様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 6 月 22 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2016
課題番号：25450426

研究課題名（和文）医療機器開発のための動脈硬化マイクロミニピッグの作出

研究課題名（英文）Development of Microminipig model of atherosclerosis for medical device development

研究代表者

川口　博明（Kawaguchi, Hiroaki）

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：60325777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々の開発した高脂肪・高コレステロール食の12週間給餌によるマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを利用し、臨床画像検査で確認できる程度の動脈硬化病変をより短期間に発生させ、医療機器開発用動脈硬化発症ミニブタを作出することが目的である。この食餌制御にさらにアンジオテンシンII（2週間）あるいはNOS阻害剤（8週間）を負荷することにより、より増悪した動脈硬化を誘発することができ、NOS阻害剤の方が病理学的に病変の程度がより強かった。しかしながら、いずれも頚動脈エコーで確認できる程度の動脈硬化病変はみられなかった。今後、モデルの改良あるいはCAVIなどの評価法の検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：We established a model of atherosclerosis in the Microminipig by giving animals a high fat and high cholesterol diet for 8 weeks. The aim of this study is to induce atherosclerosis which can be confirmed by a clinical imaging test for short period using the previous our model. This study added angiotensin II for 2 weeks or NOS inhibitor for 8 weeks to the above diet control. The addition of angiotensin II and NOS could induce accelerated atherosclerotic lesions of systemic aorta and arteries for while the atherosclerotic lesions (ex. intima thickening) were not recognized by carotid artery echo. Model improvement or consideration of evaluation method (ex. CAVI: Cardio Ankle Vascular Index) will be needed in the future.

研究分野：実験病理学

キーワード：動脈硬化モデル動物　ミニブタ　高脂肪高コレステロール食

１．研究開始当初の背景

我々は、ヒトとの類似点が多い国産の超小型ミニブタであるマイクロミニピッグ（Microminipig）の実験動物としての開発を行ってきた（Kawaguchi H, *et al*. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest Microminipigs. J Vet Med Sci. 74: 933-936, 2012.、Takeishi K, 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: 472982, 2012.）。

また、病態モデルとして、この動物にHigh fat [12%] and cholesterol [0.5%] diet（HFCD）を 12 週間給餌することにより、血中総コレステロール値が 1000 mg/dL にも及ぶ持続的超高コレステロール血症を誘発させ、その結果、全身の動脈（冠動脈、脳底部動脈、大動脈弓など）にヒトのそれに類似した粥状硬化を引き起すことに成功した（Kawaguchi H, *et al* Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet. J Pharmacol Sci. 115: 115-121, 2011.、Miyoshi N, Kawaguchi H［責任］, *et al*. Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. In Vivo. 24:671-680, 2010.）。しかし、心筋梗塞や脳梗塞はみられず、比較的軽度な粥状硬化病変であった。

２．研究の目的

本課題では、食餌制御（HFCD）にさらにアンジオテンシンⅡ（Ang II、2 週間）あるいは NOS 阻害剤〔NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、8 週間〕を負荷し、より増悪した動脈硬化病変を短期間に発生させ、医療機器開発用動脈硬化発症ミニブタを作出することが目的である。さらに、医療機器開発用動脈硬化発症マイクロミニピッグと断定するために血液検査、画像検査（特に頚動脈エコー）を中心に生体内動脈硬化診断法の確立を目指した。

３．研究の方法

(1) アンジオテンシンⅡによる短期間動脈硬化発症モデルの開発（業績論文 1）

6～7 ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄 14 頭に右頚静脈カテーテル留置術を行い、3 群に分け、インフュージョンポンプを用いて、Ⅰ群には生理食塩水の 24 時間静脈内持続投与を（control、ND: normal diet、n=5）、Ⅱ群にはアンジオテンシンⅡの 24 時間静脈内持続投与を（Ang II、n=5）、Ⅲ群にはアンジオテンシンⅡ投与に加えて HFCD 給餌（Ang II + HFCD、n=4）を施した。試験期間を 2 週間とし、毎日血圧と心拍数を測定し、投与前および投与後 1 および 2 週間目に体重測定、血液検査を行った。Pre と End で無麻酔下エコー検査を行った。実験終了後、安楽死、剖検し、病理組織学的検索を行った。

(2) NOS 阻害薬・L-NAME による短期間動脈硬化発症モデルの開発（業績論文 10）

3.5～4.5 ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄 11 頭を、4 群に分け、Ⅰ群は対照群・ND 給餌のみとし（control、ND、n=3）、Ⅱ群には ND 給餌に L-NAME を負荷（ND+L-NAME、n=2）、Ⅲ群には HFCD 給餌のみ（HFCD、n=3）、Ⅳ群には HFCD 給餌に L-NAME を負荷（HFCD+L-NAME、n=3）した。給餌は 1 日 2 回（朝夕）給餌とし、L-NAME は給餌に合わせて、混餌投与した。試験期間を 8 週間とし、毎週体重測定、隔週で血液検査、エコー検査を行い、剖検直前に麻酔下観血式血圧測定（大腿動脈）を行った。実験終了後、安楽死、剖検、病理組織学的検索を行った。

