

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

霊長類循環器疾患モデルの解析に関する研究

研究分担者 揚山直英 独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター 主任研究員

研究要旨

再生医療・創薬研究等においてはヒトと近縁な霊長類を用いた有効性・安全性評価の需要が増え続けている。一方、それら霊長類における評価指標の中で特に循環器疾患の解析に重要な血液ガスに関する報告は少ない。そこで、今回はカニクイザル大規模繁殖コロニーにおいて、血液ガスおよび血液学データの測定を行い、その基準値の確立等を解析、検討した。その結果、血液ガス項目においては雄で HCO_3std 、 B.E. (vt) 、 ctCO_2 が高値を示し、ヒト同様の性差が認められた。また、全血球計算では加齢に伴って MCH と MCV が減少、 RBC 数が増加し、ヒトと異なる傾向が認められた。血液ガス項目において pH 、 pO_2 、 K^+ 、 O_2SAT 、 Cl^- はヒトと同様の値を示し、 Na^+ 、 Ca^{++} 、 Anion GAP はヒトより高値を示すなど、カニクイザル独特の基準値が樹立された。すなわち、カニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算の基準値が樹立され、加齢に伴う変化、性差、ヒトとの違いや相同性が明らかとなった。さらに心疾患群との比較では循環機能の低下を示唆する結果が得られた。以上より得られた基準値、結果は霊長類を用いた循環器疾患モデルの解析に有用であると共に、霊長類自体の健康管理にも役立つことが示唆された。

A. 研究目的

循環器疾患は世界各国で大きな問題となっており、その病態解明、新規診断・治療法開発研究は極めて重要である。しかしながら、未だヒト病態を忠実に反映した霊長類の循環器疾患モデルの報告は少ない。そのため、霊長類において循環器疾患個体を構築し、その詳細な解析を行う事ができれば、心臓病態学、生物資源研究のみならず医科学研究や厚生労働行政への貢献が大いに期待される。さらに昨今、再生医療・創薬研究等においては霊長類を用いた有効性・安全性評価の需要も増加する傾向にある。それら霊長類モデルの解析や評価を円滑に施行するためには、評価指標の一つと

して重要な血液系のより詳細な検査手法や基準値を樹立する事が求められている。

霊長類における血液生化学検査、ホルモン等の基準値の報告は数多く存在する。しかしながら、その一方で血液ガスに関する報告はほとんどない。血液ガスは近年注目されている循環器系医療や再生医療等の先進医療、さらに薬物の有効性、毒性試験等の指標に用いられるほか、霊長類自身の健康状態を判別するための検査項目としても非常に重要である。そこで今回、カニクイザルにおける血液ガス等血液学の基準値を樹立するため、大規模繁殖コロニーにおいて、動脈血の採取および測定を行った。また、すでにいくつかの血液学や生化学それ

ぞれ単独のデータの報告はあるが、今回のような大規模繁殖コロニーにおいて年齢や疾患等と多角的に比較した報告はないため、その解析も試みた。

B. 研究方法

本研究では、医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにおいて繁殖・育成されている、カニクイザル 64 頭（雄 20 頭、雌 44 頭）を用い、動脈血採取と計測を行った。被検個体の体重、年齢の平均値を表 1 に示した。動脈血の採取は、塩酸ケタミン（ケタラル：第一三共，Tokyo：5～10mg/kg i.m.）麻酔下にて、大腿動脈もしくは尾動脈から行った（図 1）。採取した血液は即時検査を行った。

