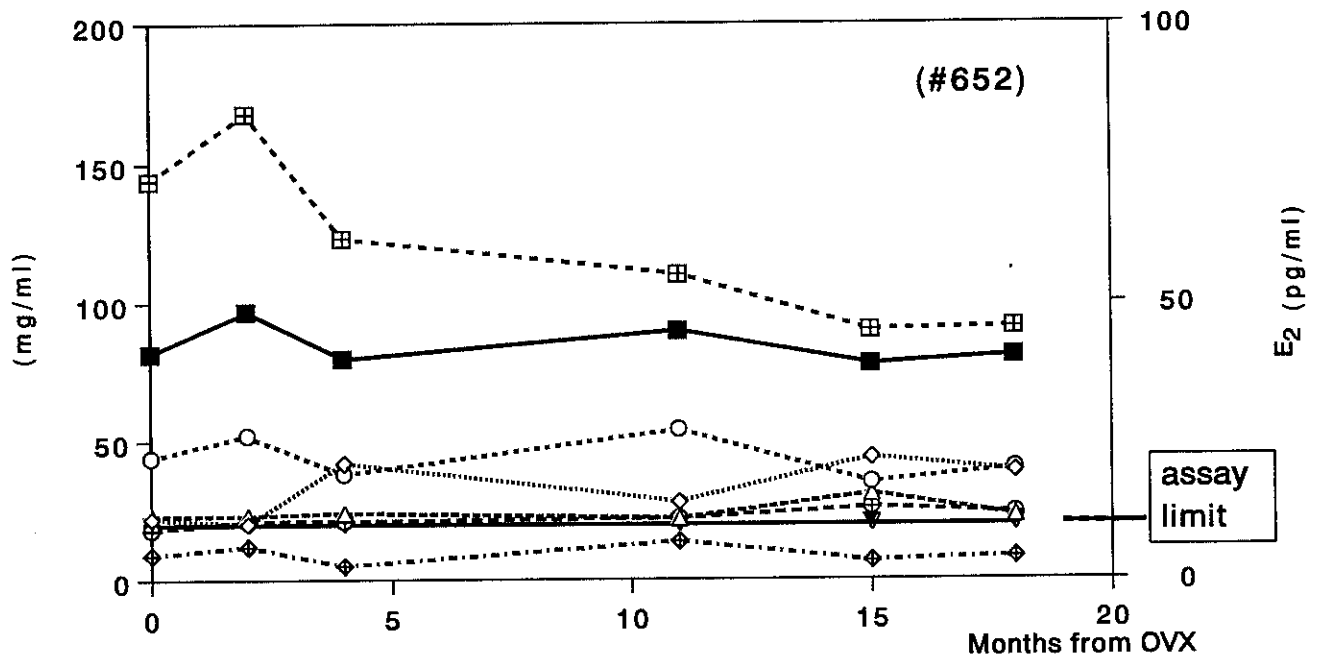




図-2 卵巣摘出メス・ニホンザルの血中脂質の動態



—■— T.chol      .....◇..... TG      .....○..... HDL-chol      - - -△- - - Lp(a)  
 - - -□- - - apolipo-A<sub>1</sub>      - - -◇- - - apolipo-A<sub>2</sub>      - - -⊕- - - apolipo-B      —▼— E<sub>2</sub>

図-3 卵巣摘出メス・ニホンザル (通常食)

( # 652 )

