

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

**高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ脳梗塞・
心筋梗塞モデルの開発**

平成23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 谷本 昭英

平成26(2014)年4月

目 次

I 総合研究報告	
高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発 谷本 昭英	1-16
II 研究成果の刊行に関する一覧表	17
III 研究成果の刊行物・別刷	18-

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）**I 総合研究報告書****高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発**

代表研究者：谷本 昭英

研究総括

循環器疾患の克服のため、動脈硬化の病態を解明し、治療法・予防法を開発するための動物モデル開発は不可欠である。従来のモデル動物はヒトとの類似点が乏しく、とくにマウスは低LDL コレステロール動物であり本来は動脈硬化を来しにくい。よりヒトに類似した動物モデルが求められており、近年はブタがヒトとの生理学・解剖学的な類似性から注目されている。我々は世界最小・超小型マイクロミニピッグ(MMPig: Microminipig)に高脂肪・コレステロール食を給餌し、持続的高コレステロール血症と動脈硬化症を誘導した。MMPig のサイズはビーグル犬程度であり、一般のミニブタに比べ実験コストが安価で、取扱が容易である。MMPig は高LDL コレステロール動物で、食性や睡眠行動などヒトとの類似点も多く、食事制御のみでヒトに類似した動脈硬化病変を誘発できる。一方、睡眠障害はヒトの動脈硬化の危険因子として注目されており、MMPig 動脈硬化モデルに睡眠障害を負荷することにより、短期間で動脈硬化病変を進行させ、非侵襲性脳・心筋梗塞モデルの確立を目指した。

平成 23 年度には、高脂肪食 8 週間の食餌性投与を行った。従来、高脂肪食投与においてはコール酸を添加するが、今回はコール酸添加の必要性の検討とともに、高コレステロール血症と全身の粥状動脈硬化の誘導に必要な高脂肪食の組成条件を決定した。コール酸無添加の飼料でも投与 2 週間以後には安定した高脂血症が見られ、生化学的検討では、コレステロール代謝に関わる分子の肝での発現パターンはヒトときわめて類似していた。また、8 週目の解剖では大動脈や全身動脈にヒトと同様の粥状動脈硬化を形成することを確認した。

平成 24 年度には、比較的低濃度の高コレステロール食負荷で誘導される高脂血症に対する HMG-CoA reductase (スタチン) の阻害剤の効果を検討した。8 週間の実験において、スタチンは有意に高脂血症の改善効果を示した。マウスよりヒトに近い解剖・生理を有する MMPig において、臨床使用薬剤の効果を示した意義は小さくはない。1 年以上の長期飼育での観察においては、エコーによる頸動脈などの動脈硬化病変の経時的観察に成功した。比較的小型動物であるマウスやウサギでは観察困難な手技であり、MMPig において初めて可能となった。一般的にブタの寿命は 10 年以上であり、今後さらに長期間の飼育とエコーによる病変観察が可能になると考えられる。

平成 25 年度には、引き続き、長期間にわたり高脂肪・コレステロール食を給餌し、心筋梗塞や脳梗塞の自然発症の有無を検討する研究が行われた。高脂血症と粥状動脈硬化の発症は見られたが、経過中に梗塞の自然発症は見られなかった。大動物を含めて実験動物において動脈硬化の所見を経時的に観察した報告はほとんどなく、今後の活用が期待された。第 2 には平成 24 年度までに確立された 8 週間投与モデルを用いて、スタチン投与による高脂血症および粥状動脈硬化についての詳細な解析が行われた。スタチンは高脂血症を改善し、大動脈の粥状動脈硬化病変の抑制にも効果が見られた。現在は大動脈の組織学的解析が進行中である。投与されたスタチンはヒトの臨床投与量であり、MMPig 動脈硬化モデルがヒトの臨床薬にたいしても十分な反応を示し、今後の薬効試験に有用であることが示唆された。第 3 には、睡眠障害モデルの作出と、睡眠ストレスの負荷による心筋梗塞や脳梗塞の自然発症の有無を試みた。光を操作することによって睡眠障害は生じたが、動脈硬化進展への影響は強くなかった。しかし、ヒトと睡眠パターンが酷似している MMPig において、睡眠障害モデルの作成に成功したことは、今後の脳の高次機能などの研究に活用できる。第 4 には血管リングを用いた薬理学的研究を行った。薬理学的な血管の脳底動脈の反応性から、MMPig が霊長類およびイヌ等に代わる実験動物になる可能性を示した。第 5 には、本来の研究計画には含まれていないが、フルゲノムシーケンスの解析を行い、約 90%のゲノムシーケンスに成功し、現在解析中である。

以上、平成 23 年度から平成 25 年度の研究において、MMPig が動脈硬化モデルとして非常に優れていることを証明する基盤的な研究成果が得られた。

A. 研究目的

現在、日本人の死因は循環器系疾患（脳・心筋梗塞）が悪性腫瘍に次いで第2位であり、これらの循環器系疾患の克服のため、の主因である動脈硬化の病態を解明し、治療法・予防法を開発するための有用な動物モデルの開発は不可欠で社会的急務である。従来の動脈硬化モデル動物（ウサギ、マウス）は生理学的にヒトとの類似点が乏しく、血清脂質プロファイルも低 LDL コレステロールであり、本来、動脈硬化を来しにくい動物である。これらの背景より、トに類似した動物モデルが求められており、近年ブタが実験動物として注目されている。我々は最近作出されたばかりの世界最小・超小型マイクロミニピッグ(MMP: Microminipig)に3ヶ月間高脂肪・コレステロール食を給餌することで、持続的高コレステロール血症を誘発し、世界初・鹿児島大学発のMMP動脈硬化症モデル作出に近年成功した。MMPのサイズはビーグル犬と同等以下であるため、般のミニブタに比べ実験のランニング・コストが安価で、温厚な性格より取扱が容易であることが本モデルの優れた特色である。MMPはヒト同様に高LDLコレステロール動物で、食餌性や睡眠行動などヒトとの類似点が多く、食事制御のみで、冠状動脈や大脳動脈輪など全身の動脈にヒトに類似した動脈硬化病変を誘発できる。一方、睡眠障害はヒトの動脈硬化の危険因子として近年注目されている。よってこのMMP動脈硬化モデルにさらに睡眠障害を負荷することにより、短期間で動脈硬化病変を進行させ、動物モデルでは未だ報告のない非侵襲性脳・心筋梗塞モデルの確立を目指すところが独創的な点である。このモデルを用いることにより、循環器系疾患に対する新規の薬剤や治療法の開発への発展が大いに期待できる。では未だ報告のない非侵襲性脳・心筋梗塞モデルの確立を目指すところが独創的な点である。