血液ガス測定はラピッドラボ 348EX（SIEMENS, Berlin）全血球計算は KX-21（SYSMEX, Kobe）を用いて計測を行った。検査項目は血液ガス 15 項目 [pH、 pCO_2 、 pO_2 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{++} 、 HCO_3act 、 HCO_3std 、B.E. (vt)、B.E. (vv)、 $ctCO_2$ 、 $Ca^{++}(7.4)$ 、 O_2SAT 、Anion GAP] 全血球計算 18 項目 [WBC count、RBC count、Hemoglobin (HGB)、Hematocrit (HCT)、MCV、MCH、MCHC、PLT、W-SCR、W-MCR、W-LCR、W-SCC、W-MCC、W-LCC、RDW、PDW、MPV、P-LCR] である。なお、主要な血液ガス項目の臨床的意義を表 2 に示した。それぞれの値についてはスチューデント T 検定により性別の有意差を確認し、体重、加齢性の変化に関してはピアソンの積率相関係数により有意性検定を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を受け、さらに法律第 105 号「動物の愛護および管理に関する法律」、文科省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行

のための基本原則」、霊長類医学研究センターの指針である「サル類を用いた実験の詳細」を遵守して遂行した。動物の取扱は全て麻酔下で行う等、苦痛の排除に努め、動物飼育管理にも万全の配慮を行い実験を実施した。

C. 研究結果

まず、測定・解析に際して、大腿動脈、尾動脈の何れの部位から採取した血液も各項目で同一の値を示すことを確認した。

血液ガス：

血液ガスにおける検査項目および平均値を表 3 に示した。 pCO_2 、Anion GAP では加齢と共に数値が上昇する傾向、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、 $Ca^{++}(7.4)$ は体重に相関する傾向が認められたが他は一定の値を示した。また、性別による比較では HCO_3std 、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ で雄が高値を示す有意な差が認められた（図 2）。その他の血液ガス項目において年齢比較では有意な差は認められなかった。

全血球計算：

全血球計算における検査項目および平均値を表 4 に示した。性別における比較では RBC count が雄で $607.4 \times 10^3 \mu l$ であるのに対して雌で $668.8 \times 10^3 \mu l$ と多く、また HGB、HCT でも雌が多いという雌雄差が認められた。一方、年齢における比較では RBC count、HGB、HCT、W-MCR、W-MCC で正の相関が、MCV、MCH で負の相関が認められた（図 3）。体重との比較では、W-SCC、W-MCC、W-LCC で正の相関が、MCV で負の相関が見られた。他の項目では一定の値を示した。

D. 考察

本研究はカニクイザルの血液ガス基準値に関する初の研究である。また、全血球計算に関しては過去に報告があるものの、本研究のような大規模繁殖育成施設において実施されたものはない。以下に項目毎の考察を述べる。

血液ガス検査：

血液ガスにおいて、 HCO_3^- std、B.E. (vt)、 ctCO_2 が雄で有意に高値を示し、アルカローシスの傾向が認められた (図 2)。その一方で、雌では B.E. (vt) が -2.82 とアシドーシスの傾向が見られている。これらはヒトでも同様の傾向が報告されており、さらに本コロニーにおいて雄の高齢個体や心疾患、腎疾患の罹患歴を持つものが多く換気能力に差が生じた事にも起因するものと考えられた。年齢による差は Na^+ で軽度に認められる程度で相関もほぼないことから、血液ガスは年齢に関係なく、一定の数値を示すことが示唆された。

また、pH はヒト同様 7.39 ± 0.08 と安定した数値を示した。一方、同じマカク属のアカゲザルでは pH がヒトより高い 7.45 ± 0.04 を示すという報告があり、カニクイザルはアカゲザルよりもヒトに近い数字を示すことがわかった。 pCO_2 はヒトより低い 36.7 ± 6 を、 pO_2 はヒトとほぼ同じ 89.9 ± 12.7 を示した。この数字はアカゲザルでも 35.06 ± 4.25 と近い数値が見られており、マカク属で近い数値を示すことが推測された。 O_2SAT は雌雄ともに 96 前後の値を示しており、これはヒトや他のマカク属とも同様の値で一定している。 Na^+ は雄で 149.58 ± 2.85 、雌で 147.81 ± 4.34 とヒトやアカゲザルに対して高い値を示した。 K^+ は雄で 3.87 ± 0.33 、雌で 3.77 ± 0.54 とアカゲザルに対してわずかに高い数値を示した。 Cl^- は