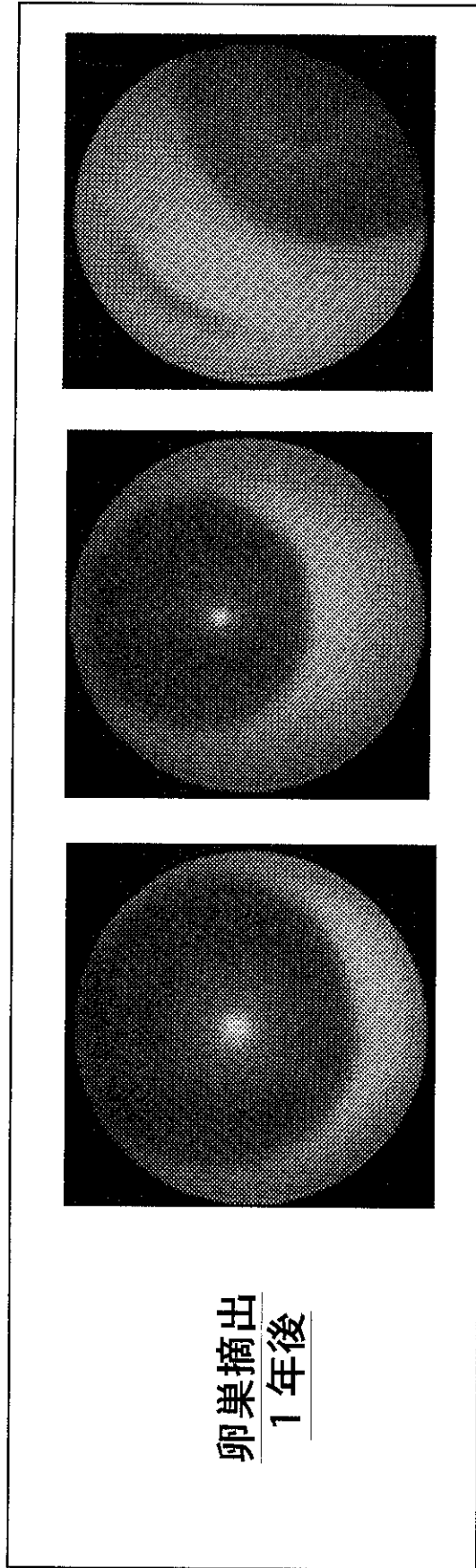


図-4 卵巣摘出メス・ニホンザルへの 2%コレステロール 食投与後の血中脂質の動態

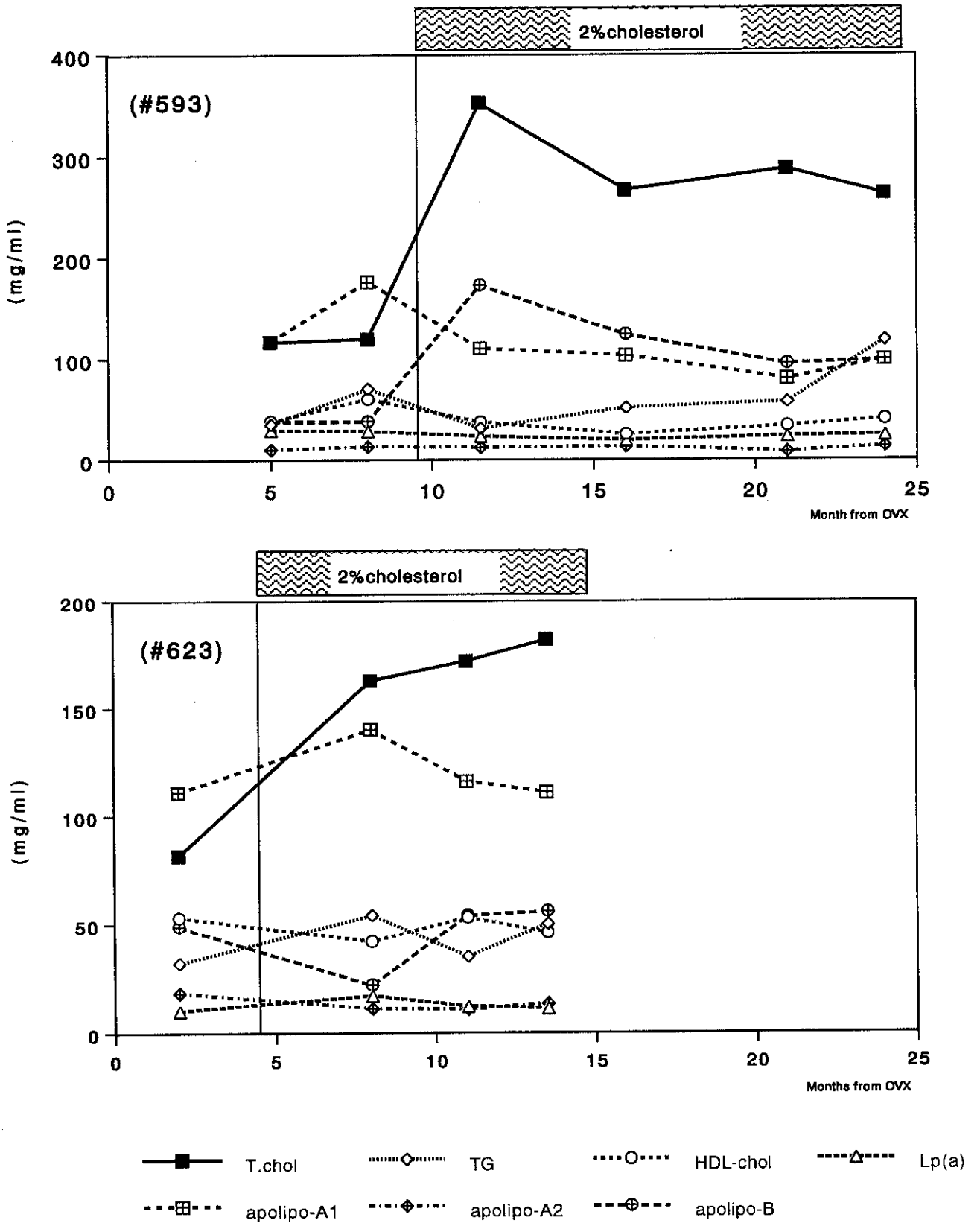


図-5 卵巣摘出メス・ニホンザルへの2%コレステロール食投与

(# 593)