４．研究成果

(1) アンジオテンシンⅡによる短期間動脈硬化発症モデルの開発（業績論文 1）

体重はⅡ群で増加抑制傾向がみられた。血中アンジオテンシンⅡ濃度はⅠ群に対し、2 および 3 回目で、Ⅱ群およびⅢ群が高値を示した。投与後 1 日目よりⅡ群およびⅢ群で収縮期血圧が高値を示し、2 週間持続した。拡張期血圧および心拍数に変化はみられなかった。血中総コレステロール値、低比重リポタンパクコレステロール値、コレステロール・エステル値においてⅢ群には高脂肪食による有意な高値が持続してみられ、Ⅱ群でも

Ⅲ群より数値は小さいが、有意な高値を示した。アンジオテンシンⅡ負荷（Ⅱ群およびⅢ群）により心エコー検査で、拡張末期および収縮末期の左室径が有意に増加し、左室後壁厚の増加傾向がみられた。Ⅲ群では心室中隔厚の増加傾向もみられた。しかしながら、頚動脈エコーでは、Ⅱ群およびⅢ群に内膜肥厚（intimal thickness）はみられなかった。病理組織学的検索において、Ⅲ群においてのみ動脈硬化病変が形成され、Stary type classification によりタイプⅠに分類された。ⅡおよびⅢ群では大動脈の内膜下での線維増生およびマクロファージの浸潤が認められた。

本実験により、マイクロミニピッグにおいて 2 週間のアンジオテンシンⅡ静脈内持続投与により、心肥大を伴うマイクロミニピッグ高血圧症モデルが作出できることを示した。さらにアンジオテンシンⅡ静脈内持続投与に加えて HFCD を 2 週間給餌することにより、腹部大動脈を中心に動脈硬化病変が形成され、高血圧症および動脈硬化症を有するモデルを作出できることを示した。

(2) NOS 阻害薬・L-NAME による短期間動脈硬化発症モデルの開発（業績論文 10）

ⅢおよびⅣ群（HFCD）では、体重増加傾向がみられた。Ⅰ群と比較して、Ⅲ群およびⅣ群（HFCD）の血清総コレステロール値、低比重リポタンパクコレステロールおよび高比重リポタンパクコレステロール値は、実験開始 2 週目より、有意な持続的高値を示した。Ⅱ群およびⅣ群（L-NAME 投与：186±11 mmHg）の収縮期血圧は、Ⅰ群およびⅢ群（L-NAME 非投与：135±3 mmHg）よりも高値を示した。心エコーではⅠ群と比較して、Ⅱ群（L-NAME のみ投与）では、実験開始 6 週目より、Ⅳ群（HFCD + L-NAME 投与）では、実験開始 4 週目より、左室壁厚の有意な増加が認められた。しかしながら、頚動脈エコーではⅡ群、Ⅲ群およびⅣ群に、内膜肥厚（Intimal thickness）はみられなかった。Ⅰ群と比較して、Ⅱ群およびⅣ群（L-NAME 投与）の心臓重量の増加がみられた。病理組織学的検索ではⅠ群と比較して、Ⅲ群およびⅣ群で Oil red O 染色陽性率（動脈硬化病変面積）が有意に増加し、Ⅲ群と比較して、Ⅳ群で Oil red O 染色陽性率が有意に増加した。Ⅳ群の Oil red O 染色陽性率（53%）は、同じ配合の HFCD のみを 8 週間給餌した条件で実施した過去のデータ（33％、業績 12）よりも高値を示し、L-NAME 負荷が動脈硬化を増悪させた。

本実験により、マイクロミニピッグにおいて 8 週間の L-NAME 混餌投与により、心肥大を伴うマイクロミニピッグ高血圧症モデルが作出できることを示した。さらに L-NAME 投与に加えて HFCD を 8 週間給餌することにより、大動脈をはじめ全身の動脈に比較的増悪する動脈硬化病変が形成され、高血圧症および動脈硬化症を有するモデルを作出できることを示した。

