

- 5) 井上-村山美穂, 安達さとみ, 新美陽子, 三谷宏明, 竹中修, 村山裕一: 霊長類におけるドーパミントランスポーター遺伝子の多型解析. (日本霊長類学会第 16 回大会) 霊長類研究 16: 245, 2000 (名古屋).
- 6) 井上-村山美穂: 霊長類における神経伝達物質関連遺伝子多型の進化. (類人猿を中心とする霊長類ゲノム研究会) 2000 (三島).
- 7) 新美陽子, 村山美穂: イヌの行動に関する遺伝子を探して. (第 5 回ムギ類分子生物学研究会) 2000 (岐阜).
- 8) 井上 (村山) 美穂, 新美陽子: 霊長類とイヌにおける神経伝達物質関連遺伝子の多型. (研究会「動物行動の遺伝学」) 2000 (三島).
- 9) 森裕司, 橋爪千恵, 増田宏司, 菊水健史, 竹内ゆかり, 井上 (村山) 美穂, 新美陽子: カリフォルニア盲導犬協会を舞台にした行動関連遺伝子の探索. (国立遺伝学研究所研究会「動物行動の遺伝学」) 2000 (三島).
- 10) 新美陽子, 井上-村山美穂, 加藤和実, 松浦直人, 村山裕一, 伊藤慎一, 桃井康行, 紺野克彦, 岩崎利郎: イヌにおけるドーパミン受容体 D4 遺伝子多型領域の解析. 日本 DNA 多型学会第 9 回学術集会要旨: 42, 2000 (千葉).
- 11) 松浦直人, 新美陽子, 井上-村山美穂, 伊藤慎一, 古橋博昭, 下重貞一, 岩崎利郎, 外崎肇一: サービスドッグの行動特性とドーパミン受容体 D4 遺伝子多型との関連性. ヒトと動物の関係学会第 7 回学術大会, 2001 (東京) (発表予定).
- 12) 井上 (村山) 美穂, 山崎肇史, 田原浩司, 長石広志, 齊藤剛, 高野昇一, 杉本喜憲, 麻生久: ウシ脂肪前駆細胞の分化に伴い発現増加する遺伝子群の単離と解析. 日本畜産学会第 98 回大会 (招待講演), 2001 (仙台) (発表予定).
- 13) 山崎肇史, 田原浩司, 井上 (村山) 美穂, 長石広志, 齊藤剛, 麻生久, 高野昇一: ウシ脂肪前駆細胞の分化に伴い発現増加する遺伝子群の単離と解析. 日本畜産学会第 98 回大会, 2001 (仙台) (発表予定).

表1 対立遺伝子の分布

分類	個体数	反復配列数					
		DRD4*		5-HTT**		DAT1*	
		4	5	22	23	11	12
老齢個体	45	5 (0.056)	85 (0.944)	4 (0.044)	86 (0.956)	0 (0.000)	90 (1.000)
対照個体	45	4 (0.044)	86 (0.956)	0 (0.000)	90 (1.000)	1 (0.005)	199 (0.995) ***

*：有意差なし

**：有意差あり ($P < 0.05$)

***：100個体を解析

() 内は対立遺伝子頻度を示す

表2 MAO A多型領域の対立遺伝子頻度

対立遺伝子数	多型領域の長さ		反復配列数 (18 bp)			反復配列数 (30 bp)				
	S	L	2	3	5	1	3	3.5	4	5
ヒト*	2156						768	12	1345	31
ヒト (アジア人) *	82						50	1	31	
チンパンジー	65					65				
ゴリラ	15		13	1	1					
オランウータン	28	5	23							
テナガザル	24	4	20							

* : Sabol *et al.* , 1998.

□ : 塩基配列を確認済み

飼育下の雌カニクイザルを対象とする肥満の研究

分担研究者 吉田高志 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター)

研究要旨

霊長類センターの大規模人工繁殖コロニーで長期間飼育されている雌カニクイザルを対象として肥満個体の発生状況について調査を行なった。成長過程を終えた5歳齢以上の648頭の体重に解析を加えた。このなかで肥満個体が占める割合は23.2%であり、境界型が12.3%、正常と判断されたのはわずかに過半数(64.5%)を占めるに過ぎなかった。これらの測定値を用いて加齢と肥満の発生状況について解析が加えられた。またこれとは別に6~34歳齢の成熟もしくは老齢に到る雌カニクイザル78頭(エイジングファームの個体)を対象とし、血液学的ならびに血清生化学的項目ならびに肥満関連ホルモンについて測定を行なった。同時に体重を測定し、体重とそれらの測定値との関係を重回帰分析法の適用によって調べた。その結果、肥満と脂質代謝・糖代謝との関係、および肥満の結果としての多血症との関係が実証された。

A. 研究目的

各種の生活習慣病、例えば糖尿病・高血圧症・動脈硬化症・狭心症等の最も大きな危険因子(リスク・ファクター)として肥満が注目されている。肥満は、基本的には食事に由来する摂取エネルギー量と、生活活動に伴う消費エネルギー量との差によってもたらされるものであり、ヒトでは血液の血糖値や中性脂肪・コレステロール値等が指標として用いられている。我々も飼育下のカニクイザルの健康状態を把握するために種々の血液学的および血清生化学的測定値を用いてきた。他方、ヒトの場合、体格的には、体重を身長³で除したローレル指数等が肥満の指標として用いられている。しかし、脊柱が前方に湾曲し、かつ膝を真っ直ぐに伸ばす事が出来ず完全な直立姿勢をとることの困難なカニクイザルで、

身長を正確に測定する事は出来ない。そのためにこのような指数を用いることはカニクイザルではできない。ところで、我々は、二波長X線密度測定装置(DXA)による全身の測定を雌カニクイザルに実施し、その全身骨量・軟部組織量(筋肉量・脂肪量)および軟部組織に占める脂肪の割合(%Fat)を測定し、%Fatの値が雌カニクイザルの肥満指数として非常に優れたものであり、体重と良く相関することを報告した(成田ら、1994)。そこで体重を指標として霊長類センターの雌カニクイザルでの肥満の発生状態を調査するとともに、体重と血液学的および血清生化学的測定値との関係について解析することを試みた。血清の測定については肥満関連ホルモン(インスリン・レプチン)についても併せて行なった。

