

令和元年6月24日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08023

研究課題名(和文) マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いた葉酸欠乏による梗塞促進の機序解明

研究課題名(英文) Development of infarction model induced by folic acid deficiency using a Microminipig atherosclerosis model

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々の開発した食餌制御(8週間の高脂肪・高コレステロール食)によるマイクロミニピッグ動脈硬化症モデルをもとに、さらにヒトの生活習慣に起因する葉酸欠乏を負荷し、心筋梗塞・脳梗塞モデルを開発するため、葉酸低容量高カロリー食飼料給餌および高脂肪・高コレステロール食給餌(HFCD)+メトトレキサート(MTX、葉酸代謝拮抗薬)投与負荷の2つを検討した結果、HFCD+MTX投与で高ホモシステイン血症および低葉酸血症を誘発し、そして動脈硬化病変を増悪したが、梗塞病変は誘発できなかった。心筋梗塞・脳梗塞モデルミニブタの開発およびMTX投与で動脈硬化病変を増悪する機序の解明は今後も検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の死因の上位を占める心筋梗塞および脳梗塞の主因は動脈硬化である。我々のヒトの生活習慣に準じた食餌制御性マイクロミニピッグ動脈硬化症モデルに、さらにヒトの生活習慣に起因する負荷を加え、梗塞を促進するモデルを開発することは、病態の機序解明や疾病の克服に貢献し、社会的意義は大きい。

本研究では心筋梗塞・脳梗塞モデルの開発には至らなかったが、開発のための改善点もみえてきた。また、メトトレキサート投与を負荷することにより、動脈硬化が増悪されたことが新たに発見され、今後この機序を解明することも、梗塞モデルへの発展にもつながり、学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was development of myocardial and cerebral infarction models induced by folic acid deficiency using our atherosclerosis model induced by feeding a high fat and cholesterol diet (HFCD) for 8 weeks in Microminipigs. We investigated whether infarction was induced by the folic acid low-dosage high calorie diet feeding (FAL-HCD) and HFCD feeding with administration of methotrexate (MTX). HFCD+MTX induced hyperhomocysteinemia, hypofolate and acceleration of arteriosclerosis in aorta while FAL-HCD couldn't induce hyperhomocysteinemia and hypofolate.

Further studies are required to develop myocardial and cerebral infarction models of minipig, and to reveal the mechanism of arteriosclerosis acceleration induced by MTX.

研究分野：毒性病理学

キーワード：動脈硬化 マイクロミニピッグ ミニブタ 心筋梗塞 脳梗塞 葉酸 高ホモシステイン血症 メトトレキサート

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト疾患モデルとしてはヒトに最も近い動物であるサルを用いた実験系の構築が理想であるが、世界的な動物愛護の高まりからサル・イヌを研究に用いることは困難になってきている。一方、ブタは家畜として開発されてきた動物で、生理学的・解剖学的ヒトとの類似点が多くサル・イヌの代替動物として有望視されており、欧米ではブタの研究利用数が増加している。

我々は脂質代謝がヒトに非常に類似しているマイクロミニピッグ (MMPig) に食餌制御のみ、すなわち高脂肪高コレステロール食を8週間給餌することにより、血中総コレステロール値が700 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)にヒトに類似した粥状硬化を誘発するMMPig動脈硬化モデルを開発した。

しかし、このMMPig動脈硬化モデルでは血栓形成はほとんどみられず、比較的軽度な粥状硬化病変であった。よって、さらに、アンジオテンシンIIの静脈内持続投与あるいはNOS阻害薬(L-NAME)の2週間反復経口投与による高血圧病態を負荷することにより、動脈硬化病変を増強させることに成功したが、血栓形成はほとんどみられず、梗塞病変も起こらなかった。よって、MMPig動脈硬化モデルに新たな生活習慣に起因する負荷を加え、梗塞促進モデルを開発する課題が残った。

