

Breeding of a Rabbit Strain of Hyperlipidemia and Characteristic of These Strain

Yoshio WATANABE*, Takashi ITO* and Teruo KONDO**

*Experimental Animal Laboratory, **Departments of Medico-Biophysics,
Kobe University School of Medicine, Kusunoki-cho, Ikuta-ku, Kobe, Japan.

(Received for publication : February 10, 1976)

We attempted the breeding experiment in order to establish an inbred strain of disease model animal derived from a spontaneously hyperlipidemic rabbit (HLR). The clinical, pathological features and breeding results of HLR strain were as follows ; 1) A prominent clinical feature of this strain was conspicuous elevation of serous lipid ingredients including cholesterol (S-ch), β -lipoprotein (β -LP). The S-ch level was 400 ± 70 mg/dl, the β -LP level 9.1 ± 1.5 unit and the total lipid 1146 ± 270 mg/dl in the HLR strain. These values were approximately 9, 10 and 4 times higher than those of normal rabbits respectively. 2) After sacrifice, atherosclerotic lesions were evident extensively in the aorta and renal arteries. Nodular or plane xanthomas were conspicuous over the articuli digitorum of manus and pedis. 3) HLR strain indicated a striking resemblance of the condition to type III hyperlipidemia in the Fredrickson's classification of hyperlipidemia in man. 4) Inbreeding was carried out in two lines, viz. sister-brother mating, parent-offspring mating and back crossing. As the result, the second filial generation showed an incidence of HLR of 15.0%, the third generation 50.0%, and the fourth generation 56.1% respectively. In the fourth generation, the coefficients of inbreeding and relationship were 50% and 72.3% respectively.

自然発症高脂血ウサギの育種と性状

渡辺嘉雄*・伊藤 隆*・近藤光雄**

*神戸大学医学部附属動物実験施設 **放射線基礎医学教室

日本白色種雄ウサギにおいて給餌法と血清総コレステロール (S-ch) 値の関係を観察中に [14], 血清脂質成分の異常高値を示した1羽のウサギを発見した。このウサギは入手時 (推定3ヶ月令) より殺処分時 (約32ヶ月令) まで, S-ch 値は 215~450mg/dl, β リポ蛋白 (β -Lp) は 9.4~10.6unit, 総脂質は 1102~3011mg/dl の異常な高値を持続した。またリポ蛋白の電気泳動所見では β -Lp の濃染, pre- β の増加が認められた [8]。剖検所見では大動脈, 心冠動脈, 腎動脈, 脳の細動脈等に

粥状硬化変性が, 腱, 指関節部に著明な黄色腫が認められた。このような性状はヒトの高脂血症に著しく類似するものであった。

ウサギにおける自然発症高脂血あるいは動脈の粥状硬化症の症例報告は多いが [1, 2, 5, 6, 9, 10, 12], いずれも系統開発に至っていない。われわれはヒトの疾患モデル動物としての系統開発を目的として, この1羽の自然発症高脂血雄ウサギを原種畜として近親交配を重ねた結果, 系統としての基礎がほぼ確立されたものと考えら

れたので、この HLR strain の育種成績、臨床ならびに剖検所見とヒトの高脂血症との類似性等について報告する。

材料および方法

研究に使用したウサギは本学動物実験施設内で系統繁殖を行なっている日本白色種である。給与飼料はすべて固型飼料 ORC-5 (オリエンタル酵母製) を用い、成熟ウサギでは出産前後約 70 日間 (出産前 20 日, 出産後 50 日), 未成熟ウサギでは成熟時までいずれも *ad. libitum* に給与した。その他の時期には日量約 100 g を給与し、水はいずれも自由摂取せしめた。飼育室温は 22 ± 2°C に保ち、ケージはセキスイコンテナ BK-80 (450×650×300) を使用し、床敷は木綿を使用した。

採血は耳翼周縁静脈ならびに耳殻中心動脈から午前 9 時から 11 時の間に行なった。血液は約 0.6ml 採取し直ちに血清を分離して S-ch と血糖の測定に用いた。S-ch と血糖は Raba (京都第一科学) で分析した。また 24 項目の血清化学成分の測定には約 6.0ml を採血し血清は日本医学研究所 (茨木市) で Auto chemist (AGA AB Sweden) で分析した [8]。

血圧は耳介内部に円筒状 adapter のをそう入し、耳根部にマンシュートを、耳殻中心動脈に脈波検出器をセットし、加圧後徐々に減圧して最初に出現した脈波が脈波増中記録計に記録された時のマンメーターの値を読んで最高血圧とした。