B. 研究方法

霊長類センターで飼育管理されている雌カニクイザルで1999年中の定期健康検査に該当した5歳以上の繁殖用動物で、検査時点で妊娠・保育中あるいは疾病罹患が発見された例を除いた648頭の体重の解析を行ない、肥満の発生状況について検討を加えた。雌カニクイザルの場合、4Kgまでが標準体重、4.5Kg以上のものが肥満個体、その間のものを境界型とする事とし、先の648頭に当てはめた。また動物を5歳毎に3群に分け肥満個体の発生率を χ^2 -検定によって比較した。さらに例数の比較的まとまっている17歳以下の個体で一歳毎に体重が4.5Kg以上の個体の出現率を算出した。

それとは別に、6～34歳齢の成熟もしくは老齢に到る雌カニクイザル78頭（エイジングファームの個体群）を対象とし、血液学的（6項目）および血清生化学的測定項目（11項目）ならびに肥満関連ホルモンについての測定を行なった。測定項目およびその略称は表に示した（表1）。採血と同時に体重を測定した。そして体重とそれら測定値との相関関係、および血液関係の測定項目相互の相関関係について解析するとともに、多変量解析法のひとつである重回帰分析法の適用を行なった。すなわち体重を目的変数とし、血液関係の19項目を説明変数として解析を加えた。

C. 研究結果

648頭中で肥満個体の占める割合は23.2%であり、境界型が12.3%、正常と判断されるものはわずかに過半数（64.5%）を占めるに過ぎなかった（図1）。さらに、

各年齢群での発生率を見ると（図2）、5-10歳齢群（ $n=364$ ）では肥満個体8.3%、境界型10.4%、11-15歳齢群（ $n=166$ ）では肥満個体31.9%、境界型15.1%、16-20歳齢群（ $n=103$ ）では肥満個体47.6%、境界型14.6%であり、加齢に伴っての肥満個体の増加は統計学的に有意であった（ $P<0.01$ ）。また、各年齢群での肥満個体の発生率を詳細に見た（図3）。5・6歳齢で数%しかいなかった肥満個体は、7歳齢から11歳齢にかけて10から20%程度にまで増加する。そして、12歳齢で約35%に一気に増加し、それ以上の年齢群では50%前後の値を呈していた。

あらたな78頭の動物での体重と血液関係の測定との結果を表に示す（表2）。体重と有意（ $P<0.05$ ）に相関した項目は、レプチン・インスリンおよび赤血球関係ならびに血糖・中性脂肪であった（表3）。体重と有意に相関したこれらの項目について図に示す（図4）。また血液関係の測定項目間の相関関係についても表に示した（表3）。19項目、171の組み合わせのなかで42の組み合わせ（24.6%）で統計学的に有意な（ $P<0.05$ ）相関性が検出され、そのうち24の組み合わせ（14.0%）で高い相関（ $P<0.01$ ）が検出された。さらに、重回帰分析法の適用の結果、体重と血液関係の測定値の間にはきわめて高い相関関係が認められ重相関係数 $r=0.818$ （ $P<0.001$ ）であった。血液関係の測定項目のうちレプチン、インスリンおよび赤血球関連（MCV・RBC）の4種の測定項目によって66.9%の情報の集約が果された（表4）。

D. 考察

霊長類センターでは、医学実験用のカニクイザルの大規模人工繁殖を行っている。このような施設で、繁殖効率を低下させるような肥満個体の発生が現場の課題として問題視されてきている。しかし肥満個体の発生率や、肥満発生年齢、等未だ十分な調査が行なわれているとは言えない。ところで、我々は、雌カニクイザルをDXAによって全身の測定を行ない、%Fat値を測定した。そして、この値と血液学的ならびに血清生化学的測定値との関係を多変量解析法のひとつである正準判別分析法の適用によって解析した。その結果、血液性状値から正常と判断されるのは%Fatが25～35の範囲のもので、40以上では血液に明らかに肥満の影響が認められ、その間の35から40は境界型と判断される、と結論した(田中ら、1995)。そして、%Fat値が35のとき体重は4.0Kg、40のとき4.5Kgに対応する事を明らかにした(成田ら、1994)。この事から、煩雑なDXAによる全身の測定をしなくとも体重によって雌カニクイザルの肥満の程度をある程度的確に把握できるものと結論した。ところで霊長類センターでは、定期的な体重測定を実施している。この測定値を利用して繁殖コロニーでの肥満の発生状況を調査したわけである。調査対象動物の偏りによる測定値のゆがみを生じさせないよう、1999年の一年間の測定値を無作為に選び、その中から調査対象として不適当な妊娠・保育中の動物および明らかに病気の動物、および成長過程にある5歳齢以下の個体(清水ら、1993)の測定値をはぶいて解析の対象とした。

648頭を対象とする体重の分布を見ると、3Kgから4Kgの範囲内に多くの個体が含まれた(図1)。ちなみに、我々は、雌カニクイザルの場合、%Fatが25以下をるい瘦個体とみなしており(田中ら、1995)、体重的にはほぼ3Kg弱に相当する(成田ら、1994)。そして、4Kgから4.5Kgを境として体重の重い方向に長く裾野を引く分布でだった。これらの個体を年齢にしたがって三群に分けて分布を見ると、明らかに年齢が増加するに伴って肥満個体の割合は増加する(図2)。そしてそれとともに、何れの年齢群でも常に10～15%の境界型の個体が含まれていた。すなわち、年齢が高まるとともに境界型から肥満個体が現れて境界型が減少するにもかかわらず、あらたに正常型から境界型へと移行しているものと判断される。そして、各年齢群での肥満個体の割合を詳細に見ると、それまで数%でしかなかった肥満個体が6歳齢から7歳齢に成るところで一挙に約15%へと増加する(図3)。霊長類センターでの初産の例数のうち最も多いのは、5歳齢～6歳齢にかけてであり、その前後の時期の約2倍にもものぼる(未発表)。6歳齢から7歳齢での肥満個体の増加は、妊娠・分娩・哺乳にともなう母体の生理的変化を何らかの形で反映しているのであるのかもしれない。今後の詳細な調査が要望される。また、11歳齢を越えてからの肥満個体の急増の原因についても、現在、不明である。しかし、実験用カニクイザルの大規模人工繁殖施設での、動物の長期飼育のための基礎的条件を再検討する事の必要性を示唆しているものと思われる。