ヒトでは疫学調査により梗塞を促進する要因の1つとして高ホモシステイン血症が注目されている。高ホモシステイン血症が血管や血管内皮に影響する動物実験の報告はあるが、血栓や血液の性状(血小板機能や炎症性マーカー:IL6、TNF等)がより梗塞促進的に働くかなど十分に解明されていない(Fay EP, 2012)。我々は血栓形成がほとんどみられないMMPig動脈硬化モデルでは血中ホモシステイン濃度の上昇がみられないことを確認し、さらにMMPigにおけるホモシステインの単回静脈内投与後の血中動態を解析し、投与後2時間程度で血中濃度がPreと同値に戻ることで、ホモシステイン単回投与では持続的高ホモシステイン血症を誘発することは困難であることを確認した。一方、葉酸はホモシステインを無害にする働きがあり、世界79カ国で穀類の強制的葉酸添加が行われており、日本でも重要視されてきている(Chui R, 2010)。葉酸は植物性食品に多く含まれることから、西欧型の食事になることで葉酸不足になると予想される。一般的にこの葉酸が欠乏した食事あるいはメトキセレート(葉酸代謝拮抗薬:葉酸構造類似物質)投与により、高ホモシステイン血症が生じることが知られている。本課題ではMMPig動脈硬化モデルに葉酸欠乏食による負荷を加えることにより、高ホモシステイン血症を誘発し、梗塞促進モデルを開発、その梗塞を促進する機序を解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

現在、日本人の死因は循環器系疾患(脳卒中・心筋梗塞)が悪性腫瘍に次いで第2位であり、これらの克服は社会的急務である。これらの循環器系疾患の主因は動脈硬化である。脳卒中のうち動脈硬化修飾因子としての高血圧は、減塩や降圧剤などの対応法が既存する。一方、動脈硬化より波及する血栓や脳・心筋梗塞を引き起こす病態は、近年、日本において増加傾向にあるが、その対応は十分でない。我々は生理学的・解剖学的ヒトとの類似点が多いミニブタを用いて、食餌制御のみで脳底動脈、冠動脈、大動脈など全身の動脈にアテローム(粥状)硬化を誘発できるモデルの作出に成功した。本課題では、このミニブタ動脈硬化モデルを利用し、生活習慣に起因する負荷(葉酸代謝に関する負荷)をさらに加えることで動脈硬化病変から梗塞を促進するモデルを作出し、同時に梗塞を促進する機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

マイクロミニピッグを用いて以下の研究を行った。

<高ホモシステイン血症誘発モデルミニブタの開発>

(1) 葉酸低容量高カロリー食飼料による高ホモシステイン血症誘発実験

- ① 動物: 成獣雄1頭: 体重(BW) 29.8 kg
- ② 葉酸低容量高カロリー食飼料: 普通基礎飼料(3440カロリー)50%、グルコース 24.5%、カゼイン 11.5%、ラード 13.5%、コレステロール 0.5。⇒4420カロリー
- ③ 給餌期間(実験期間): 22週間
- ④ 血液検査: 脂質代謝マーカー(TG: triglyceride, T-Cho: Total cholesterol, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterolhigh)、ホモシステイン(Hcy)
- ⑤ 実験終了後、剖検および病理検査
- ⑥ 大動脈(胸部~腹部)の動脈硬化病変面積の定量化: ホルマリン固定大動脈をOil red O染色で染色し、JPEG写真を撮影する。その写真をもとに、面積を定量化するためのImage Jソフトウェア(NIH, UCS)を用いて、大動脈内腔面全域の面積を分母に赤色陽性面積(動脈硬化病変部位)の相対値・割合(%)を算出した。