動脈の組織学的検索は凍結切片を作り Sudan III あるいは Azan-Mallory 染色を行って調べた。

成 績

1) 育種成績

1 羽の自然発症高脂血症雄ウサギ (HLR-P) を原種畜として 10 羽の正常ウサギと交配し、これら 10 羽の正常雌ウサギのうちの 04, 02 の産仔 (F₁) を選抜して系統繁殖に着手した (以下 04 line, 02 line という)。04 line では親仔交配 (Parent-offspring mating 以下 P-off mating という) によって 0414 (F₂, 雄) を (図 1), また 02 line では兄妹交配 (Sib mating という) によって 0214 (F₂, 雌) を得た (0214 は図 2 の 0211 と同腹の産仔である)。この 2 羽の S-ch 値は離乳時からそれぞれ 20ヶ月令, 16ヶ月令の現在まで 418 ~ 320mg/dl, 434 ~ 287mg/dl の異常な高値を持続した。また β-

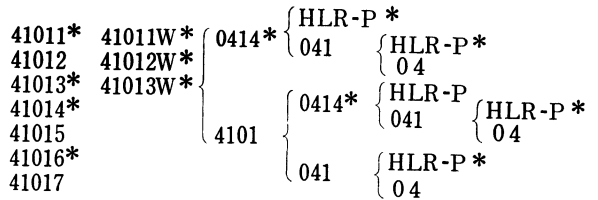
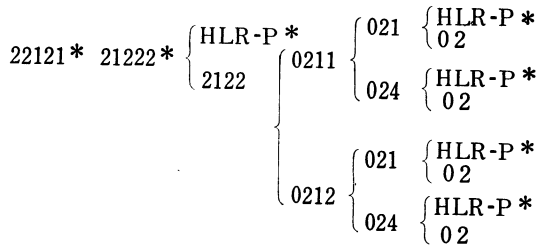


Fig. 1 Pedigree of 04 line in HLR strain



* : Hyperlipemic rabbit

Fig. 2 Pedigree of 02 line in HLR strain

Lp, 総脂質においてもそれぞれ 9.6 unit, 8.8 unit, 830 mg/dl, 1459 mg/dl の高値を持続し、原種畜である HLR-P の血清脂質成分と同様に高い値を示した。

この 0414, 0214 と HLR-P の 3 羽を中心として 04 line では P-off mating と Back crossing の交配方法を、また 02 line では Sib mating と Back crossing の交配をそれぞれ主体とし、あるいはそれらを混用した近親交配を行なった。その結果表 1 に示したように F₄ までの高脂血症ウサギ (HLR) の出現率は、世代別では、F₁ には出現しなかったが、F₂ においては 15%, F₃ では 50%, F₄ では 57.1% と近交世代を重ねる毎に上昇した。また交配方法別では Back Crossing に

Tab. 1 Incidence of HLR at the different mating system and each generation

Mating system	Generation				
	F 1	F 2	F 3	F 4	Total
P-off mating	—	28.5% (2/7)	42.9% (3/7)	60.0% (6/10)	45.8% (11/24)
Sib mating	—	7.6% (1/13)	13.0% (3/23)	—	11.1% (4/36)
Back crossing	—	—	90.9% (20/22)	50.0% (2/4)	84.6% (22/26)
Total		15.0% (3/20)	50.0% (26/52)	57.1% (8/14)	43.0% (37/86)

Tab. 2 Breeding record of HLR strain

Generation	Birth rate	Litter size	Weanling rate	Growth rate
F 1	50 % (5/10)	6.6 (33/5)	47 % (15/33)	93 % (14/15)
F 2	67 % (6/9)	7.3 (44/6)	45 % (20/44)	90 % (18/20)
F 3	65 % (15/23)	5.8 (87/15)	60 % (52/87)	89 % (33/37)*
F 4	45 % (5/11)	3.6 (18/5)	78 % (14/18)	86 % (6/7)**

Birth rate : No. of parturition/No. of mating

Weanling rate : No. of weanling/No. of new born

Growth rate : No. of maturation/No. of weanling

* : 15 animals and **7 animals were immature at the time of recording

よる場合 84.6%で最も高率に出現し、Sib mating では 11.1%の出現率で最も低率であった。さらに交配結果を表現型別にみると HLR×HLR では 100% (12/12) HLR が出現し、HLR×NON-HLR (高脂血非発症ウサギ) では約 49% (23/47), NON-HLR×NON-HLR では約 11% (3/27) の出現率であった。