107.13 ± 3.42 とヒトやアカゲザルと近い数値を示した。 Ca^{++} は 1.21 ± 0.06 とアカゲザルの 1.18 ± 0.05 と比べ高い値を示した。Anion GAP はアカゲザルの 17.21 ± 4.53 に比べ、 18.04 ± 6.26 とわずかに高い値を示した。ヒトの Anion GAP は 12 ± 2 mEq/L とカニクイザルやアカゲザルに対して低い値を示している。Anion GAP は $\text{AG} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$ で計算されたため、特に Na^+ でヒトと異なった高い数値を示していることから、このような結果となったと推察された。

全血球計算：

全血球計算では体重との間で MCV、W-SCC、W-MCC、W-LCC で有意な相関がみられた。雌雄間でも W-SCR、W-LCR、W-SCC で有意差がみられていることから、体重における相関は雌雄に起因するものと推測される。また、W-SCR は小球性白血球を示すもので、リンパ球等がそれに当たる。アカゲザルに関して述べた論文でも、リンパ球は雄で高い数値を示しており、同様の理由が考えられた。他のカニクイザルでの結果と比較すると、RBC count、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC 等多岐にわたる項目で同様の傾向が認められた。一方、PLT では既報の値が 430 ± 110 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) であるのに対し、 331 ± 91.5 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) と低い値を示していた。

今回、RBC count、HGB、HCT で雄に比べ雌で高い数値が見られた。これらは一般的には性周期による出血に伴い、雌で低い値を示すと言われているが、今回雄で低い値がみられたのは、個別飼育管理方式で繁殖育成されると言うコロニー独特の特性によるものと推測された。MCV、MCH に関してはヒトに比べ低い値を示しているが、アカゲザルでも MCV は同様に 71.1 ± 5.44 と低い値を示すという報告があり、マカクザルでは

ヒトに比べ血球が小さい事が示唆された。また、MCH もヒトに比べ低い値を示し、アカゲザルと比較しても更に低い値を示していることから、カニクイザルではより低色素性の赤血球となっていることが示唆された。

年齢に関しては RBC count、HGB、HCT で正の相関、MCV、MCH で負の相関が認められ、有意差検定でも RBC count、HGB、HCT は年齢が増加するに従い増加し、MCV、MCH で有意に低下する加齢性の変化が認められた（図 3）。これらは他の霊長類でも同様の結果が報告されており、加齢に伴い体内水分含有量の低下が起こり、血液濃縮様の状態を呈している事が示唆された。

心疾患との関連：

最後に、今回データを得た個体より、心疾患の病歴の有無を基に比較を行ったところ、血液ガス項目では、 pCO_2 、 HCO_3std 、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、全血球計算項目では W-MCR、W-MCC で差が認められた。特に、 pCO_2 では正常群の平均値が 35.72 ± 6.88 であるのに対し、心疾患群では 38.15 ± 4.62 で、有意な差が認められ、これらは、心機能低下と関連した pCO_2 の上昇が認められるヒトの心疾患例の報告とも一致しており、心機能低下の症状を良く反映している結果であると推察される。また、B.E. (vt)、 $ctCO_2$ 、 HCO_3std でも心疾患群が高値を示す傾向が認められた。これらは心疾患群がアルカローシスに傾いていることを示し、心臓の循環機能の低下により換気能力が低下する心疾患の特徴に一致している。これらのことからカニクイザルの血液ガス基準値は循環器疾患モデルの解析に有用である事が示唆された。

E . 結論

本研究の結果よりカニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算の基準値が樹立された。さらに加齢に伴う変化が認められる項目があり、加齢性モデルとしての可能性が示唆された。また、ヒトとの違いや相関性が明らかとなった。さらに心疾患モデルの病態が反映された結果であることも示唆された。すなわち、これらの基準値および結果はサルを用いた循環器疾患研究に有益であると共に、サル自体の健康管理にも役立つものである。今後は循環器疾患モデルとの関連性の詳細な解析等を通し、さらなる霊長類資源の可能性を模索したい。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kanemoto S, Sato Y, Sakakibara Y. Cardiopulmonary Bypass Induces Recruitment of Bone Marrow-Derived Leukocytes to the Lungs in Monkeys. *Ann Thorac Surg.* 97: 617-622. 2014.
- 2) Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y, Mineno J. CD4(+) T Cells Modified by the Endoribonuclease MazF Are Safe and Can Persist in SHIV-infected Rhesus Macaques. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3:e168.2014.