(2) 葉酸欠乏飼料による高ホモシステイン血症誘発実験

葉酸欠乏飼料を低価格で製作できなかったため、実験できなかった。

<梗塞促進モデルミニブタの開発>

(3) 高脂肪食+メトトレキサート投与負荷実験

- ① 動物：成獣雄 4 頭：体重 22.6 ± 10.1 kg (平均値 \pm 標準偏差)
- ② 群編成：高脂肪高コレステロール食群 (high fat and cholesterol diet: HFCD group) および HFCD + メトトレキサート投与群 (HFCD+MTX group) の 2 群に均等に分けた。
- ③ 給餌期間 (実験期間)：2 週間
- ④ 血液検査：脂質代謝マーカー (TG, T-Cho, HDL-C, LDL-C)、ホモシステイン (Hey)、葉酸
- ⑤ 実験終了後、剖検および病理検査
- ⑥ 大動脈 (胸部～腹部) の動脈硬化病変面積の定量化：(1) 前述同様。

<その他>

(4) 削蹄のいらないミニブタ用特殊床材の開発

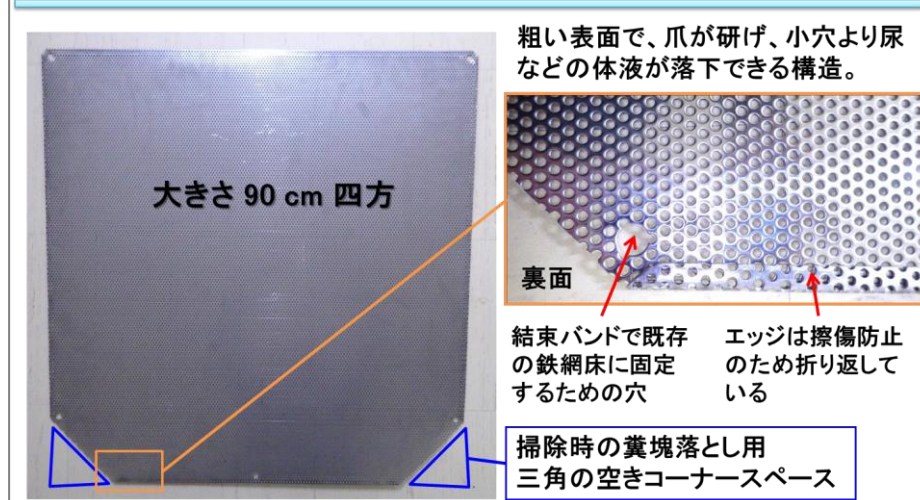
【緒言】近年、動物福祉および倫理の世界的な高まりにより、人に近い高等動物である霊長類や愛玩動物であるイヌを用いた動物実験実施は困難な時代を迎えている。このような情勢の中、欧州ではイヌ・サルの代替動物としてブタの研究利用が増加し、両動物の使用数を超えている。実験用ミニブタは専用ケージで飼養管理され、その床材は樹脂でコーティングされた鉄網や鉄格子が用いられることが多く、このような軟らかい床材では、ミニブタは蹄を研ぐことができず、過長となり、変形や損傷を引き起こし、さらには跛行および関節症へ進行する。時に、蹄が格子の網に挟まり、四肢の骨折などの事故も起こりうる (図 1)。我々はミニブタの慢性実験中、動物が蹄を自ら研ぐことで、正常な起立・歩行、QOL を維持し、なおかつ軟部組織を傷つけないような構造・材質の特殊床材を開発した。

図1. 事故例：従来の床材(樹脂と鉄格子)で飼育中に肘関節脱臼発生



【材料と方法】成獣マイクロミニピッグ 4 頭 (雌雄、体重 10 kg 以上) を特殊床材設置ケージで 1 年間飼養した。特殊床材は多数の貫通孔を有するステンレス板で、表面にはその孔縁に突出部を設け、粗に仕上げた (孔の数：4~6 個/cm²、穴の大きさ：直径 3 mm 程度、特許出願)。その粗な表面で、動物は自ら蹄を研磨できる構造になっている (図 2)。

図2. 削蹄のいらないミニブタ用特殊床材の開発



4. 研究成果

<高ホモシステイン血症誘発モデルミニブタの開発>

(1) 葉酸低容量高カロリー食飼料による高ホモシステイン血症誘発実験 (Table 1)