つぎに 04 line と 02 line の系図の 1 例を図 1, 2 に示した。図 1 は 04 line における P-off mating を 3 世代継続した例であり、図 2 は 02 line における Sib mating と Back crossing の混用例である。04 line の P-off mating の系図から近交係数、血縁係数を算出した結果、それぞれ、50%, 76.3%であった。

表 2 に HLR strain の F₁ から F₄ までの繁殖成績を示した。表にみられるように各世代を通じて離乳率の低いのは母畜による産仔の喰殺が原因で、喰殺以外の原因不明の死亡は 2 例にすぎなかった。離乳率、育成率は近交世代の進行によって低下するという現象はみられなかったが、出産率、litter size は F₄ を生産する段階で低下を示した。またこの間に F₃ と F₄ において 2 例ずつの奇型 (splay leg) と F₂ において 1 例の受胎不能雌がみられ、さらに飼育場所の変更すなわち環境変化によるものと推定される急死例が 3 例みられた (剖検上肺炎と診断)。

2) 臨床所見

血清脂質成分：離乳時 (約 1 ヶ月令) から成熟時 (約 5 ヶ月令, 体重約 2.5kg), さらに成熟後における S-ch 値の変動を HLR と正常ウサギについて調べた結果を図 3 に示した。図にみられるように両群とも離乳時以降成

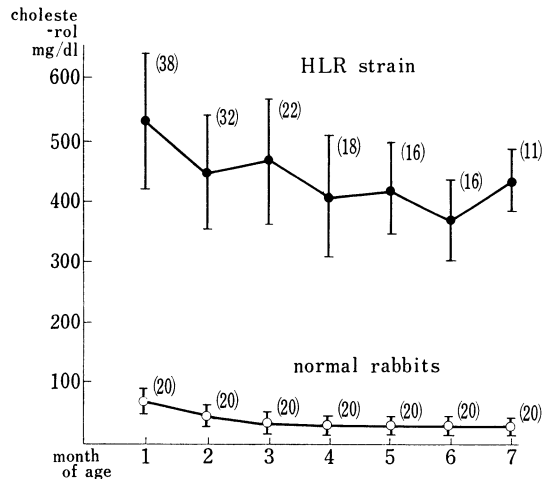


Fig. 3 Serum cholesterol levels of HLR strain and normal rabbits

熟に至るまで加齢に伴って S-ch 値の低下する傾向がみられた。しかしながら HLR では異常高値の範囲内での変動であり、成熟後も異常高値を持続し、その値は正常ウサギのほぼ 10 倍の高値を示した。また β -Lp, 総脂質においても HLR は正常ウサギに比較してそれぞれ約 10 倍、約 5 倍の高値を示した (表 3)。

血糖値：5～6 ヶ月令における血糖値は HLR では $119 \pm 15 \text{mg/dl}$ で正常ウサギの $132 \pm 31 \text{mg/dl}$ に比較して若干低い値を示し、HLR strain は糖尿病型の糖代謝異常は認められなかった (表 3)。

尿酸値：5～6 ヶ月令における HLR の尿酸値 $0.1 \pm 0.05 \text{mg/dl}$ は正常ウサギの尿酸値 $0.4 \pm 0.3 \text{mg/dl}$ に

Tab. 3 Biochemical finding in sera and Highest blood pressure of HLR strain and Normal rabbits

Group	Age (month)	Cholesterol mg/dl	β -lipo protein unit	Total lipid mg/dl	Glucose mg/dl	Uric acid mg/dl	Highest blood pressure mmHg
HLR strain	5-6	400 \pm 70* (16)	9.1 \pm 1.5 (10)	1146 \pm 270 (10)	119 \pm 15 (17)	0.1 \pm 0.05 (10)	103 \pm 11 (10)
Normal rabbits	5-6	49 \pm 20 (20)	0.8 \pm 0.4 (10)	270 \pm 62 (10)	132 \pm 31 (23)	0.4 \pm 0.3 (10)	88 \pm 17 (15)

*: mean \pm SD, No. of animals are shown in parenthesis

比較して低く、HLR strain には高尿酸血症も認められなかった(表3)。

最高血圧: 高脂血症の場合、動脈壁の脂質沈着に起因する血圧の変化が考えられるので、成熟ウサギの耳殻中心動脈の最高血圧を測定した。その結果を表3に示した。HLR strain では103 \pm 11mmHg, 正常ウサギでは88 \pm 17mmHgでHLR strain は正常ウサギに比較して高い血圧を示した。