平成23年度はMMP動脈硬化症モデルと遺伝子

改変マウスやWHHLウサギ動脈硬化モデルとの比較を目的とした基盤研究を行い、血管病理および脂質代謝の面でのヒト動脈硬化症との類似点を詳細に検証した。

平成24年度はスタチン投与による高脂血症と動脈硬化の抑制の可能性を検討した。最終年度は食事と睡眠障害の併用による非侵襲性MMP脳・心筋梗塞モデルの開発を試行した。MMPは前述の通りに超小型であり、3ヶ月間という短期間の実験期間で動脈硬化が発症するため投与試薬量も少なく済み、飼育コストも安価で経済効果は非常に大きい。また、げっ歯類の動脈硬化モデルではコレステロールの吸収を補助するためにコール酸の添加が必要で、ブタでもコール酸を添加している報告がある。しかしながら、豚ではコール酸を添加しなくても誘発できる報告が複数みられ、MMPでも動脈硬化誘発にコール酸が不要である可能性がある。コール酸には肝毒性が知られており、動脈硬化を誘発する飼料中のコレステロール、脂肪、コール酸の最少必要量を明らかにし、最も効率的で他臓器に影響のない条件を決定する必要があり、初年度にこれらの基盤研究を試行した。

B. 研究方法 特殊飼料 { High-Fat-Cholesterol diet (HFCD) + Sodium cholate } の改良: 飼料中のコレステロール、脂肪、コール酸の最少必要量を明らかにする。MMP動脈硬化モデルを用いて、特殊飼料HFCDのコレステロール、脂肪、コール酸の添加量無しあるいは低用量～高用量に設定し、経時的に血液検査、画像診断などの臨床検査を行い、動脈硬化病変を病理学的に検索する。実験期間は3ヶ月齢のMMPの8週間投与とした。8週投与モデルにおいて、スタチンの投与（3 mg/kg/day）を混餌で与えた。長期投与実験では、比較的低濃度のコレステロール負荷食を用いた。以下に実験条件と群分けを示す。

群	8週モデル	脂肪 (w/w%)	コレステロール (w/w%)	コール酸 ナトリウム (w/w%)	給餌重量 (%/body)	動物数
1	通常飼料	0	0	0	3	5
2	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.2	0	3	5
3	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.5	0	3	5
4	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	1.5	0	3	5
5	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	1.5	0.7	3	5

群	スタチン 実験	脂肪 (w/w%)	コレステロール (w/w%)	給餌重量 (%/body)	スタチン (mg/kg/day)	動物数
1	通常飼料	0	0	3	-	6
2	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	3	-	6
3	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	3	3	6

群	長期実験 モデル	脂肪 (w/w%)	コレステロール (w/w%)	コール酸ナトリウム (w/w%)	給餌重量 (%/body)	動物数
1	通常飼料	0	0	0	3	7
2	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.03	0	3	5
3	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	0	3	5

投与量は、最新の体重を基に個別に算出飼料の摂餌時間

群	睡眠障害 モデル	照明条件		動物数
		点灯時間	明るさ	
1	特殊配合飼料	12 時間	通常の飼育室の照明のみ	5
2	特殊配合飼料	20 時間	300 ルクス	5
3	特殊配合飼料	20 時間	1200 ルクス	5

光による睡眠障害モデルについての、実験条件と群分けを左に示した。

臨床検査

血液検査血液検査については2週毎に行った。一般血液学的検査は赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘマトクリット(Ht)、ヘモグロビン濃度(Hb)、血小板(Plat)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球 Hb 量(MCH)、平均赤血球 Hb 濃度(MCHC)、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)一般血液生化学的検査は以下の22項目を測定した。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、乳酸脱水素酵素(LDH)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、アミラーゼ(Amylase)、総ビリルビン(T-Bil)、直接ビリルビン(D-Bil)、総タンパク(TP)、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T-Cho)、遊離型コレステロール(Free-Cho)、中性脂肪(TG)、ブドウ糖(Glu)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)、リン酸(IP)、カルシウム(Ca)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロライド(Cl)コレステロール分画については、8項目高比重リポタンパクコレステロール(HDL-Cho)、低比重リポタンパクコレステロール(LDL-Cho)、超低比重リポタンパクコレステロール(VLDL-Cho)、カイロミクロンコレステロール(CM-Cho)、高比重リポタンパクTG(HDL-TG)、低比重リポタンパクTG(LDL-TG)、超低比重リポタンパクTG(VLDL-TG)、カイロミクロンTG(CM-TG)を

測定した。

CT 検査

無麻酔下で定期的に全身のCTスキャンを行い、循環器系の異常および体脂肪の増加などを精査する。また、肝臓については脂肪肝の指標であるCT値を求めた。

心および頸動脈エコー

無麻酔下で定期的に循環器系の異常を精査する(機能評価)。ヒトでは頸動脈プラークは、冠動脈の動脈硬化や脳梗塞発症との関連が指摘されており、良い指標になる。

病理学的検査

病理解剖：人体病理解剖の手技に準じて、心臓、脳および全身の動脈を観察および採取。病理組織学的検査：心臓、脳および全身の動脈は人体病理組織学的検査に準じて精査する。大動脈弓から胸部・腹部大動脈については、Oil red O染色による粥状硬化面積の定量化を行った。各組織は定法に従いホルマリン固定後パラフィン包埋、hematoxylin and eosin(HE)染色後、病理組織学的検査を行う。組織学的検査：人体組織学的検査に準じて次の特殊染色を施行、精査した。【動脈硬化病変】EVG、Azan、Sudan、【心筋梗塞】Azan【脂肪肝】Sudan、免疫組織学的検査：動脈硬化病変に対して【マクロファージ】Iba-1、HLA-DR、lysozyme、vimentin【平滑筋細

胞】 -smooth muscle actin を施行し，マクロファージや平滑筋細胞の浸潤程度や部位などを検索した．

遺伝子発現の解析

TaqmanR Universal Master Mix (Applied Biosystems、Life Technologies) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムにより実施した．手順はキットに推奨されるプロトコールにて以下のように実施した．なお今回、発現解析を行った遺伝子は、LDLR、HMGCR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC、APOBEC1 の 8 項目であり、それぞれブタの μ RNA に特異的なプライマー・プローブを用いた。LDLR、HMGCR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC では肝臓から抽出した RNA サンプルでそれぞれの発現を、NPC1L1 と APOBEC1 では小腸から抽出した RNA サンプルでそれぞれの発現を解析した．

光環境負荷

4 ヶ月令の MMPig を用いた．全ての動物に高脂肪食(通常食に 1.5% コレステロールを添加)を体重 3% に相当する量を 1 日量として、1 日 1 回(10 時または 16 時)または、1 日 2 回給餌した．光環境として以下の 3 つの条件で飼育した(それぞれ 5 頭)．

1 群：照明時間(12 時間：0700-1900)

光量(50-100Lx) 光源(室内蛍光灯)

2 群：照明時間(20 時間：0700-2400、2400-0300)

光量(300Lx) 光源(LED ランプ)

3 群：照明時間(20 時間：0700-2400、2400-0300)

光量(1200Lx) 光源(LED ランプ) 2) 睡眠・覚醒リズムの測定

1) 活動量

活動量は、Ambulatory Monitoring 社の Octagonal Basic Motionlogger を用いた．

2) 体温

体温は、マイクロチップ埋め込み型機器を用いて測定した．測定にあたって埋め込み部の検討を行い、深部体温と比較的温度変化が似ていた耳根部に埋め込みを行った．特記すべきこととして、光に反応して体温の上昇、下降が明確に認められ、本体温測定は睡眠-覚醒リズム測定に極めて有用であることが確認された．