他方、体重を肥満の指標とし、血液学的な

らびに血清生化学的測定値、ならびに肥満関連の二種類のホルモンの血中濃度との関係を解析した結果では、19項目による測定値の内、三種類の血液学的項目、二種類の血清生化学的項目および二種類の肥満関連ホルモンが、体重と有意に相関した。しかし、相関係数が0.6前後であった肥満関連ホルモンであるレプチンやインスリンと異なって、血液関係の5項目の項目では相関係数は0.3前後の統計学上では有意な相関ではあるが、比較的弱いものであった。またこのような項目毎での単相関による比較では体重と、それぞれの項目との係わりかたの意味が読み取れない。さらに、これらの血液関係の測定項目は、それぞれが体重と相関したりしなかったりするのみならず、測定項目相互の間でも相関関係が存在する事もある。すなわち、19項目の測定による項目間相互の171の組み合わせで、24.6%に当る42の組み合わせで統計学的に有意な相関関係が検出された。そのうちの24の組み合わせではかなり高い相関であった。そのために、このような項目相互の相関関係にも考慮を払った解析方法の適用が要望される。そこでそのような方法としての多変量解析法の適用を行ったわけである。具体的な方法としては、体重と血液関係の測定項目との関係を解析するために、体重を目的変数とし、血液関係の測定項目を説明変数とする重回帰分析法を採用した。分析の結果、レプチン・インスリン・平均血球容積・赤血球数の4項目の測定によって体重の66.9%を説明できる事が判明した。そしてこれら4項目の測定値から算出された合成変数と、体重の測定値との間の重相関係数は、きわめて高

値であることが示された ($P < 0.001$)。すなわち、雌カニクイザルの肥満には、レプチンが意味する脂肪代謝とその結果の脂肪の蓄積、インスリンが意味する糖代謝とそれと密接に関連する糖尿病、そして肥満に伴う基礎代謝量の増大とそれを代償する平均血球容積の増大(質の変化)および赤血球数の増加(量の変化)等が密接に関連する事が実証された。これらのことは、ヒトの肥満においても指摘されていることである。雌カニクイザルをヒトの肥満研究の実験モデルとして使用することの有用性をここに指摘することが出来よう。他方、今回得られた重回帰式には、脂肪蓄積と直接関係すると考えられる血清中の脂質濃度(TCHO、TG)や、糖尿病と関係する血糖値(GLU)が取り込まれなかった。これは、単独で見た場合、これらの項目と体重との相関係数が、レプチンやインスリンのそれよりも小さかったため、結果的に後者がそれらを代表する形で取り込まれたのであろう。また赤血球関係でも赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の三者の相関関係が極めて高かったため、それらを代表する形で赤血球数が回帰式に取り込まれたものと推測される。そして、赤血球数と逆相関した平均血球容積を式に取り込むことによって、回帰式からの体重の推定値と実体重との一致度(寄与率)が高まるということで式に取り込まれたものと判断される。

E. 結論

霊長類センターの大規模繁殖施設での長期飼育コロニーの中で肥満個体の占める割合は23.2%であり、境界型が12.3%、正常と

判断されるものはわずかに過半数(64.5%)を占めるに過ぎなかった。またそれまで数%でしかなかった肥満個体は、6歳齢から7歳齢に成るところで一挙に約15%へと増加する。この増加は、ほぼ集団の初産年齢に対応し妊娠・分娩・保育にともなう母体の生理的変化の反映であろうと推測される。また、11歳齢を越えてからの肥満個体の急増の原因については現在不明である。しかし、実験用カニクイザルの大規模人工繁殖施設での、動物の長期飼育のための基礎的条件を再検討する事の必要性を示唆しているものと思われる。さらに、成熟もしくは老齢に到るエイジングファームの雌カニクイザルの体重と血液関係の測定項目ならびに肥満関連ホルモンについての測定を行ない、重回帰分析による解析を行ったことにより、肥満と脂質代謝・糖代謝および肥満の結果としての多血症との関係が実証された。

F. 引用文献

成田勇人、大久保文雄、吉田高志、長文昭、吉川泰弘(1994). カニクイザルの骨量・軟部組織量の生体計測、実験動物. 43:369-374.

清水利行、吉田高志、長文昭、後藤信男(1993). カニクイザルの形態学的成長:出生から6歳令までの縦断的成長、実験動物. 42:151-158.

田中佐絵子、成田勇人、大藤圭子、吉田高志、長文昭、吉川泰弘(1995). カニクイザルの血液・血清生化学的測定値と脂肪との関係の解析、成長. 34:43-48.

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyamoto, S., Chen, Y., Kurotori, T., Sankai, T., Yoshida, T., and Machida, T.: Monitoring the Reproductive Status of Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) Measuring the Steroid Hormones in Fecal Samples. *Primates* (in press)

Yoshida, T., Matsumuro, M., Miyamoto, S., Muroyama, Y., Tashiro, Y., Takenoshita, Y. and Sankai, T.: Monitoring the Reproductive Status of Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*) by Measurement of the Steroid Hormones in Fecal Samples. *Primates* (submitted)

Chen, Y., Ono, F., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Relationship Between Obesity and Serum Biochemical Measurements in Female *Cynomolgus* Monkeys. (in preparation)

Liang, J.-H., Sankai, T., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Immunolocalization of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in *Cynomolgus* Monkey (*Macaca fascicularis*) Testes During Postnatal Development. *J. Med. Primatol.* (in press)

Chen, Y., Shimizu, M., Sato, K., Koto, M., Tsunemi, K., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Effects of Aging on Bone Mineral Content and Bone Biomarkers in Female *Cynomolgus* Monkeys. *Exp. Anim.* 49,163-170,2000.