(1)と(2)の総合評価：アンジオテンシンⅡと L-NAME 負荷による動脈硬化病態の比較

我々の開発した高脂肪・高コレステロール食の 12 週間給餌によるマイクロミニピッグ動脈硬化モデル（業績 21、22）を利用し、臨床画像検査で確認できる程度の動脈硬化病変をより短期間に発生させ、医療機器開発用動脈硬化発症ミニブタを作出することを試行した。この食餌制御にさらにアンジオテンシンⅡ（2 週間）あるいは NOS 阻害剤（8 週間）による高血圧を負荷することにより、より増悪した動脈硬化を誘発することができたが、NOS 阻害剤の方が病理学的に病変の程度がより強かった。しかしながら、いずれも頚動脈エコーで確認できる程度の動脈硬化病変はみられなかった。今後、モデルの改良あるいは、動脈硬化症の診断に用いられる血管機能検査の１つである心臓足首血管指数 CAVI（Cardio Ankle Vascular Index）などの評価法の検討が必要である。

また、これら 2 剤のうち、どちらが医療機器開発のための動脈硬化発症マイクロミニピッグモデルの作出に適切かを考察すると、L-NAME であろう。
その理由としては
①投与手技が簡便：混餌投与
②動脈硬化を増悪する程度がより強い
が挙げられる。②については、今後、さらに、2 週間の試験期間で、L-NAME 負荷が動脈硬化をどの程度増悪させるか検討する必要がある。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 16 件）

1) Islam MZ, Kawaguchi H[責任], Miura N, Miyoshi N, Yamazaki-Himeno E, Shiraishi M, Miyamoto A, Tanimoto A.. Hypertension alters the endothelial-dependent biphasic response of bradykinin in isolated Microminipig basilar artery. Microvascular Research. 2017 in press. 査読有.
2) Yamada S, Kawaguchi H, Yamada T, Guo X, Matsuo K, Hamada T, Miura N, Tasaki T, Tanimoto A. Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs. J Atheroscler Thromb. 2017. in press. 査読有.
3) Miyoshi K, Kawaguchi H［責任］, Maeda K, Sato M, Akioka K, Noguchi M, Horiuchi M, Tanimoto A. Birth of Cloned Microminipigs Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos that have been Transiently Treated with Valproic Acid. Cellular Reprogramming. 18: 390-400, 2016. 査読有.
4) Noguchi M, Ikedo T, Kawaguchi H, Tanimoto A. Estrus synchronization in Microminipig using estradiol dipropionate and prostaglandin F2α. J Reprod Dev. 62: 373-378, 2016. 査読有.
5) Morishita S, Kawaguchi H [責任], Ono T, Miura N, Murakoshi M, Sugiyama K, Kato H, Tanimoto A, Nishino H. Enteric lactoferrin attenuates the development of high-fat and high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Microminipigs. Biosci Biotechnol Biochem. 80: 295-303. 2016. 査読有.
6) Guruge KS, Noguchi M, Yoshioka K, Yamazaki E, Taniyasu S, Yoshioka M, Yamanaka N, Ikezawa M, Tanimura N, Sato M, Yamashita N, Kawaguchi H［責任］. Microminipigs as a new experimental animal model for toxicological studies: comparative pharmacokinetics of perfluoroalkyl acids. J Appl Toxicol. 36: 68-75, 2016. 査読有.
7) Murata D, Tokunaga S, Tamura T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K. A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. J Orthop Surg Res. 10: 35. 2015. 査読有.
8) Noguchi M, Miura N, Ando T, Kubota C, Hobo S, Kawaguchi H［責任］, Tanimoto A. Profiles of Reproductive Hormone in Microminipig during the Normal Estrous Cycle. In Vivo. 29:17-22, 2015. 査読有.
9) Miura N, Kucho K, Noguchi M, Miyoshi N, Uchiumi T, Kawaguchi H, Tanimoto A. Comparison of the genomic sequence of the Microminipig, a novel breed of swine, with a genomic database for conventional pig. In Vivo. 28: 1107-1111, 2014. 査読有.
10) Yamaguchi T, Yamazaki T, Kawaguchi H, Tawa M, Nakamura Y, Shiota M, Osada-Oka M, Tanimoto A, Okamura T, Miura K, Iwao H, Yoshiyama M, Izumi Y. A noninvasive metabolic syndrome model using an extremely small minipig, the Microminipig. J Pharmacol Sci. 126: 168-171, 2014. 査読有.
11) Kakimoto T, Otsuka A, Kawaguchi H, Ogata K, Tanimoto A, Kanouchi H. Plasma homocysteine concentrations in novel microminipigs. In Vivo. 28: 579-582, 2014. 査読有.
12) Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Ayaori A, Uto-Kondo H, Ikegawa M, Noguchi M, Wang K, 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. 査読有.

13) Akioka K, Kawaguchi H[責任], 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. 査読有.

14) 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: 617-622, 2013. 査読有.

15) Miura N, Kawaguchi H [責任], 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. In Vivo. 27: 357-362, 2013. 査読有.