3) 動脈硬化指標の測定

生化学検査

2 週に 1 回、頸静脈から前大静脈洞部より採血した．脂質代謝関連物質を中心に、キットで測定した．

病理学検査

実験終了時に麻酔下放血後、病理解剖を行った．臓器重量測定後、血管・循環器系臓器の病理標本を記法に従い作成した．

薬理学的評価

HFCD 群より摘出した血管(脳底動脈など)よりリング標本を作製し、内因性作動物質に対する反応性を対照群と比較した．また、内皮細胞を培養し、eNOS 発生、細胞増殖能についても比較した．

1) in vivo 実験

メドトミジン水溶液(ドミツール、Orion Corporation, 1 mg/ml, 0.02-0.08 ml/kg) および塩酸ケタミン水溶液(50 mg/ml, 0.08-0.2 ml/kg) の麻酔下でマイクロミニピッグの頸静脈よりカニューレションを行い前大静脈洞に留置する．アンジオテンシン 投与群には、0.2 mg/kg/day で 2 週間持続的に投与した．対照群にはアンジオテンシンの代わりに生理食塩液を同様に投与した．

全身性の血圧は前肢より血圧計を介して測定した．

2) in vitro 実験

アンジオテンシンの静脈内持続投与の最終日に安楽死を行い、脳底動脈を摘出し、直ちに氷冷した Krebs - Ringer 液(119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.6 mM

CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄ および 10 mM glucose) 中に保存して、実験室に搬入した。余分な結合組織や脂肪を取り除いた後、長さ 2 mm の血管リング標本を複数個作製した。

作製した血管リング標本に糸のついたステンレス製フックを 2 本装着し、一方をオルガンバス底部に固定し、他方を等尺性張力トランスデューサ (TB-611T, 日本光電) に接続し、リング標本をオルガンバス内に懸垂した。オルガンバス内は 37 °C (pH 7.4) に保たれた Krebs - Ringer 液で満たされ、95% O₂ および 5% CO₂ の混合ガスを通気した。等尺性張力トランスデューサで感知された血管張力の変化は、増幅アンプ (AP-621G, 日本光電) で増幅後、PowerLab システム (ADInstrument) にてチャートデータとして変換され、パーソナルコンピュータに保存された。

血管リング標本はオルガンバス内に装着して約 30 分間静置させた後、静止張力を 0.5 g に調節した。この静止張力は血管リング標本が 60 mM KCl により最大収縮反応を起こすことのできる張力である。

全ての実験において、各処理を行う前に安定した再現性のある収縮が得られるまで血管リング標本に対して 3 回の KCl の適用を行った。これらの KCl 適用のたびに Krebs - Ringer 液にて洗浄し、静止張力を 0.5 g に再調節した。内因性血管作動物質の血管反応が収縮する場合、3 回目の KCl 反応で得られた最大収縮を 100% とした。また、血管反応が弛緩する場合は、実験の最後にニトロプルシド 10⁻⁴ M を適用し得られた最大弛緩反応を 100% とした。

3) 培養細胞実験

摘出マイクロミニピッグ脳底動脈にカニューレションを行い、0.05% トリプシン溶液をゆっくりと灌流することにより内皮細胞をチューブに集め、遠心後に上清を除去し、新しい培養液を加える洗浄を行った。0.1% ゼラチンコーティングした 90 mm ディッシュに

播き、37 °C, 5% CO₂-95% air 下で初代培養を行った。培地として、45% DMEM と 45% Nutrient mixture 12 HAM それに 10% FBS (fetal bovine serum) を添加した混合培地を使用し、コンタミネーションを防ぐために抗菌剤 (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 250 ng/ml amphotericin B) を添加した。この細胞を 3 代目まで継代培養し、4 代目以降 6 代目までの細胞を実験に用いた。なお、培養中は細胞を 2 あるいは 3 日毎に Hank ' s Balanced salt solution (Hanks 液) で洗浄し、培地の交換を行った。

統計学的処理

得られた実験結果は、平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には 2 群間での比較の場合は student paired *t*-test を、多群間での比較の場合は一元配置分散分析を行った後に Bonferroni ' s multiple *t*-test を用いて検定を行った。危険率 5% 未満で有意差ありとした。Oil red O 染色面積比の病理組織学的定量化については SPSS を用いたノンパラメトリック (Mann-Whitney U) 検定を行った。

C 結果

8 週投与モデル

8 週投与モデルにおいて、高脂肪・高コレステロール食負荷で誘導される高脂血症と動脈硬化について、マウス、ウサギ、ヒトと比較をする基盤研究を行った。また、頸動脈結紮モデルによる内膜肥厚モデルを作製した。

1) 体重はコレステロール群で増加傾向が見られたが、対照群と有意差はない。

2) 8 週間の低濃度コレステロール (0.2%) 食負荷で、持続的な高脂血症を再現した。

3) コレステロールの腸管吸収を促進するコール酸の添加は必要ない。

4) 上記条件で、血中の低比重コレステロールは約 150mg/dL に達し、ヒトの脂質異常症とほぼ同様のレベルであった。

5) コール酸添加群では、脂肪肝と肝機能障害が見られた。

6) 全身動脈にヒトと同様の粥状動脈硬化病変が見られた。大動脈においては、病変の程度がコレステロール濃度依存性に増加した。

7) 肝や小腸のコレステロール代謝関連遺伝子 (LDL 受容体、HMG-CoA 還元酵素、コレステロール運搬蛋白) の発現および負荷食に対する反応は、ヒトとほぼ同様であった。

8) 肝での apoB editing 酵素の発現は FMP では見られない。

9) 血清中の cholesteryl ester transfer protein の活性は、高脂肪・高コレステロール食負荷で上昇した。

10) Hepatic lipase 活性は 90%以上が肝内に見られ、循環血液中にはわずかであった。

11) 8 週間の実験で、心筋梗塞、脳梗塞の発症はなかった。

12) 大網重量の増加が見られ、内臓脂肪型の肥満を呈したと考えられた。

13) 普通食投与の MMP 4 頭において頸動脈結紮を施行したところ、一部の個体では内膜に血栓を伴う線維性肥厚が生じた。

スタチン投与実験

スタチン投与実験については、

1) 実験期間中は全頭健康であり、食欲不振や運動不耐性などの臨床徴候は認められなかった。

2) 体重および体重増加率は Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群ともに高値を示したが、HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

3) 血液学的検査

RBC、WBC、MCV、MCH において、3 群間に有意な変化はみられなかった。Hb、Ht、MCHC、PLT、PT、APTT において、3 群間で有意な変化がみられたが、基準値内の変化あるいは一過性の変化あるいは病理組織学的異常を伴わない変化であり意義はないと考えられた。