Liang, J.-H., Sankai, T., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Comparison of the Effects of Two Fixatives for Immunolocalization

of Testosterone in the Testes of the Cynomolgus Monkey, Mouse, and Rat. *Exp. Anim.* 49:301-304,2000.

Yoshida, T.: Similarities and Differences in Reproductive Endocrinology Between Non-Human Primates and Humans. *Cong. Anom.* 39:209-222,1999.

2. 学会発表

上屋英明、吉田高志、山海 直：カニクイザルの排卵時期における血中ステロイドホルモン濃度. 第129回日本獣医学会、2000年4月、つくば.

土屋英明、吉田高志、山海 直：妊娠カニクイザルの膣インピーダンス値と血中ステロイドホルモン濃度の動態. 第47回日本実験動物学会、2000年5月、徳島.

宮本幸子、陳 楊、中村紳一郎、山海 直、吉田高志：雄カニクイザルの活性型ステロイドホルモンの消化管中への放出. 第71回日本動物学会、2000年9月、東京.

宮本幸子、陳 楊、中村紳一郎、山海 直、吉田高志：雄カニクイザルの消化管組織および消化管内容物中の活性型ステロイドホルモン. 第5回日本生殖内分泌学会、2000年12月、大阪.

表 1. 本研究で測定された肥満関連ホルモンおよび血液学的・血清生化学的測定項目ならびにその略称

Item	Abbreviation
Obesity related factors	
Leptin	Leptin
Insulin	Insulin
Heamatological items	
White blood cell count	WBC
Red blood cell count	RBC
Hemoglobin concentration	HGB
Hematocrit value	HCT
Mean corpuscular volume	MCV
Platelet count	PLT
Serum biochemical items	
Total protein concentration	TP
Albumin concentration	ALB
Blood urea nitrogen	BUN
Glucose concentration	GLU
Total cholesterol concentration	TCHO
Triglyceride concentration	TG
Inorganic phosphorus concentration	P
Calcium concentration	Ca
Glutamic oxaloacetic transaminase activity	GOT
Glutamic pyruvic transaminase activity	GPT
Alkaline phosphatase activity	ALP

表 2. 本研究に用いられた動物の測定値

Abbreviation	Unit	Mean \pm S.D.
Body Weight	kg	4.49 \pm 1.06
Obesity related factors		
Leptin	ng/ml	2.99 \pm 1.99
Insulin	μ U/ml	26.8 \pm 18.8
Heamatological items		
WBC	$\times 10^2/\mu$ l	81.2 \pm 28.4
RBC	$\times 10^4/\mu$ l	591 \pm 68
HGB	g/dl	11.5 \pm 1.6
HCT	%	40.3 \pm 4.4
MCV	fl	68.4 \pm 5.6
PLT	$\times 10^4/\mu$ l	37.8 \pm 8.9
Serum biochemical items		
TP	g/dl	7.15 \pm 0.51
ALB	g/dl	3.73 \pm 0.37
BUN	mg/dl	16.7 \pm 4.5
GLU	ng/dl	54.2 \pm 18.1
TCHO	mg/dl	162 \pm 42
TG	mg/dl	111 \pm 122
P	mg/dl	4.10 \pm 1.05
Ca	mg/dl	9.49 \pm 0.58
GOT	IU/l	34.9 \pm 10.8
GPT	IU/l	33.9 \pm 21.3
ALP	IU/l	282 \pm 119

表3. 体重ならびに各測定項目間の相関行列

	BW	leptin	insulin	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	PLT	TP	ALB	BUN	GLU	TCHO	TG	P	CA	GOT	GPT	ALP
BW	—	0.6561**	0.5872**	0.0467	0.1868	0.3827**	0.4750**	0.3520**	-0.0476	0.0511	0.0758	-0.1488	0.4254**	0.2219	0.3289**	0.1559	0.0253	-0.0951	0.0626	-0.1828
leptin		—	0.4718**	-0.0405	0.2411	0.2347*	0.3523**	0.1209	0.0964	-0.0573	-0.2141	-0.2930*	0.2897*	0.2103	0.3316**	-0.0118	0.0324	0.1814	-0.0256	-0.2422*
insulin			—	0.1710	0.1659	0.2668*	0.3182**	0.1711	0.1521	0.1122	-0.0408	-0.1675	0.4451**	0.3920**	0.5164**	-0.0234	0.1981	-0.0526	-0.1018	-0.1371
WBC				—	-0.0994	0.1500	0.0420	0.1888	0.1377	0.1093	0.0076	0.2790*	0.0871	0.1586	0.0548	0.0451	0.2009	-0.0679	-0.0639	-0.1954
RBC					—	0.5316**	0.7129**	-0.4536**	0.0425	0.0127	-0.0084	0.0219	0.0565	0.4932**	0.1857	0.0222	0.1006	0.1046	-0.2738*	-0.0400
HGB						—	0.9307**	0.4576**	0.0711	0.0955	0.2463*	0.1008	0.2379*	0.3559**	0.2562*	0.0893	0.3165**	-0.1718	-0.1352	-0.2117
HCT							—	0.2968*	0.0202	0.0680	0.1647	-0.0054	0.2182	0.4123**	0.2622*	0.0871	0.2250	-0.0898	-0.1642	-0.1461
MCV								—	-0.0237	0.0587	0.2191	-0.0106	0.1895	-0.1402	0.0742	0.1008	0.1534	-0.2483*	0.1417	-0.1478
PLT									—	0.1063	-0.0743	0.1195	0.1311	0.1741	0.2889*	0.0841	0.3880**	0.1931	-0.0426	0.0175
TP										—	0.6412**	-0.0486	0.1443	0.2222	0.0881	0.1862	0.5780**	0.1634	0.1455	0.1664
ALB											—	0.0591	0.0807	0.1153	-0.0853	0.1634	0.5031**	-0.1076	0.1775	0.0812
BUN												—	-0.1656	0.0247	-0.1615	0.2936*	0.1082	0.1068	-0.0729	0.1075
GLU													—	0.1552	0.6382**	0.1965	-0.3025**	-0.1033	-0.0594	0.0857
TCHO														—	0.3310**	-0.1419	0.3640**	-0.0307	-0.2659*	0.0857
TG															—	0.1350	0.2065	-0.0624	-0.0847	-0.0584
P																—	0.1278	-0.0991	0.0422	0.1606
CA																	—	0.1274	-0.1270	0.0651
GOT																		—	0.2635*	0.1107
GPT																			—	0.0343
ALP																				—