2. 学会発表

- 1) 藤城康世，鯉江洋，柴田宏昭，岡林佐知，片貝祐子，Boran Osman，金山喜一，保富康宏，揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析、第 61 回日本実験動物学会総会、北海道、2014 年 5 月 15-17 日。

- 2) 森谷忠生, 平松祐司, 古垣達也, 茂木芳賢, 縮共恭一, 山本純偉, 金本真也, 後藤行延, 揚山直英, 松下昌之助, 榊原謙: カニクイザルを用いた体外循環モデルの確立、第52回日本人工臓器学会大会、北海道、2014年10月17-19日。
- 3) 藤城康世, 岡林佐知, 鯉江洋, 金山喜一, 保富康宏, 揚山直英: カニクイザルに認められた肝細胞癌の生前MRI診断を実施した一例、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 4) 中山駿矢, 鯉江洋, 金山喜一, 片貝祐子, 山海直, 揚山直英: カニクイザルにおける血液ガスおよび全血球計算基準値の確立に関する研究、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 5) オスマン ボラン, 鯉江洋, 岡林佐知, 藤城康世, 金山喜一, 揚山直英: 霊長類における心拍変動およびアドレナリン受容体の加齢性変化、第20回日本野生動物医学会つくば大会、茨城、2014年9月16-19日。
- 6) Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, Hiroaki Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Kiiichi Kanayama, Yasuhiro Yasutomi, Naohide

Ageyama. Enhanced magnetic resonance imaging of Spontaneous Occurring Hepatocellular Neoplasia in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日。

- 7) Yuko Katakai, Syunya Nakayama, Hiromi Ogawa, Mayuko Tanaka, Akio Hiyaoka, Naohide Ageyama, Hiroshi Koie, Yasuhiro Yasutomi. Age-related changes on hematological, serum biochemistry and blood gas parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, Vietnam, 2014年10月14-17日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

表 1. 雌雄における体重および年齢の平均値

	頭数	体重 (kg)	年齢
		平均値 (範囲)	平均値 (範囲)
雌	44	3.64±1.09 (1.10 - 6.18)	21.36±9.39 (2 - 35)
雄	20	5.74±1.02 (3.88 - 7.58)	17.05±8.94 (8 - 32)

表 2. 主要血液ガス項目の臨床学的意義

		項目名	臨床学的意義
ガス交換能力の指標	pCO ₂	二酸化炭素分圧	肺胞換気量の指標で、高値を示した場合は換気不十分、低値では過換気であることを示す。
	pO ₂	酸素分圧	血液の酸素化能力の指標であり、大気圧や外気酸素濃度などの環境要因、肺胞の換気量、拡散能、シャントなどの肺胞におけるガス交換能力により左右される。
	O ₂ SAT (SpO ₂)	酸素飽和度	血中 Hb と酸素の結合割合。PaO ₂ と相関する (酸素解離曲線)。
	ctCO ₂	血中 CO ₂ 濃度	血中の溶存二酸化炭素濃度を示す。ctCO ₂ の増加は換気不全を意味する。
酸塩基平衡の指標	pH	水素イオン濃度	水素イオン量を示す。アカゲザルの場合、7.45±0.04 以内が正常との報告がある。
	Anion GAP		Cl ⁻ 、HCO ₃ ⁻ 以外の陰イオンの総量。これらは通常測定されない陰イオンで、正常の場合はリン酸イオン・硫酸イオンなどが含まれる。特殊な病態では、乳酸・ケトン体なども含まれる。
	HCO ₃ std	標準重炭酸イオン	重炭酸イオンの指標で、腎臓における酸塩基平衡を示す。高値を示した場合は代謝性アルカローシス、低値では代謝性アシドーシスとなる。HCO ₃ に関しては呼吸性にも値が変化する。
B. E. (vt)	Base Excess in vitro	Base Excess は Buffer base の正常値からの偏移の度合いを示す。正の値は塩基の過剰 (代謝性アルカローシス) を、負の値は塩基の欠乏 (代謝性アシドーシス) を示す。	