4) 血液生化学的検査

血清脂質関連マーカーについて：T-Cho 値は Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。LDL-Cho 値は Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。HDL-Cho 値においては Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。Free-Cho 値において Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。CE 値においては Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。VLDL-Cho 値においては Control 群と比較して、HFCD 群は 6 週目に高値を示したが、HFCD+スタチン群に有意な変化はみられなかった。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では、2、6 週目に低値を示した。CM-Cho においては、Control 群と比較して、HFCD 群は 12 週目に HFCD+スタチン群は 6 週目に低値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では 6 週目に低値、8 週目に有高値を示した。TG は 3 群間に有意な変化はみられなかった。LDL-TG において

は、Control 群と比較して HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 8 週目に有高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では 12 週目に高値を示した。HDL-TG においては、Control 群と比較して HFCD 群は 8、12 週目に低値を示したが、HFCD+スタチン群に有意な変化はみられなかった。HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。VLDL-TG においては Control 群と比較して HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 4 週目に低値を示した。HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。CM-TG においては、Control 群と比較して HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 10 週目に高値を示した。HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

肝臓の機能に関する項目については、AST、GGT、T-Bil、D-Bil 値は 3 群間に持続的な有意な変化はみられなかった。ALT、ALP 値については、Control 群と比較して HFCD 群は試験開始以降、持続的に有意な低値を示したが、基準値内の変化であり、意義はないと考えられる。腎臓の機能に関する項目については、BUN 値が HFCD 群および HFCD+スタチン群に有意な変化がみられたが、基準値内での変化あるいは病理組織学的異常を伴わない変化であり意義はないと考えられた。電解質の項目については、Na、K、Ca、IP、Cl 値に、有意な変化がみられたが、基準値内の変化であり意義はないと考えられた。

その他の酵素については、CK、LDH、Amylase、Glucose 値が、3 群とも同様の推移を示した。Albumin、TP 値について HFCD 群および HFCD+スタチン群に有意な変化がみられたが、基準値内の変化であり意義はないと考えられた。

5) 解剖学的解析

Oil red O 染色による観察では、大動脈弓および胸部、腹部大動脈において HFCD 群では、腹部大動脈を中心にわずかに Oil red O 染色陽性部位がみられた。また、Oil red O 染色陽性部位の面積の定量化を行い、その結果、Control 群と比較して、HFCD 群で高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で低値傾向を示した。

6) 病理学的解析

病理学的所見では、Control 群では動脈において動脈硬化性病変は認められなかった。HFCD 群では 6 頭中 5 頭、HFCD+スタチン群では 6 頭中 1 頭の動脈に動脈硬化性病変が認められた。総腕頭動脈では HFCD 群の 2 個体で内、中膜の肥厚がみられ、そのうち 1 個体では弾性線維破壊、もう 1 個体では内膜における泡沫細胞浸潤がみられた。右頸動脈では HFCD 群の 3 個体で内膜肥厚がみられ、そのうち 2 個体では内膜における泡沫細胞が認められた。

7) 遺伝子発現

遺伝子発現解析では、肝臓の LDLR、HMGCR、NPC1L1、SRB1、LIPC 遺伝子の相対発現比は Control 群と比較して、HFCD 群において減少傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で増加傾向がみられた。肝臓の SREBF1、SREBF2 遺伝子の相対発現比は、3 群間で有意差および傾向は認められなかった。小腸の APOBEC1 遺伝子の相対発現比は、Control 群と比較して HFCD 群において減少傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で増加傾向がみられた。また、小腸の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は、Control 群と比較して HFCD 群において増加傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で減少傾向がみられた。

組織学的所見については、腹部大動脈では HFCD 群の 1 個体で病変が形成され、内、中膜の肥厚と内膜における泡沫細胞浸潤が認められた。左頸動脈では HFCD+スタチン群の 1 個体で病変が形成され、内

膜における泡沫細胞が認められた。その他全身臓器において著変はみられなかった。

長期投与実験

長期投与実験では、

- 1) 一般状態実験期間中は全頭健康であり、食欲不振や運動不耐性などの臨床徴候は認められなかった。
- 2) 体重は Control 群と比較して、HFLCD 群および HFHCD 群において体重の有意な上昇がみられた。
- 3) 血液学的検査では、3 群間で有意な変化がみられたが、基準値内の変化あるいは一過性の変化であり、意義はないと考えられた。
- 4) 血液生化学的検査のうち、血清脂質関連マーカーについては、血清総コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、遊離コレステロール、コレステロール・エステル値が Control 群と比較して HFLCD 群および HFHCD 群において有意な高値および高値傾向が認められた。
その他、肝臓、腎臓の機能に関する項目や電解質などについては、3 群間で有意な変化がみられたが、基準値内の変化あるいは一過性の変化であり意義はないと考えられた。
- 5) 剖検時肉眼的所見としては、HFLCD 群および HFHCD 群の大動脈に軽度の粥状硬化がみられた。
- 6) 大動脈弓および胸部、腹部大動脈に Oil red O 染色を実施した。HFLCD 群および HFHCD 群において腹部大動脈を中心に軽度に Oil red O 染色陽性部位がみられた。現在、Oil red O 染色陽性部位の面積の定量化を行い、解析中である。
- 7) 病理組織学的検索は、現在、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製中である。
- 8) 遺伝子発現解析については、肝臓の LDLR、HMGCR、NPC1L1、SRB1、LIPC、小腸の APOBEC1、NPC1L1 遺伝子の相対発現比を解析中である。

睡眠障害モデル

睡眠障害を導入したところ、

- 1) 動物の活動量については、実験開始時、明期活動量のピークがいずれの群においても 2 回あった。実験開始後 4 ヶ月では、明期活動量のピークは 1 回であった。このピークは給餌時刻に一致しており、活動量が食事によって影響することが示唆された。暗期活動量は、実験開始時はそれぞれの群内の比較で、明期活動量よりも少なかった。3 群間の比較では、3 群 (1200Lx) が最も活動量が少なかった (よく寝ていた)。実験開始後 4-6 ヶ月では、暗期に一致せず、いずれの群も 19 時頃から活動量が低くなる傾向が認められた。1 群では明期の方が、暗期よりも活動量が低い傾向が認められた。2, 3 群では、暗期に活動量が高くなる傾向が認められた、また早朝において、2, 3 群では活動量の増加が抑制されることが観察された。
- 2) 体温は、1 群と比べて、2, 3 群において、暗期の体温下降が鈍く、早朝の照明点灯時での体温上昇反応が遅かった。
- 3) 体重は、剖検時 (実験開始 6 ヶ月) 体重 (kg) は、1 群: 21.10 ± 3.01 、2 群: 22.66 ± 1.69 、3 群: 19.48 ± 1.27 であった。
- 4) 生化学検査では、HDL-コレステロール値 (mg/dl) は、1 群: 107.0 ± 17.8 、2 群: 147.8 ± 22.9 、3 群: 173.2 ± 19.2 であった。
- 5) 病理学的検索にて、動脈硬化病変はすべての動物にみられたが、睡眠障害の影響があるかどうか、病変の定量的解析を実施中である。