Each cell shows coefficient for regression analyses.
 ** P<0.01 * P<0.05

表 4. 体重を目的変数とする重回帰分析結果

Item	Leptin	Insulin	MCV	RBC
Partial regression coefficient	247.49	18.16	49.97	3.05
Standard Regression Coefficient	0.4645	0.3211	0.2634	0.1949

Multiple regression coefficient $R=0.818$, $P<0.001$

Coefficient of determination (%)=66.9%

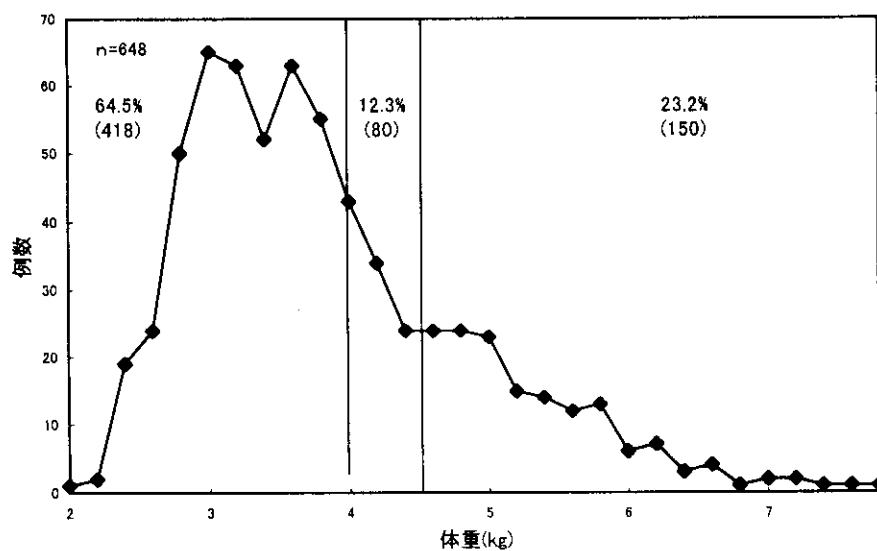


図 1. 大規模繁殖コロニーで長期間飼育されている雌カニクイザルの体重の分布。体重4 K g以下を正常、4 - 4.5 K gを境界型、4.5 K g以上を肥満個体と定義した(縦線)。それぞれの動物の全体に占める割合(%)と頭数(カッコ内)を図中に示す。

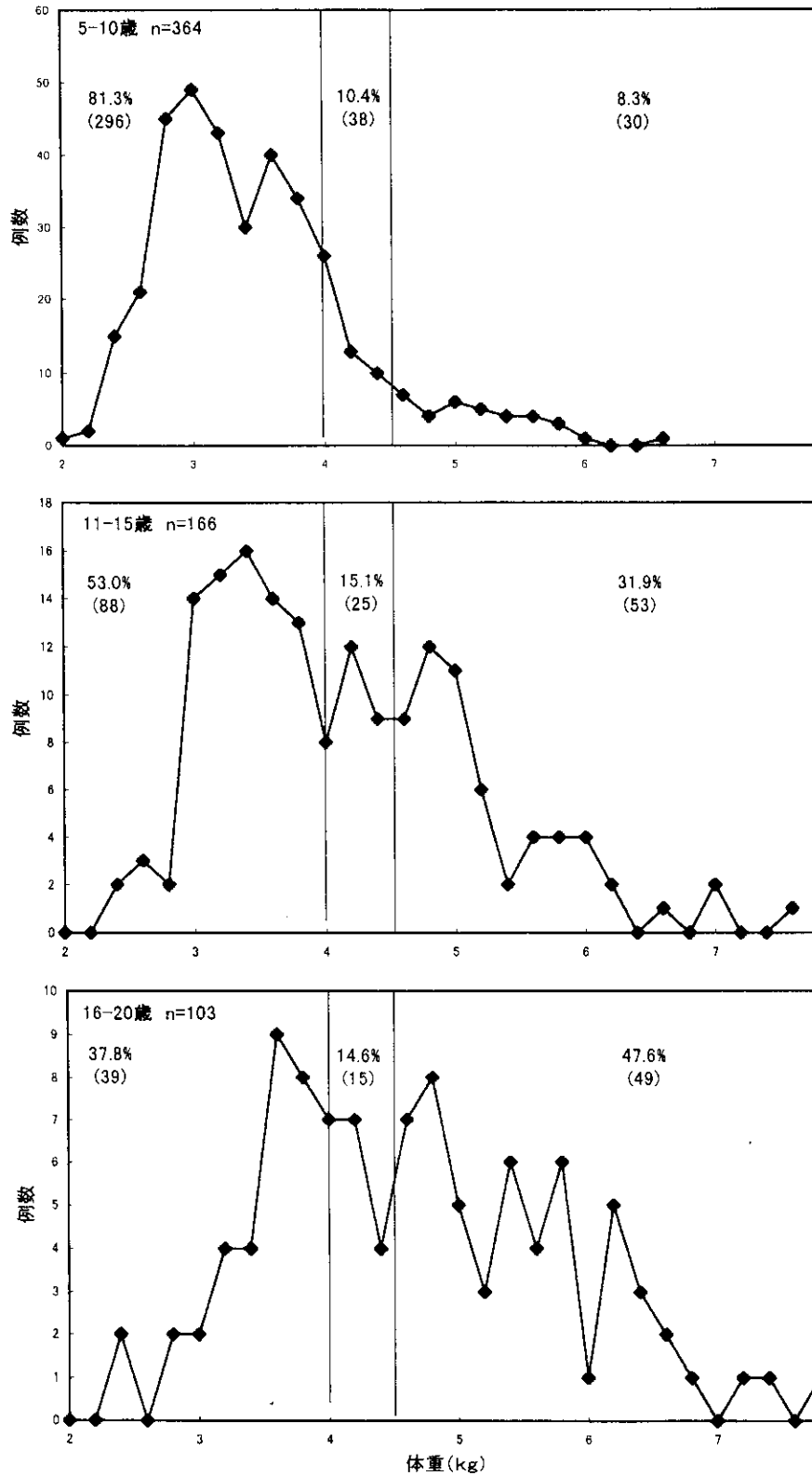


図 2. 大規模繁殖コロニーで長期間飼育されている雌カニクイザルの体重の年齢別分布。5-10歳年齢群（上段）、11-15歳年齢群（中段）そして16-20歳年齢群（下段）。図中の表示は図1と同じ。