「Hongo, T. , Hiroshige, T. and Toyota, J. 標準生理学. 第 6 版. 医学書院」参照



図 1. カニクイザルにおける動脈血採取

大腿動脈(A)および尾動脈(B)の何れの部位から採取した動脈血も全ての項目で同一の値を示す事が確認された。

表 3. 血液ガス検査項目および平均値

検査項目	平均	SD	MAX	MIN
pH	7.39	0.08	7.49	6.99
pCO ₂	36.67	6.00	50.90	9.70
pO ₂	89.91	12.69	122.20	57.20
Na ⁺	148.11	4.43	154.00	127.00
K ⁺	3.80	0.48	5.06	2.71
Ca ⁺⁺	1.21	0.07	1.40	1.04
HCO ₃ act	21.30	3.39	25.00	15.20
HCO ₃ std	22.80	4.00	28.80	6.60
B. E. (vv)	-4.04	4.16	1.20	-10.20
B. E. (vt)	-2.16	5.34	4.80	-27.20
ctCO ₂	23.38	4.90	30.80	2.60
Ca ⁺⁺ (7.4)	1.21	0.06	1.40	1.07
O ₂ SAT	96.49	1.58	98.60	91.00
Cl ⁻	107.13	3.42	115.00	89.00
Anion GAP	18.04	6.26	30.90	0.50