薬理的解析

- 1) アンジオテンシン の 2 週間静脈内投与の全身血圧値へ及ぼす影響
アンジオテンシン を 2 週間静脈内投与した時の

マイクロミニピッグの全身血圧を収縮期血圧 (systolic blood pressure) および拡張期血圧 (diastolic blood pressure) については、投与1日目からアンジオテンシン 群の収縮期血圧は有意に上昇した。拡張期血圧は対照群と比較すると高い値を示したが一部を除き有意ではなかった。

2) アンジオテンシン を2週間静脈内投与された摘出脳底動脈の内因性血管作動物質に対する血管反応性

内因作動物質として、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、セロトニン、ブラジキニン、L-ニトロアルギニン、インドメタシンを用い、得られた反応を下記に示した。

ノルアドレナリン：通常ブタ脳底動脈ではノルアドレナリンに対しては、 $\beta_1:\beta_2=7:3$ を介して弛緩するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に弛緩した。アンジオテンシン を持続投与した後の脳底動脈でも、この弛緩反応に有意な影響は認められなかった。

アンジオテンシン：通常ブタ脳底動脈ではアンジオテンシン に対して、AT₁ 受容体を介して収縮、AT₂ 受容体を介して一酸化窒素を遊離するが、AT₁ 受容体を介した収縮反応が優位である。マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にアンジオテンシン に対して収縮した。アンジオテンシン を持続投与された後に摘出された脳底動脈でも、この収縮反応に有意な変化は認められなかった。

セロトニン：通常ブタ脳底動脈ではセロトニンに対して、5-HT₁ 受容体および5-HT₂ 受容体を介して収縮するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にセロトニンに対して収縮した。アンジオテンシン を持続投与された後に摘出された脳底動脈では、セロトニンを適用して得られた収縮反応が有意に増強される結果となった。

L-ニトロアルギニン：通常ブタ脳底動脈では一酸

化窒素合成酵素阻害剤であるL-ニトロアルギニンに対して、自発的に遊離している一酸化窒素の産生が阻害されるため収縮するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に収縮した。アンジオテンシン を持続投与された後のマイクロミニピッグ脳底動脈でも、この収縮反応に有意な影響は認められなかった。

インドメタシン：通常ブタ脳底動脈ではシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤であるインドメタシンに対して、自発的に遊離しているトロンボキサン A₂ の産生が阻害されて弛緩するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に弛緩した。アンジオテンシン を持続投与した後の脳底動脈でも、この弛緩反応に有意な影響は認められなかった。

ブラジキニン：ブタ脳底動脈ではブラジキニンに対して、内皮細胞上のB₂ 受容体を介して弛緩および収縮する2双性反応を示すが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にブラジキニンに対して2双性の血管反応を示した。アンジオテンシン を持続投与した後に摘出された脳底動脈では、弛緩反応は消失し、収縮反応は逆に大きく増強された。ブラジキニンに対する血管反応が、アンジオテンシン

の持続投与により大きく変化したため、さらにマイクロミニピッグの脳底動脈内皮細胞を培養し、産生される弛緩因子である一酸化窒素および収縮因子のプロスタノイドを測定することとした。既にプロスタノイドはプロスタグランジン(PG)H₂ の代謝物であるPGE₂、PGD₂、PGF_{2 α} でありトロンボキサン A₂ ではないことは以前報告している(文献1)。そのため、PGE₂、PGD₂、PGF_{2 α} のいずれが、ブラジキニンにより、産生が増強されるかを先に検討した。

3) ブラジキニン処置による一酸化窒素産生量への影響

一酸化窒素産生量は用量依存性および時間依存性に増大した。また、増大した一酸化窒素産生量は、

B₁拮抗薬である des-Arg⁹, [Leu⁸]-BK では有意な影響を受けなかったが、B₂拮抗薬である HOE140 および一酸化窒素合成阻害剤である L-ニトロアルギニンでは完全に消失した。この結果は、ブラジキニン処置により血管内皮細胞上に存在する B₂受容体を介して一酸化窒素が産生され、血管を弛緩していることを示唆している。

4) ブラジキニン処置によるプロスタグランジン産生量への影響

10⁻⁷ M ブラジキニンの脳底動脈内皮細胞への処置による PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}の産生量への影響を示した。その結果、PGD₂ および PGE₂ の産生量には有意な変化は認められなかったが、PGF_{2α}の産生量は有意に増強された。この結果は、マイクロミニピッグ脳底動脈にブラジキニン処置をすると、内皮細胞上の B₂受容体を介して PGF_{2α}が産生されることにより、収縮反応を引き起こすことを示唆している。

5) アンジオテンシン の 48 時間脳底動脈内皮細胞への処置が、ブラジキニン処置により産生される一酸化窒素および PGF_{2α}産生量へ及ぼす影響

ブラジキニン処置により一酸化窒素および PGF_{2α}が産生されることが内皮細胞を用いて証明されたが、これらの産生量に、アンジオテンシンの 48 時間前処置がどのような影響を示すかを、次の実験で明らかにしようと試みた。

10⁻⁷ M ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量が、10⁻⁷ M アンジオテンシンの前処置 (48 hr) によりどのように影響を受けるかを 6, 12, 24 hr で検討したところ、アンジオテンシンの前処置は、10⁻⁷ M ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量を時間依存性に増大させた。一方、10⁻⁷ M ブラジキニンによる PGF_{2α}の産生量が、10⁻⁷ M アンジオテンシンの前処置 (48 hr) によりどのように影響を受けるかを 6, 12, 24 hr で検討すると、アンジオテンシ

ンの前処置は、10⁻⁷ M ブラジキニンによる PGF_{2α}の産生量を時間依存性に増大させた。この 2 つの結果は、アンジオテンシン 処置により、ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量が減少すると同時に PGF_{2α}の産生量が増大することを示しており、先の *in vivo* の実験でアンジオテンシン を 2 週間静脈内投与した後に摘出した脳底動脈で、ブラジキニンによる弛緩の後、収縮反応が起きるという 2 双性の血管反応の弛緩部分が消失し、収縮部分が増強され 1 相の収縮反応になったことを細胞レベルで証明したことになる。

D. 考察

マイクロミニピッグに高脂肪・高コレステロール食を 1 年間給餌することにより、肥育や高コレステロール血症が認められ、剖検時肉眼観察でも大動脈に軽度の粥状硬化がみられたが、脳梗塞や心筋梗塞の誘発には至らなかった。脳梗塞や心筋梗塞の誘発には、脂肪やコレステロールの投与量や投与期間あるいはその他の負荷の必要性の検討が必要と思われる。今後、病理組織学的検討や脂質代謝関連遺伝子発現の解析を行い、病態解析をすすめる。

スタチン投与においては、体重増加率において HFCD 群および HFCD+スタチン群は有意な高値を示したことにより、高脂肪・高コレステロール食により肥育が促進したと考えられる。スタチンによる肥育の抑制効果はみられなかった。T-Cho 値において、Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は 2 週目以降持続的に有意な高値を示した。HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群では 2, 4 週目に有意な高値が認められた。試験期間中の HFCD+スタチン群の値の上昇は基準値内に留まっており、スタチンの効果で初期のコレステロール値が抑制されたことが考えられる。6 週目以降 HFCD 群と HFCD+スタチン群間の有意差が消失したのは