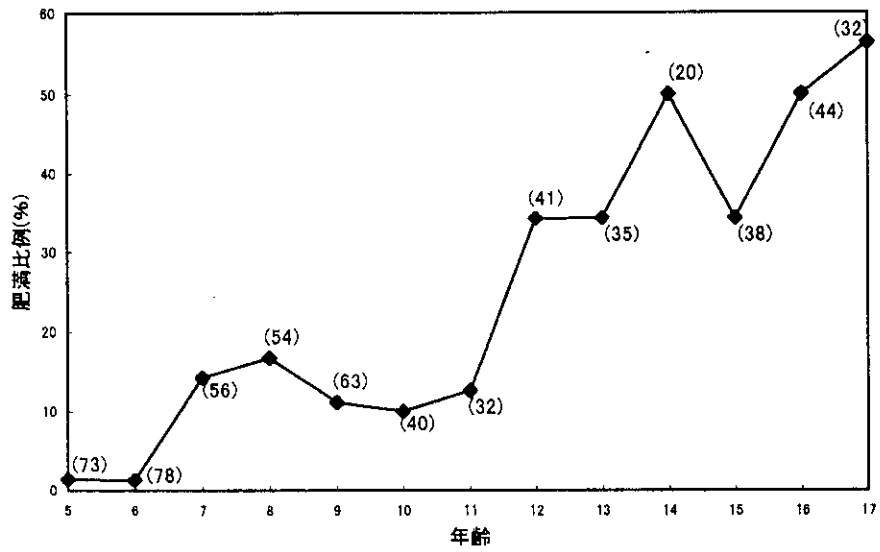


図 3. 大規模繁殖コロニーで長期間飼育されている雌カニクイザルの年齢別の肥満個体（体重 4.5 kg 以上）の発生率。横軸に年齢を、縦軸に肥満個体の発生率を示す。カッコ内の数字は各年齢群での調査対象頭数を示す。

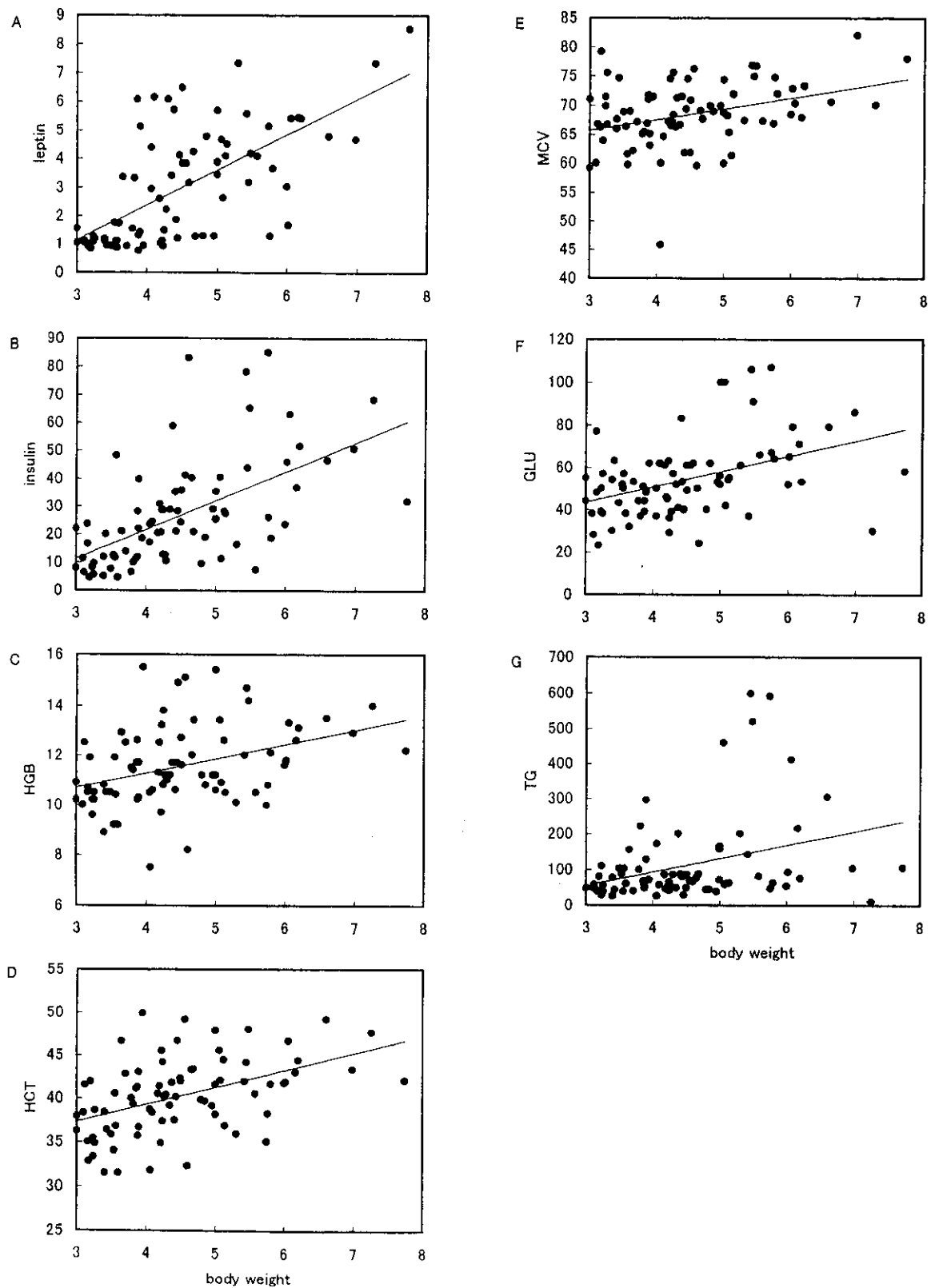


図 4. 霊長類センターのエージングファームの成熟から老齢に到る雌カニクイザル（7 8 頭）の血液関係の測定値と体重との関係。測定項目の略称は、表 1 に同じ。図に示した測定項目は総て 5%以下の危険率で有意に体重と相関した（表 2 参照）。体重との回帰直線を図中に示す。