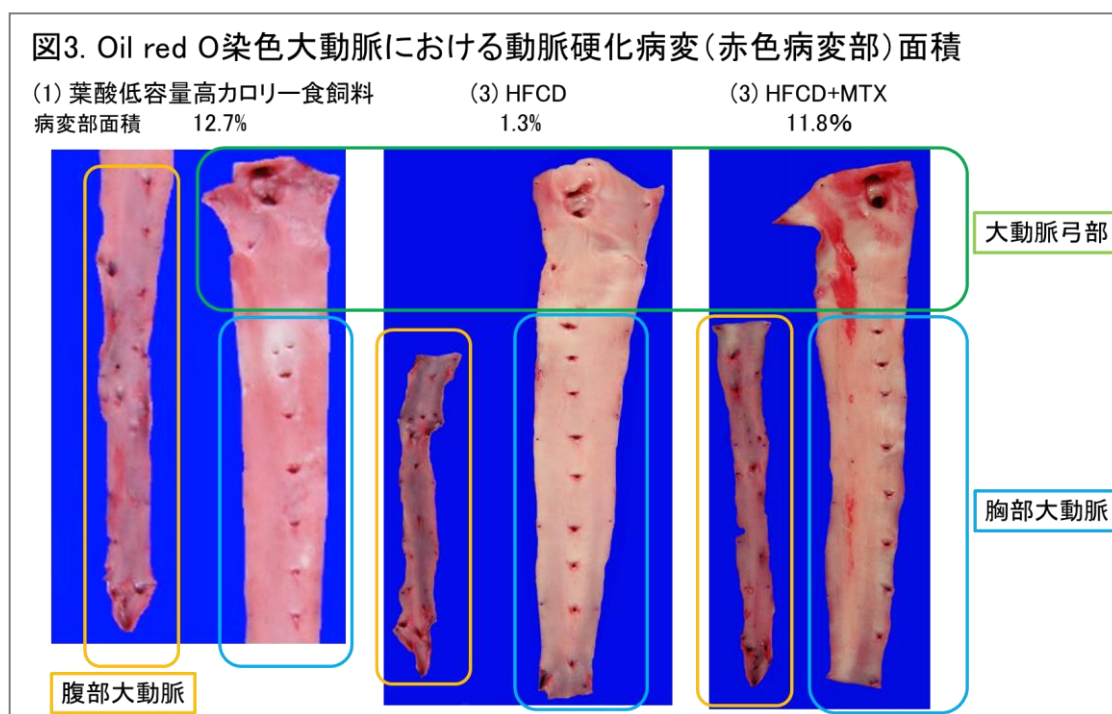
22週間の観察で、顕著な体重増加、高コレステロール血症 (177~277 mg/dL) を誘発できたが、高ホモシステイン血症は軽度で (1.2 倍の増加)、大動脈の動脈硬化病変 (図 3) も比較的軽度であった。明らかな梗塞性病変はみられなかった。

Table 1. (1) 葉酸低容量高カロリー食飼料による高ホモシステイン血症誘発実験の結果

項目	Raw data
BW gain* (%)	184.6
TG gain** (%)	93.8
T-Cho gain** (%)	290.2
HDL-C gain** (%)	350.0
LDL-C gain** (%)	237.5
Hcy gain* (%)	121.0
Oil red O 染色における動脈硬化病変面積 (%)	12.7

* gain means post data gain compared to pre data.