HFCD 群の個体の生体内において恒常性機構が働き、Control 群の値に近づいたためと考えられる。

HDL-Cho、Free-Cho 値において、Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は 2 週目以降持続的に有意な高値を示した。HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群では 2、8、10、12 週目または 2、4、6 週目に有意な低値が認められた。CE 値では 8 週目にのみ Control 群と比較して HFCD+スタチン群に有意差がみられないものの、3 群でおおむね T-Cho と同様の推移となっている。

LDL-Cho 値において 8 週目以降 Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群で有意差は消失するが、T-Cho と同様の推移となっている。これらについても T-Cho と同様に生体内において恒常性機構が働き、Control 群の値に近づいたためと考えられる。

CM-Cho 値において HFCD 群、HFCD+スタチン群とも値が増減するが、持続性はなく意義はないと考えられる。

VLDL-Cho、TG、CM-TG、HDL-TG、LDL-TG、VLDL-TG 値において、3 群とも同様の推移を示しており、高脂肪・コレステロール食給餌およびスタチン投与の影響を受けていないことが考えられる。

大動脈弓および胸部、腹部大動脈に Oil red O 染色を実施した結果、HFCD 群の特に腹部大動脈にわずかに染色陽性部位がみられた。高脂肪・コレステロール食給餌により動脈硬化は増悪を示し、スタチン投与によりその改善傾向がみられたが、微細な変化であるため、Histometry(内膜病変面積の定量化)によるさらなる検討が必要と考えられる。病理組織学的に内膜、中膜の肥厚、内膜における泡沫細胞浸潤などが認められた。Control 群では動脈硬化性病変はみられず、HFCD 群で 6 頭中 5 頭に病変がみられることから、動脈硬化性病変が飼料中のコレステロール量に依存していることが考えられる。また

HFCD+スタチン群では病変が 6 頭中 1 頭にしかみられないことから、スタチンによって病変の発生や進行が抑えられていることが考えられるが、Histometry(内膜病変面積の定量化)による詳細な検討が必要である。

本研究では HMGCR、LDLR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC、APOBEC1 について Control 群を基準にした各遺伝子の相対発現比を測定した。HMGCR とは HMG CoA 還元酵素と呼ばれ、メバロン酸経路で作用する還元酵素のひとつである。コレステロール生合成の律速酵素であり、望ましい血清中コレステロール量の維持の中心的な役割を有している。インスリン、甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、胆汁酸、コレステロールは全て HMGCR 発現に強い影響を与え、さらに HMGCR 発現には日内変動があり、断食や再給餌によっても劇的な変化を起こす。本研究においても HMGCR の相対発現比は HFCD 群でわずかに減少しており、食餌中コレステロールによると考えられる。スタチンはヒトにおいてこの HMGCR を標的として血清中コレステロール値を減少し、冠動脈系疾患のリスクも減少し、動脈硬化性病変のサイズも減少させる。スタチンは NADPH とは結合せず、HMGCR とのみ結合する。さらにスタチン治療による HMGCR 阻害は LDLR 発現を刺激する。本研究ではスタチン投与による LDLR、HMGCR の増加(回復)傾向がみられたことにより、マイクロミニピッグもスタチンに対してヒトと同様の作用機序をもつと考えられる。

LDLR とは、LDL、VLDL、 β -VLDL、IDL と結合する受容体であり、ほとんど全ての細胞に存在するが、肝臓に最も多く存在するとされる。多数の研究者が異なる動物モデルでの LDLR 遺伝子の発現における食餌脂肪酸の影響を測定している。ヒトにおいて細胞膜に発現する LDLR 遺伝子の変異が、致

死的な遺伝性疾患である家族性高コレステロール血症の約 85%の原因である。また、ブタにおいて細胞内に供給される食餌由来のコレステロール量が過剰であると LDLR の mRNA 発現量が減ることが知られている。本研究でも LDLR 遺伝子の相対発現比は HFCD 群でやや減少し、食餌中コレステロールによると考えられる。

SRB1 とはスカベンジャー受容体のひとつであり、HDL、LDL、VLDL などの天然のリポ蛋白と結合する。リポ蛋白と結合した SRB1 は選択的なりポ蛋白コレステロールの摂取を介し、選択的な摂取には血漿 HDL から組織（特に肝臓とステロイド産生組織）へと HDL 粒子の劣化なしで配送することが含まれる。様々な系統の細胞において SRB1 の発現レベルは HDL への遊離コレステロール流出の割合と相関している。ヒトにおいて SRB1 の抗動脈硬化の役割は証明されているが、マクロファージにおける SRB1 の抗動脈硬化への役割はコレステロール流出を促進する傾向があるだけで明らかでない。ほとんどの肝臓の SRB1 発現は肝細胞で検出され、ハムスターでは食餌中の植物由来不飽和脂肪酸は肝臓の SRB1 発現と HDL コレステロール・エステル吸収を刺激する。高コレステロール血症ラットにおいてストレプトゾトシン誘発性糖尿病は SRB1 タンパクの発現レベルを上昇させ、血清 HDL の減少と正に相関していた。ただし、ラットでは肝臓の SRB1 レベルまたは HDL コレステリル・エステル転送が食餌中コレステロール量の変化で調整されているが、マウスとハムスターでは認められない。本研究では HFCD 群で有意な変化は認められず、マイクロミニピッグでは高脂肪・コレステロール食給餌により SRB1 の発現が変動しないと考えられる。しかしながら、HFCD+スタチン群では高値傾向を示していることから、スタチン投与により SRB1 の相対発現比が上昇する可能性はあると考えられる。

NPC1L1 とは NPC1 ファミリーの脂質転送物質であり NPC1 と 51%のアミノ酸を共有する。最初に報告されたのはラットとヒトの腸細胞の頂端膜であり、NPC1L1 の細胞内の局在は肝臓癌細胞系統で観察された。NPC1L1 は小腸におけるコレステロール吸収に関わる蛋白であり、ラットでは小腸にのみ発現するが、ヒトでは肝臓にも発現しており、胆汁へのコレステロール排出の調節や肝臓へのコレステロール蓄積の促進などを行う。食餌中のコレステロールは NPC1L1 を刷子縁からエンドソームへと誘発する。エゼチミブはこの NPC1L1 を分子標的とする薬である。ただしこの薬は NPC1L1 遺伝子型の違いによりその有効性が異なる。また、前述のスタチンによる治療は近年のデータが小腸におけるコレステロール吸収の上昇と関連していると示唆しており、そのひとつである Atorvastatin は脂質異常症のヒトにおいて NPC1L1 の腸での発現を増加させることが明らかとなった。本研究において、小腸の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は HFCD 群で高値傾向を示したことにより、コレステロール吸収に関連していると考えられる。スタチンによって、この NPC1L1 遺伝子は HFCD 群と比較し低値傾向を示しており、これはスタチンの影響がコレステロール吸収抑制の作用によると考えられる。肝臓の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は、HFCD 群において低値傾向が認められた。これは NPC1L1 がコレステロール吸収に関与しており、高コレステロール血症の状態であるために肝臓では発現が減少する可能性が考えられる。HFCD+スタチン群は Control 群と同等の発現であり、スタチン投与により NPC1L1 の発現が維持される可能性が考えられる。