ニホンザルにおける動脈硬化症モデルの作成とその有用性に関する研究

鳥居 隆三 (滋賀医科大学医学部附属動物実験施設)

卵巣摘出したメス・ニホンザルに2%コレステロール食とともにエストロゲンを投与した結果、血中 T.chol の増加を抑制する傾向や apolipo-A₁、HDL-chol の減少および apolipo-B の増加を抑制する傾向がみられた。また血管内視鏡観察においても、36カ月を経過した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った。以上の結果から、エストロゲンは抗動脈硬化作用を有することを確認できた。また、2%コレステロール食投与により動脈硬化症モデルを作成し血中 T.chol、TG、apolipo-B の増加と HDL-chol、apolipo-A₁ の減少を確認した後、血中脂質改善薬のエイコサペン トエン酸を投与した結果、血中の脂質は著明な改善が見られた。しかし、血管内腔の動脈硬化病変の進展を抑制する効果は明らかに出来なかった。一方、血中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素は、2%コレステロール食に加えてエストロゲンを同時に投与し、病変の進展に抑制が見られた個体において値の増加が見られたことから、動脈硬化病変の進展抑制に何らかの関連があることが示唆された。

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、リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素

A. 研究目的

本年度は昨年度に続き、1) 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、2) 脂質低下作用と動脈硬化病変の進展抑制作用を有するとされ、ヒトで実際使用されているエイコサペン トエン酸の効果を確かめることを目的とした。また、3) リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)が動脈硬化症の進展あるいは抑制の指標となり得るのか否か検討を加えた。

B. 研究方法

実験1):卵巣摘出した成熟メス・ニホンザル12頭を用いて、コレステロール食のみ、コレステロールとエストロゲン、エストロゲンのみについて、それぞれ4頭に投与し、血中の各種脂質の分析を行うと共に、血管内視鏡による血管内腔の観察を行った。

実験2):成熟オス・ニホンザル4頭にコレステロール食を投与後、エイコサペン トエン酸(商品名:エパデール、持田製薬(株):EPAと略)の投与を行い、同時に血管内視鏡による血管内腔の観察を行った。なお、EPAは、1%濃度の溶液を飼料に噴霧コーティングした後、厚手のビニール袋に入れ、酸化防止剤を入れた後真空包装し、冷暗所内に保管、開封後は約2~3日間で使い切ることにした。

実験3):実験1)で作製した、コレス

テロール食、エストロゲン、コレステロールとエストロゲン、のそれぞれの個体の血中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(PGDSと略)の測定を行った。

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)、PS)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。また、投与した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、連日経口的に摂取させた。なお、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A₁、A₂およびB(apolipo-A₁, A₂ & B)について分析を行った。血管内腔の観察は、独自に開発した血管内視鏡を用いて行った。

C. 研究結果

実験1): 卵巣摘出したメス・ニホンザルにおけるエストロゲンの抗動脈硬化作用(図-1, 2 & 3))

A) 2%コレステロール食(図-1)

卵巣摘出個体に、2%コレステロール食を13~31カ月にわたり給餌した結果、血中のT.cholは2ヶ月後頃から著明に増加し、またTG、apolipo-Bの増加とHDL-chol、apolipo-A₁の減少がみられた。血管内腔の観察では、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年を経過する頃からは腎動脈、上腸管膜動脈、腹腔動脈の分岐部にも著明な動脈硬化性病変のアテローム形成が見られた。これら、血中脂質の変化と血管内壁の変化は、31

カ月後も同様な変化が見られた。

B) 通常食+エストロゲン(図-2)

卵巣摘出した個体に、エストロゲンのみのを13~26カ月間にわたり投与を行った結果、血中脂質においては、いずれも大きな変動は見られず、また血管内腔においても、エストロゲン投与26カ月後においても、アテロームの形成は全く見られなかった。

C) 2%コレステロール食+エストロゲン(図-3)

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、16~36カ月において、T.cholは血中のエストロゲン濃度の変化に反比例的な増加・減少の変動が見られた。またapolipo-A₁、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加に対する抑制も見られる傾向にあった。

一方、血管内腔の変化は投与36カ月後においても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は見られず、その発現はわずかなものに止まっていた。

実験2): オス・ニホンザルの動脈硬化症個体へのエイコサペントエン酸(EPA)投与(図-4 & 5)

A) 2%コレステロール食投与後、EPA食に切り換え(図-4)

2%コレステロール食を約6ヶ月間投与し、血中のT.cholとapolipo-Bの増加およびapolipo-A₁の減少と、血管内腔のアテローム形成を確認した後、コレステロール食からEPA食に切り換え、その後約20ヶ月間にわたり投与した。その結果、血中のT.cholとapolipo-Bは速やかに減少し、apolipo-Aの増加がみられた。この時の血管内腔は、コレステロール食により生じたアテロームの形成は、EPAに

切り換えた後17カ月目において、病変の大きな進展は見られないが、著名な改善も見られなかった

B) 2% コレステロール食とEPAの同時投与 (図-5)

2% コレステロール食を約7ヶ月間投与し、血中のT.cholとapolipo-Bの増加およびapolipo-A₁の減少と、血管内腔のアテローム形成を確認した後、EPAと2% コレステロールを同時に投与した結果、A)同様に血中のT.cholとapolipo-Bは速やかに減少し、apolipo-Aは増加した。しかしコレステロール食により生じた血管内腔のアテロームの形成は、EPAを投与しても改善は見られず、13カ月後においてはむしろ進展している様相が見られた。