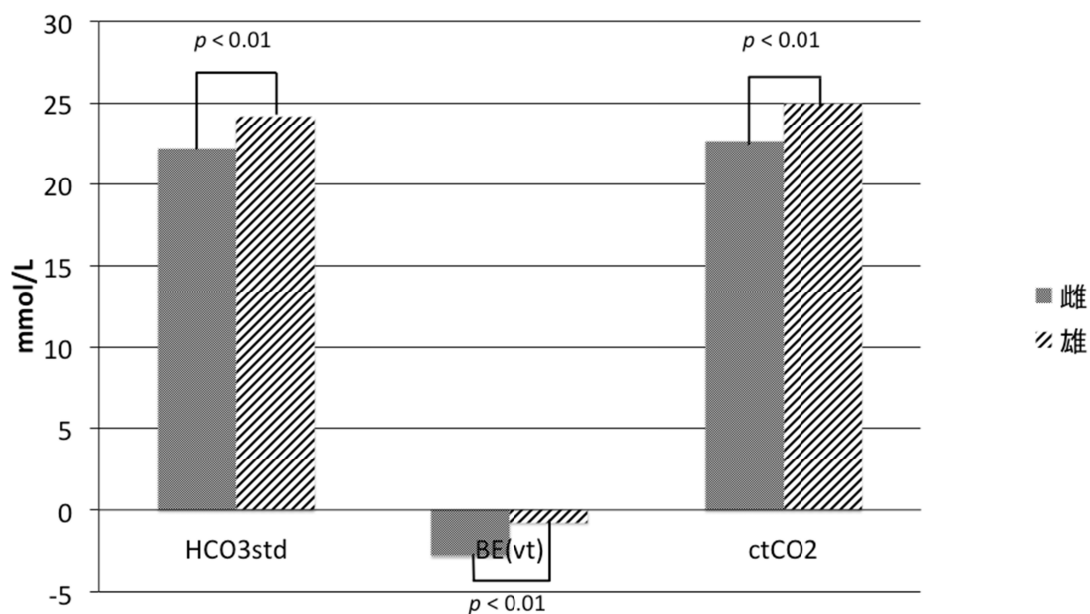


図 2. HCO₃、B.E.(vt)、ctCO₂の雌雄比較

血液ガス検査項目の雌雄に関する比較ではHCO₃std、B.E.(vt)、ctCO₂において有意な差が認められた。

表 4. 全血球計算検査項目および平均値

検査項目		平均	±SD	MAX	MIN
WBC	×10 ² /μl	82.86	26.40	146	29
RBC	×10 ⁴ /μl	649.64	100.15	880	380
HGB	g/dl	12.56	1.79	16.2	7.2
HCT	%	43.69	5.85	59.1	26.8
MCV	f1	67.64	4.59	79.1	59
MCH	pg	19.46	1.89	23.6	13
MCHC	g/dl	28.75	1.69	33.7	20.6
PLT	×10 ⁴ /μl	33.07	9.23	63.2	10.9
W-SCR	%	41.92	14.96	73.9	10.8
W-MCR	%	8.59	4.64	22.1	2.2
W-LCR	%	51.36	15.09	84.5	24.4
W-SCC	×10 ² /μl	34.30	16.26	81	9
W-MCC	×10 ² /μl	7.17	5.16	27	2
W-LCC	×10 ² /μl	43.79	21.18	118	15
RDW	f1	35.13	2.50	41.6	30.3
PDW	f1	11.87	2.23	18.6	8
MPV	f1	9.73	1.16	13	7.2
P-LCR	%	23.45	9.21	48.6	6.7

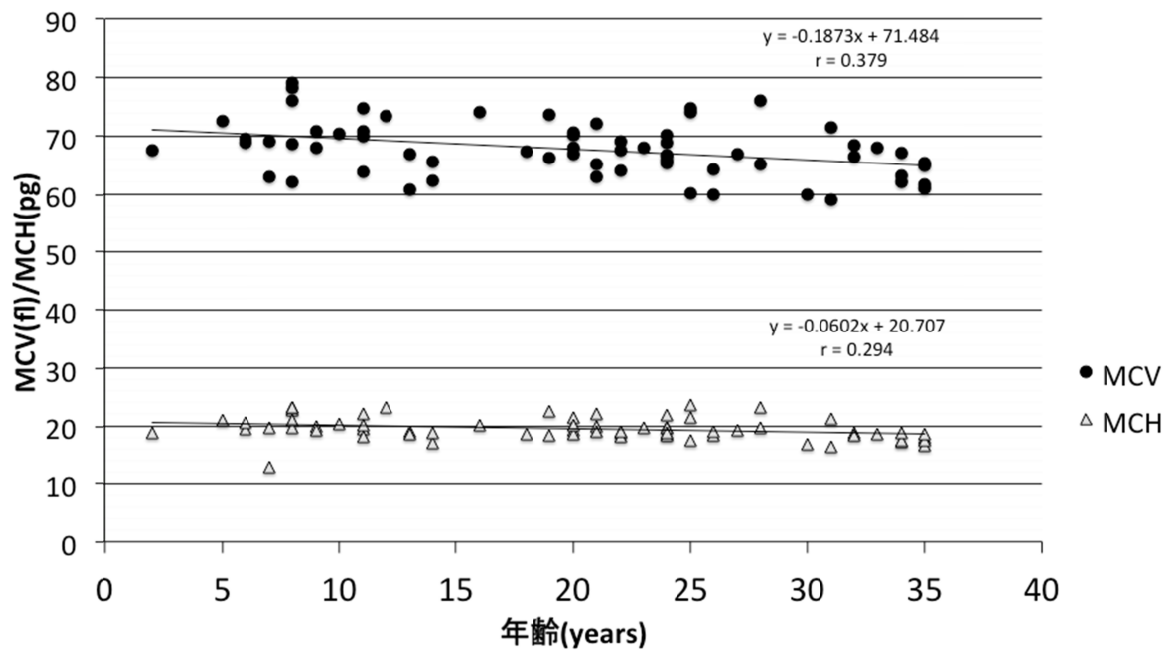


図3. 年齢とMCH、MCVの関連

加齢に伴い、RBC count、HGB、HCTが増加するのに対し、MCH、MCVは減少する傾向が認められた。