APOBEC1 とはアポリポ蛋白をコードする複合体で、APOBEC ファミリーの第 1 の要素であり、胃腸組織においてアポリポ蛋白 B の mRNA からアミノ基を取り除く複合体の触媒機能を有する。本研

究では HFCD 群で低値傾向が認められることから、NPC1L1 と同様に高脂肪・コレステロール食給餌による影響と考えられる。スタチン投与により APOBEC1 は HFCD 群に対し増加（回復）傾向があり、スタチンの影響がコレステロール吸収抑制の結果によると考えられる。

LIPC とは、肝由来の分泌タンパク質で血管内皮に存在し、カイロミクロン等のトリアシルグリセロールを加水分解し、より高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸を生成することでリポタンパク質代謝が促進され、脂質代謝に重要な役割を担っている。本研究で HFCD 群に対して HFCD+スタチン群は高値傾向が認められた。

SREBF とはステロールの規定要素を結合する因子である。SREBF 1、2 とともに高脂肪・コレステロール食給餌およびスタチン投与による影響はないと考えられる。

マイクロミニピッグに高脂肪・高コレステロール食を 1 年間給餌することにより、肥育や高コレステロール血症が認められ、剖検時肉眼観察でも大動脈に軽度の粥状硬化がみられたが、脳梗塞や心筋梗塞の誘発には至らなかった。脳梗塞や心筋梗塞の誘発には、脂肪やコレステロールの投与量や投与期間あるいはその他の負荷の必要性の検討が必要と思われる。今後、病理組織学的検討や脂質代謝関連遺伝子発現の解析を行い、病態解析をすすめる。

光を操作することによって、睡眠障害は生じたが、睡眠障害群で、HDL コレステロールが高いことから、動脈硬化進展にはむしろ抑制的な影響を与えた可能性が考えられた。睡眠障害によって、体重減少が生じ、結果的に給餌量が少なくなったことが一つの理由として考えられた。本動脈硬化モデルは、摂取脂肪量に依存して動脈硬化を生じることから、摂取脂肪量の減少が、動脈硬化進展に抑制的に働いたと考えられた。暗期に、睡眠障害を生じたが、明期につ

いては、何ら干渉を行わなかったため、夜間の睡眠障害が昼間に代償された可能性が考えられた。

マイクロミニピッグにアンジオテンシン を 2 週間静脈内持続投与すると、高血圧状態を保つことのできる、いわゆる高血圧モデルを作成することが出来た。このことは、マイクロミニピッグが、高血圧用の実験動物に適していることを示している。

以下、高血圧を引き起こした理由について *in vitro* および培養細胞実験の結果を基に考察した。

マイクロミニピッグの脳底動脈リング標本の血管反応は、今回内因性血管作動物質とした使用した、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、セロトニン、L-ニトロアルギニンおよびインドメタシンに対し、通常ブタと同様の血管反応を示した。これにより、基本的に通常ブタでこれまでに得られた実験結果を基に、各種実験を行うことが出来ることを示唆している。アンジオテンシンの 2 週間静脈内持続投与後に摘出された脳底動脈リング標本の血管反応では、セロトニンとブラジキニンで有意な変化が見られた。セロトニンの反応がアンジオテンシンの静脈内持続投与後に増強されることは、既にラットで報告されているが、ブラジキニン反応の変化はこれまでに報告されていないため、ブラジキニンに焦点を当てて、その機序の解明を試みた。

ブラジキニン適用により元々見られた弛緩反応に続く収縮反応は、アンジオテンシンの持続的静脈内投与により、弛緩反応の消失と収縮反応の増強が引き起こされた。培養内皮細胞を用いた実験より、ブラジキニン適用により脳底動脈内皮細胞に存在する B₂ 受容体を介して、一酸化窒素と PGF_{2α} が産生されることが示唆された。さらに、この内皮細胞を予めアンジオテンシン で処置しておくこと、一酸化窒素の産生量は有意に抑制され、PGF_{2α} の産生量は有意に増大した。この結果は、アンジオテンシンの持続的静脈内投与により、弛緩反応が消失し収縮

反応が増強されたかを示したものである。

ブタの内皮細胞の培養は、ウシ内皮細胞と同様、比較的安価な基本の培養液で培養が可能である。このことは実験を行うに当たって大きなアドバンテージと成り得る。In vivo から in vitro, 細胞培養実験、生化学的実験、分子学的実験に至るまで完成できるのがマイクロブタを使った実験の特徴と言える。

E. 結論

本研究により、確立された8週投与のマイクロミニピッグ動脈硬化症モデルに、スタチンを投与することによって HMGCR の増加による高コレステロール血症の抑制がみられ、その結果として動脈硬化性病変の減少が起こることが示唆された。今後、食餌中コレステロール量や試験期間、詳細な病理組織学的検討などが必要と考えられる。

光環境操作によって睡眠障害は生じたが、動脈硬化進展への影響は、強くなかったと考えられた。

マイクロミニピッグは、アンジオテンシンにより高血圧モデルを作成することが出来、また摘出血管実験や内皮細胞培養実験等を行い、実験結果を導くことが可能な動物である。摘出した脳底動脈の血管反応は、これまで実験で得られた普通のブタの血管反応とほぼ同一であった。今回、マイクロミニピッグが霊長類およびイヌ等の実験動物に代わる候補の実験動物になる可能性を実験結果と共に示すことが出来た。

参考文献

1. Miyoshi N, Horiuchi M, Inokuchi Y, Miyamoto Y, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Izumi Y, Miyajima H, Nagata R, Misumi K, Takeuchi T, Tanimoto A, Yasuda N, Yoshida H, Kawaguchi H. Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *In Vivo*. 24:671-680

- (2010)
2. Akioka K, Kawaguchi H, Kitajima S, Miura N, Noguchi M, Horiuchi M, Miyoshi N, Tanimoto A. Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of atherosclerosis in microminipigs. *In Vivo*. 28(1):81-90 (2014).
3. Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Ayaori M, Uto-Kondo H, Ikegawa M, Noguchi M, Wang KY, Izumi H, Tanimoto A. Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Microminipig Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet. *J Atheroscler Thromb*. 21(3):186-203 (2014)
4. Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, Shameshima H, Miyoshi N, Tanimoto A, Maruyama I. Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig. 27:357-361 (2013).
5. Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Noguchi M, Izumi H, Miyoshi N, Tanimoto A. Sex differences of serum lipid profile in novel microminipigs. 27:617-621 (2013). Zimberg IZ, Fernandes Jr. SF, Crispim CA, et al. Metabolic impact of shift work. *Work*, 2012;41:4376-4383.
6. Takeishi K, Horiuchi M, Kawaguchi H, et al. Acupuncture improves sleep conditions of minipigs representing diurnal animals through an anatomically similar point to the acupoint (GV20) effective for humans. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 2012:472982.
7. Atsushi Miyamoto, Ken Ito and Akira Nishio, Characterization of alpha-adrenoceptors in pig basilar artery from functional and radioligand binding studies. *Japan Journal of Pharmacology*, 61(2), 93-99 (1993).
8. Atsushi Miyamoto, Ryoko Wada, Aya Inoue, Shigeru Ishiguro, James K. Liao and Akira Nishio: Role of angiotensin II receptor subtypes in porcine basilar artery: Functional, radioligand binding, and cell culture studies. *Life Sciences*, 78(9), 943-949 (2006).
9. Atsushi Miyamoto, Toyoaki Sakota and Akira Nishio, Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors on the isolated pig basilar artery by functional and

radioligand binding studies. Japan Journal of Pharmacology, 65(3), 265-273 (1994).