実験3): 卵巣摘出メス・ニホンザルのコレステロール食、コレステロールとエストロゲン、エストロゲン投与個体における個体の血中T.cholとリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(PGDS) (図-6 & 7)

卵巣摘出メス・ニホンザルに、エストロゲン、コレステロール食、コレステロールとエストロゲンをそれぞれ投与した個体の血中T.cholとPGDSの関連について検討した。その結果、無処置およびエストロゲン投与個体においては、T.cholと同じくPGDS値にはほとんど変動が見られなかった。一方、2% コレステロール食投与個体では、血中T.cholが急激に増加し、血管内腔に著明なアテローム形成が見られたにも拘わらず、PGDS値にはほとんど変化が見られなかった。しかし、コレステロール食にエストロゲンを投与した個体では、PGDS値は明らかに増加する傾向が見られた。

D. 考察

昨年度に続き、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可否かをより明確にするため、個体数を1群4頭とし、観察期間もさらに延長して最長36カ月におよぶ血中の脂質の分析と、継続的な血管内腔の観察を行った。その結果、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の増加抑制の傾向やapolipo-A₁、HDL-cholの減少およびapolipo-Bの増加に対する抑制の傾向がみられた。しかし、血中脂質の著明な改善効果としては見られなかった。一方、血管内腔は36カ月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、エストロゲンが明らかに動脈硬化病変の抑制作用があることを確認した。

次に、ヒトで脂質改善ならびに動脈硬化症の病変進展抑制効果を持つとされ、実際に使用されているエイコサペントエン酸(EPA)を、コレステロール食投与により血中脂質の血中のT.cholとapolipo-Bの増加およびapolipo-A₁の減少が見られ、血管内アテロームの形成を確認した個体に投与した。その結果、血中のT.cholとapolipo-Bは速やかに減少し、apolipo-Aも増加が見られ、脂質に対する明らかな改善効果が見られた。一方、血管内腔に生じたアテロームは脂質のような著明な改善は見られず、むしろ進展する傾向が見られた。このように、血中の脂質を改善し動脈硬化病変の進展を抑制される薬物は、今回のようなアテローム形成がかなり進行した段階では、今回の腹部および胸部大動脈内腔の観察では明らかに出来ず、むしろ進展しているようにすら見られた。すでにコレステロール食投与

によりアテロームの形成を確認した個体について、通常食にもどすことによって血中脂質は明らかに改善されるが、アテロームの形成は改善よりむしろ進展していることを明らかにしている。今回の、脂質改善薬もこれと同様な結果が得られ、一旦形成されたアテロームを改善させるには至らないことが分かった。今後さらに個体数を増やし、また動脈硬化病変の初期の軽度～中程度における硬化や個体の年齢、性などについても検討しなければならないと考える。

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(PGDS)は早期動脈硬化巣である冠動脈内膜増殖層の平滑筋細胞において活発に生産され、またヒトの冠動脈形成術後のPGDS高値群は再狭窄率が低いとの報告があり、その測定方法も開発された。今回、すでに採取し保存していた、無処置およびエストロゲン投与個体、およびコレステロール食、エストロゲンおよびコレステロール食とエストロゲンを投与された個体について、血中のPGDSの測定を行った。その結果、無処置とエストロゲン投与個体では、コレステロール値とともにほとんど変動が見られなかった。一方、血中のT.cholの急激な増加と血管内腔のアテローム形成を認めたコレステロール食投与個体においても、血中のPGDS値はほとんど変化が見られなかった。しかし、コレステロール食とエストロゲンを投与し血中T.cholの増加とアテローム形成が抑制されていた個体では、PGDS値は明らかな増加を示した。これは、ヒトの冠動脈形成術後のPGDSが高値を示す群では再狭窄率が低いことが知られていることから、PGDSはエストロゲンによるアテロームの形成の抑制

と何らかの関連があることが示唆される。今後、動脈硬化病変の早期の段階の指標になりうるか否かも含め、例数を増やしさらに検討を加えたいと考える。

E. 結論

卵巣摘出したメス・ニホンザルを用いて、エストロゲンの抗動脈硬化作用の有無について検討を加えた。その結果、3年にわたる観察から、エストロゲンは、血中脂質を著明に改善することは出来ないが、血管内腔のアテロームの形成の進展を抑制できることを明らかにし、エストロゲンが抗動脈硬化作用を有することが確認できた。

動脈硬化症における脂質改善薬と動脈硬化症病変の進展抑制効果を有するとされるエイコサペントエン酸は、血中の脂質に対しては著明な改善効果を有するが、血管内腔に形成された動脈硬化病変であるアテローム形成の抑制を確認する成績は得られなかった。

血中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素が動脈硬化症の進展あるいは抑制の指標となり得るのか否か検討を加えた結果、エストロゲンによってT.cholの増加と血管内腔のアテローム形成が抑制される個体では、増加がみられことから、動脈硬化病変の進展抑制に何らかの関連があることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) Eguchi, Y., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Kijima, Y., Matsuuras, Y., Urade, Y., Hayashi, O., Expression of lipocain-type prostaglandin D synthase(β -trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 94, 14689-14694, 1997.

2) Oda,H., Eguchi,N., Urade,Y., Hayashi,O.,
Quantitative sandwich immunosorbent assay
of human secretory prostaglandin D synthase
(β -trace), Proc.Japan Acad., 72, 108-111,
1996.

G. 発表論文

1. 論文発表

1) 池田識道、鳥居隆三、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－血管内視鏡による検討、第1報－、脈管学、40(5), 241-246, 2000.

2. 学会発表

1) 鳥居隆三、池田識道、ニホンザルの動脈硬化症モデルによるエストロゲンの抗動脈硬化作用に関する検討、第47回日本実験動物学会総会、徳島, 2000.

2) Ikeda, N. & Torii, R. Evaluation of the effect of estrogens on ovariectomised Japanese monkeys by angioscopy, 3rd International Congress on Coronary Artery Disease, Lyon, France, 2000.