** gain means data gain at 8 weeks compared to pre data.



(2) 葉酸欠乏飼料による高ホモシステイン血症誘発実験：一

<梗塞促進モデルミニブタの開発>

(3) 高脂肪食+メトトレキサート投与負荷実験 (Table 2)

両群とも高コレステロール血症を誘発できたが、HFCD+MTX 群の方が T-Cho および LDL-C の増加率が高く、HDL-C の増加率が低かった。MTX 投与により、Hcy の増加率が高くなり、葉酸の増加率は低下した。病理検査では、動脈硬化病変の面積が MTX で高くなった (図 3)。

以上より、高脂肪高コレステロール食にメトトレキサートを追加投与することにより、高コレステロール血症は増悪する。さらに、高ホモシステイン血症および低葉酸血症も誘発し、これらの結果として、動脈硬化病変の増悪がみられた。

Table 2. (3) 高脂肪食+メトトレキサート投与負荷実験の結果

	HFCD group	HFCD+MTX group
BW gain* (%)	108.9	113.2
TG gain (%)	116.5	184.2 ↑
T-Cho gain (%)	586.8	767.2 ↑
HDL-C gain (%)	460.8	269.4 ↓
LDL-C gain (%)	649.4	1029.6 ↑
Hcy gain (%)	130.0	282.7 ↑
葉酸gain (%)	182.2	84.0 ↓
Oil red O 染色における 動脈硬化病変面積 (%)	4.1	10.1 ↑

* gain means post data gain compared to pre data.

↑ ↓ compared to HFCD group

<その他>

(4) 削蹄のいらぬミニブタ用床材の開発

ミニブタが長くなった蹄を自己研磨することにより、適切な長さの蹄に自己修復した(図3)。さらに、その適切な状態を持続し、実験者が削蹄する必要がなくなった。また、本床材は長期間設置しても製品に損傷は発生せず、耐久性に優れていた。

<削蹄のいらぬミニブタ用本床材の利点>

- ① 削蹄や爪研ぎの作業が不要
削蹄や爪研ぎの作業は、される側(動物)、する側(飼育者)、双方にとって大変な作業・ストレスである。本床材は、そのストレスから回避できる。
- ② 自己研磨によるストレス解消の可能性
本来、蹄や爪が伸びる動物は自己研磨の習性があり、それができないことは動物にとってはストレスであろう。本床材は、そのストレスから回避し、QOLを維持できる。
- ③ 設置が簡便な床材
既存の床材(鉄網)に結束バンドで固定するだけで、簡単に設置が可能。

図4. (4)削蹄のいらぬミニブタ用床材例:蹄の長さの経時的变化
➤ 14ケージに本床材を設置し、2年間トラブルなし。

	床材設置前	設置後1週目	設置後2週目	設置後3週目
蹄の長さ	6.1cm(過長)	3.4cm	2.9cm	2.8cm
蹄の研げた長さ	—	2.7cm	0.5cm	0.1cm



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Zahorul Islam M, Kawaguchi H (equal contribution), 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*. *Microvasc Res* 114:52-57, 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 川口博明. 削蹄不要ミニブタ床材. (ポスター商業展示) 2018.10.18-19. 第6回日本先進医工学ブタ研究会. 東レ総合研修センター(静岡県三島市末広町21-9)
- ② 川口博明. 削蹄不要ミニブタ床材. (ポスター商業展示) 2018.10.01-06. 第52回日本実験動物技術者協会総会. 熊本市国際流会館(熊本市中央区花畑町4-18)
- ③ 川口博明, 秋岡幸兵, 阿部正治, 牛飼美晴, 松尾 恵, 堀内正久, 谷本昭英. 削蹄のいらないミニブタ用床材の開発. 第35回九州実験動物研究会総会/第37回日本実験動物技術者協会研究発表会. 2017.11.11-12. 指宿ベイヒルズ HOTEL & SPA (鹿児島県指宿市東方5000番地)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 動物用床材
発明者: 川口 博明
権利者: 鹿児島大学
種類:
番号: 2017-025519
出願年: 2017
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 谷本 昭英

ローマ字氏名: Akihide Tanimoto

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 医歯学域医学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10217151

研究分担者氏名: 堀内 正久

ローマ字氏名: Masahisa Horiuchi

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 医歯学域医学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50264403

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 福島 昭二

ローマ字氏名: Syouji Fukushima

研究協力者氏名: 叶内 宏明

ローマ字氏名: Hiroaki Kanouchi