16) Yoshikawa T, Takahashi Y, Kawaguchi H [責任], Utsunomiya S, Miura N, Izumi H, Miyoshi N, Tanimoto A. A dermal phototoxicity study following intravenous infusion administration of ciprofloxacin hydrochloride in the novel Microminipigs. Toxcol Pathol. 41: 109-113, 2013. 査読有.

〔学会発表〕（計 18 件）

1) 武石嘉一朗, 川口博明, 笹竹洋, 阿部正治, 牛飼美晴, 有村恵美, 谷本昭英, 堀内正久. マイクロミニピッグにおける高塩分食摂取の生体応答. 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016.05.11-13. 旭川市民文化会館（北海道旭川市）.

2) 前田昴亮, 秋岡幸兵, 野口倫子, 三浦直樹, 川口博明, 谷本昭英, 三好和睦. バルプロ酸処理を用いた体細胞クローンマイクロミニピッグの作出. 第８回日本暖地畜産学会熊本大会 2015.10.24-25. 東海大学熊本キャンパス（熊本県熊本市東区渡鹿 9-1-1）

3) Onoue K, Kawaguchi H, Miyoshi N, Ozawa M, Horie M, Akioka K, Noguchi M, Tanimoto A. Development of a Microminipig infectious disease model for porcine endemic diarrhea. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases 2015, Kyoto, Japan (ISERPD2015 Kyoto). 21st-24th June, 2015 at Kyoto International Conference Center (京都府京都市).

4) Akioka K, Kawaguchi H, Miyoshi N, Onoue K, Ozawa M, Horie M, Noguchi M, Tanimoto A. Neonatal Microminipig Infectious Disease Model Experimentation in an ABSL2 Facility. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases 2015, Kyoto, Japan (ISERPD2015 Kyoto). 21st-24th June, 2015 at Kyoto International Conference Center (京都府京都市).

5) Kawaguchi H, Tanimoto A. Development of Diabetes Mellitus Model in Novel Microminipig. The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease. 14th March, 2015 at TKP Garden City Shinagawa (東京都).

6) 池堂智信、平田勝也、帆保誠二、谷本昭英、川口博明、野口倫子. プロピオン酸エストラジオールを用いたマイクロミニピッグの偽妊娠誘起. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9～12. 北海道大学（北海道札幌市）

7) 平田勝也, 池堂智信, 帆保誠二, 谷本昭英, 川口博明, 野口倫子. プロスタグランジン F2αの連続投与によるマイクロミニピッグの発情周期短縮. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9～12. 北海道大学（北海道札幌市）

8) 野口倫子, 池堂智信, 平田勝也, 帆保誠二, 窪田力, 安藤貴朗, 谷本昭英, 川口博明. マイクロミニピッグの正常発情周期における生殖内分泌動態の解明. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.9

～12. 北海道大学（北海道札幌市）

9) Noguchi M, Hatazoe I, Iriki T, Miura N, Hobo S, Tanimoto A, Kawaguchi H. Effects of acupuncture treatment on stress markers in Japanese Black calves after transportation. 65th annual meeting of the European Federation of Animal Science. 25 – 29 August 2014 at Tivoli Congress Center Arni Magnussons Gade 2 (Copenhagen, Denmark).

10) 武石嘉一朗, 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 回日本衛生学会総会. 2014.5.25-27. 岡山コンベンションセンター・岡山国際交流センター（岡山県岡山市）

11) 村田大紀, 徳永暁, 田村忠士, 川口博明, 三好宣彰, 藤木誠, 中山功一, 三角一浩. ブタの脂肪組織由来間葉系幹細胞による骨軟骨再生. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013.9.20～22. 岐阜大学（岐阜県岐阜市）

12) Kawaguchi H, Yamada T, Miyoshi N, Tanimoto A. The world smallest Microminipigs: Type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease. 19-20th April, 2013 at Osaka University Nakanoshima Center (大阪府大阪市).

〔図書〕（計 0 件）
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

○出願状況（計 2 件）

名称：動物の遠隔診断システム及び動物の遠隔診断方法
発明者：川口博明
権利者：同上
種類：特許
番号：2014-159132
出願年月日：2014 年 8 月 5 日
国内外の別：国内

名称：動物の輸送ストレスを軽減する方法及びそれを用いた輸送方法
発明者：川口博明
権利者：同上
種類：特許
番号：2014-164674
出願年月日：2014 年 8 月 19 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

６．研究組織

(1)研究代表者
川口　博明（KAWAGUCHI, Hiroaki）
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：60325777

(2)研究分担者
谷本　昭英（TANIMOTO, Akihide）
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号： 10217151

三好　宣彰（MIYOSHI, Noriaki）
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号：80229905

三浦　直樹（MIIURA, Naoki）
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号：80508036

(3)連携研究者
泉　康雄（IZUMI, Yasukatsu）
大阪市立大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授
研究者番号：10347495

(4)研究協力者
該当なし