10. Atsushi Miyamoto, Shigeru Ishiguro and Akira Nishio: Stimulation of bradykinin B2-receptors on endothelial cells induces relaxation and contraction in porcine basilar artery in vitro. British Journal of Pharmacology, 128(1), 241-247 (1999).
11. Atsushi Miyamoto, Shin Murata and Akira Nishio: Role of ACE and NEP in bradykinin-induced relaxation and contraction response of isolated porcine basilar artery. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, 365(5), 365-370 (2002).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

2. 学会発表

1. H Kawaguchi, T Yamada, N Miyoshi, A Tanimoto. The world smallest Microminipigs: Type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease. 19-20th April, 2013 (大阪大学中之島センター, 大阪)
2. A Tanimoto, H Kawaguchi, N Miyoshi. Atherosclerosis and cholesterol metabolism in Fujimicrapig. 第 85 回日本薬理学会年会 2012.3.14-16 (国立京都国際会館, 京都)
3. A Miyamoto, I.Md. Zahorul, H Kawaguchi, N Miura, E Yamazaki-Himeno, M Shiraishi, N Miyoshi, A Tanimoto. Effect of continuous intravenous infusion of angiotensin II on Microminipig basilar arterial responsiveness. 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.21-23 (福岡国際会議場, 福岡)
4. 青江史貴, 山田知信, 川口博明, 三浦直樹, 和泉博之, 谷本昭英, 三好宣彰. マイクロミニピッグを用いた食餌性動脈硬化症モデルの開発. 第 153 回日本獣医学会学術集会 2012.3.27-29 (大宮ソニックシティ, さいたま市)
5. 三浦直樹, 伊藤隆史, 川口博明, 永里朋香, 細川和也, 三好宣彰, 谷本昭英, 丸山征郎. 世界最小富士マイクラピッグ動脈硬化モデルによる高脂

血症と血栓形成能に関する検討. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6.7-9 (ハイアットエージェンシー東京, 東京)

6. I.Md. Zahorul, M Nishimura, H Kawaguchi, N Miura, T Iwanaga, E Yamazaki-Himeno, M Shiraishi, N Miyoshi, A Tanimoto, A Miyamoto. Effect of continuous intravenous infusion of angiotensin II on blood pressure and basilar arterial responsiveness to vasoactive substances in Microminipig. 第 154 回日本獣医学会学術集会 2012.9.14-16. (岩手大学, 盛岡市)
7. 武石 嘉一郎、川口 博明、有村 恵美、谷本昭英、堀内 正久; ミニブタ睡眠モデルの解析. 第 84 回日本衛生学会 (岡山コンベンションセンター), 2014 年 5 月 (岡山).
8. 宮本篤, イスラム・モハメド・ザホルル, 川口博明, 三浦直樹, 山崎-姫野絵美, 白石光也, 三好宣彰, 谷本昭英: アンジオテンシン II 静脈内持続投与のマイクロミニピッグ脳底動脈反応性へ及ぼす影響. 第 86 回日本薬理学会年会 (福岡国際会議場), 2013 年 3 月 (福岡).
9. Md. Zahorul Islam, Miharuru Nishimura, Hiroaki Kawaguchi, Naoki Miura, Tomoko Iwanaga, Emi Yamazaki-Himeno, Mitsuya Shiraishi, Noriaki Miyoshi, Akihide Tanimoto, Atsushi Miyamoto: Treatment of angiotensin II decreased NO and increased prostaglandin PGF_{2α} production by bradykinin in cultured porcine basilar arterial endothelial cells. 第 156 回日本獣医学会学術集会 (岐阜大学), 2013 年 9 月 (岐阜).
10. Md. Zahorul Islam, Emi Yamazaki-Himeno, Mitsuya Shiraishi, Atsushi Miyamoto, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Naoki Miura, Akihide Tanimoto: Angiotensin II decreases bradykinin-induced NO and increases prostaglandin PGF_{2α} release from cultured Microminipig basilar arterial endothelial cells. 第 87 回日本薬理学会年会(仙台国際センター), 2014 年 3 月 (宮城).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

II 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiroaki KAWAGUCHI, Tomonobu YAMADA, Naoki MIURA, Yoshihiro TAKAHASHI Tsuyoshi YOSHIKAWA, Hiroyuki IZUMI, Tatsuo KAWARASAKI, Noriaki MIYOSHI, Akihide TANIMOTO	Reference Values of Hematological and Biochemical Parameters for the World Smallest Microminipigs	J. Vet. Med. Sci.	74(7)	933-936	2012
Tsuyoshi YOSHIKAWA, Yoshihiro TAKAHASHI, Hiroaki KAWAGUCHI, Shinji UTSUNOMIYA, Naoki MIURA, Hiroyuki IZUMI, Noriaki MIYOSHI, Akihide TANIMOTO	A Dermal Phototoxicity Study Following Intravenous Infusion Administration of Ciprofloxacin Hydrochloride in the Novel Microminipigs	Toxicol. Pathol.	41	109-113	2013
Naoki MIURA, Hiroaki KAWAGUCHI, Tomoka NAGASATO, Tomonobu YAMADA, Takashi ITO, Hiroyuki IZUMI, Hisayo SHAMESHIMA, Noriaki MIYOSHI, Akihide TANIMOTO, Ikuro MARUYAMA	Coagulation Activity and White Thrombus Formation in the Microminipig	in Vivo	27	671-680	2013
Kawaguchi H Yamada T Miura N Noguchi M Izumi H Miyoshi N Tanimoto A	Sex Differences in Serum Lipid Profile in Novel Microminipigs.	in Vivo	27	617-621	2013
Akioka K Kawaguchi H Kitajima S Miura N Noguchi M Horiuchi M Miyoshi N Tanimoto A	Investigation of Necessity of Sodium Cholate and Minimal Required Amount of Cholesterol for Dietary Induction of Atherosclerosis in Microminipigs.	in Vivo	28	81-90	2014
Kawaguchi H Yamada T Miura N Ayaori M, Uto-Kondo H Ikegawa M, Noguchi M Wang KY Izumi H Tanimoto A	Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Microminipig fed a high-fat/high cholesterol diet: A Useful Animal Model Because of its Size and Similarity to Human Pathophysiology.	J Atheroscler Thromb.	21	186-203	2014

III 研究成果の刊行物・別刷