

マイクロミニピッグ動脈硬化モデルの開発

Development of Atherosclerosis Model in Microminipig

北里大学獣医学系研究科獣医病理学 山田 知信

ブタはヒトと生理学・解剖学的に類似しているため、近年毒性学・薬理学的研究での使用が増加している。ゲッチングンやユカタン等のミニブタは、家畜ブタと比較して小型であり実験動物として使用されているが、それでも体重は制限給餌下で30~40kgであり、体の大きさから管理が大変である。一方で、ポットベリー・ブタと別種ミニブタの交配で誕生した国内発のマイクロミニピッグは体重が10kg前後と小さいことから魅力的な動物である。このマイクロミニピッグの成長曲線、血液学および血清生化学的パラメータの基準値を調べることを目的とし実験した。結果として、雌雄ともに、生後3ヶ月および6ヶ月の体重はそれぞれ5および10kg未満であり、成長曲線は生後18ヶ月以降にほぼプラトー（約20kg）を示し、ミニブタよりも明らかに小型であることが判明した。さらに、主要な血液学および血清生化学的パラメータを確認したところ、性差は見られず、その値はゲッチングンやユカタンのミニブタと非常に類似していたことが判明した。本研究で得られたデータはマイクロミニピッグを実験動物で使用するための基本的な参考値となるものであり、毒性学・薬理学的研究において、マイクロミニピッグが利用できると判断した。

アテローム性動脈硬化症は、心血管・脳血管梗塞疾患の主因であり、近年、日本での生活様式の欧米化、特に脂肪分の多い食事によるカロリー摂取増加が原因で、患者数が増加している。アテローム性動脈硬化症の病態は遺伝的と環境的要因の両面があり、ヒトの生体生理と病態を再現する適切な動物モデルが求められているが、現状は主にマウスやウサギの動物モデルが使用されている。ブタはマウスやウサギと異なり、解剖学、生理学、食事や睡眠の生活習慣がヒトと類似している点から、有用なモデル動物になりうると考えられるが、一般的に使用されているミニブタは体が大きく取り扱いが大変であるため、より小型のマイクロミニピッグを用いて動脈硬化症の動物モデルの確立を行った。普通食を与えた群、高脂肪食として12%のラードと、0.2、0.5および1.5%の配分でコレステロールを混合した3つの群を用いて実験を行った。結果として、マウスでは必要なコール酸を含まない、0.2~1.5%のコレステロールを含む高脂肪・高コレステロール食を8週間与えるだけで、高コレステロール血症およびアテローム性動脈硬化症が誘導することに成功した。さらに、LDLコレステロール濃度とLDL分画中のコレステロールの割合が著明に上昇し、LDL受容体およびヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素（以下HMGCR）の肝発現は低下し、コレステロール輸送に関与するコレステリルエステル転移蛋白活性が血清中に検出された。Niemann-Pick C1-like1蛋白は肝臓

と小腸の両方で発現していたが、肝のアポ B の mRNA 編集酵素は発現していなかった。マウスとは対照的に、マイクロミニピッグの肝リパーゼ活性はヒトと同様に肝臓に局在していることが判明した。これらの結果は、コレステロールの恒常性とアテローム形成に関連する高脂血症誘発遺伝子発現プロファイルが、マイクロミニピッグとヒトで類似していることを示唆し、本研究で作成したマイクロミニピッグ動脈硬化モデルは、動脈硬化とその関連疾患の研究に適したモデルであると考えられた。

スタチンは、メバロン酸経路の律速酵素を介して HMGCR を阻害し、ヒトやウサギで血中コレステロールの上昇を抑制することが知られ、高コレステロール血症や動脈硬化症の治療薬として一般的に使用されている。しかしながら、スタチンのブタを用いた研究は少なく、マイクロミニピッグに関しては未だ報告がない。よって、マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いて、スタチンの影響を評価するのに最適な食餌中のコレステロール投与量と実験期間を検討した。12 週間の実験期間において、普通食 (以下 NcD) を与えた群、高脂肪 (12%w/w) および低コレステロール (0.1%w/w) 食 (以下 HFLCD) を与えた群、HFLCD にスタチン (体重あたりスタチン投与量 3mg/kg) を添加したものの (以下 HFLCD+Statin) を与えた群を用いて比較検討した。結果として、HFLCD により、体重、大網および腸間膜脂肪の器官重量を増加させたが、HFLCD+スタチン群においてスタチンの明らかな抑制はみられなかった。血液学的検査および血液生化学検査では、血清中脂質代謝パラメータ (総コレステロール、遊離コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール) は HFLCD により高値を示し、HFLCD+Statin 群ではこれらの HFLCD による脂質代謝パラメータの上昇抑制がみられた。血中酸化ストレスでは、HFLCD により d-ROMs の増加がみられ、BAP および BAP/d-ROMs 比の減少がみられ、HFLCD+Statin 群でも同様であった。先行研究で、マイクロミニピッグに 0.2%w/w 以上のコレステロール食を与える事により HMGCR mRNA の肝発現が低下することを見出したが、本試験の 0.1%w/w コレステロールの投与では、HMGCR mRNA の肝発現の低下はみられず、スタチンを評価するのに適したモデル作出に成功した。さらに、HMGCR mRNA の肝発現は HFLCD+Statin 群で上昇傾向を示し、NcD 群と比較して 1.5 倍、HFLCD 群と比較して 2 倍の差がみられた。En face 解析による腹部大動脈のアテローム性動脈硬化病変面積および、組織形態学的解析における腹部大動脈の内膜面積/血管面積比は、NcD 群および HFLCD+Statin 群は同程度であり、これらの群と比較して、HFLCD 群で有意に増加した。なお、HFLCD 給餌によりアテローム性動脈硬化病変がみられたものの、血栓症や自然発症の心筋梗塞や脳梗塞はみられなかった。これらの結果から、HFLCD 給餌により高コレステロール血症、腹部大動脈の動脈硬化およびメタボリックシンドロームの病態 (大網および腸間膜脂肪組織重量の増加) が誘発されることを確認し、これらの HFLCD の影響に対するスタチンの影響は、血清中脂質代謝パラメータの減少、HMGCR ダウンレギュレーションの抑制がみら

れることが確認できた。さらに、血中酸化ストレスマーカーに対するスタチンの効果はみられなかったものの、本研究での **d-ROMs** および **BAP** の変化はヒトの動脈硬化症における変化と類似していたことから、アテローム性動脈硬化症の評価に有用であると考えられた。結論として、**HFLCD** により誘導された本マイクロミニピッグのアテローム性動脈硬化症モデルは、高コレステロール血症およびアテローム性動脈硬化症に対する **HMGCR** 阻害薬の評価に適した動物モデルと考えられた。