その他の主要な臨床所見としてHLR-Pで約30ヶ月令において左右耳殻中心動脈の肥厚硬化が認められ、またF₃の4104では眼球に顕著な脂質沈着が認められた。

3) 剖検所見

原種畜であるHLR-P(約32ヶ月令)とF₃である2145b(2週令), 2144(3ヶ月令), 4112(6ヶ月令), 4102(7ヶ月令)の5羽のHLRを剖検した結果、この5例のいずれにも大動脈内膜が肥厚し、硬化板(plaque)の形成がみられた。これは組織学的に典型的な粥

状硬化症(Atherosclerosis)で内膜の結合組織が増生し、内膜深層に粥腫(Atherom)があり多量の脂肪沈着、軽度の石灰沈着およびコレステリンの沈着が認められた。とくにHLR-PにおけるAtheromは大動脈以外に腎動脈、冠状動脈、脳の細動脈あるいは肋間、腹腔、腸間膜の各動脈に著明であった(図4)。

つぎに黄色腫(Xanthoma)はHLR-Pで著明で図5に示したような扁平あるいは結節性のXanthomaが前後肢の指関節部の背側、掌側に、さらに肘関節部、アキレス腱にも多発した。

考 察

一般にウサギの近交系の作出は近交世代の進行とともに種々の繁殖障害が発生しlitter sizeが減少し、疾病、感染症に対する感受性が高まり死亡率の増加、虚弱産仔の増加等の系統育成上の障害が発生し近交系の作出は極めて困難とされている[13]。したがってMouse, Ratのように血縁係数が99.6%を超えたものを近交系と称するというような国際的な規定はウサギを含む他の実験動物では確立されていない。ニワトリではアメリカの畜産学会の委員会で近交係数が37.5%に達したものを近交系と称することとし[11]、またわが国では近藤は[7] Mouse, Rat以外の実験動物の場合、実験動物の本質から系統内の血縁係数が80%以上のものを近交系と規定すべきであると提唱している。

HLR strainの育種に当たっては、とくに高脂血症という疾病因子の固定を目的としているので相当の困難が予測された。したがって当初からSib matingとBack crossingを行なうO2 lineと、P-off matingとBack

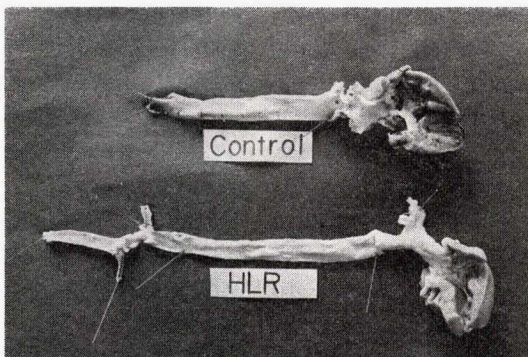


Fig. 4 Atheromasia of HLR-P (30month age)

Tab. 4 Comparision of the conditions of hyperlipidemia between Human and HLR strain

Fredrickson type	I	II	III	IV	V	HLR strain
Chylomicron	+	-	-	-	+	-
hypercholesteremia	-	+	+	-	-	+
Atherom	-	+	+	+	-	+
Xanthoma						
eruptive type	+	-	+	±	±	±
tuberous type	-	+	+	-	-	+
planar type	-	+	+	-	-	+
Electrophoretic pattern of lipo-protein	origin* stain	β pre β stain	pre β β stain	pre β stain	Pre β origin stain	β pre β stain
Inheritance mode	rece.**	domi.***	rece.	domi.	rece.	rece.
Abnormalities in carbohydrate metabolism	-	-	+	+	+	-
Hyperuicacidemia	-	+	±	±	±	-
Hypertension	-	-	+	-	-	+

* : original line ** : recessive *** : dominant

crossing を行なう 04 line を設定した。その結果 04 line で近交係数、血縁係数はそれぞれ、50%、76.3% となって系統としての基礎がほぼ確立された。しかしながら F_4 を生産するに当って出産率の低下、litter size の低下あるいは少数例ではあるが奇型、不妊ウサギ、抗病性が懸念される急死例等がみられ系統育成上若干の障害が現われた。したがって今後は近交世代の進行は試みるのが、主として実用的な観点から HLR の出現率 (F_3 , F_4 において53%)、あるいは F_4 における近交係数、血縁係数を考慮して、Colony の拡大を計り医学実験への供給態勢を整えたいと考えている。

つぎにヒトの高脂血症は Fredrickson [3, 4] によって5つの type に分類されているので、Fredrickson type によるヒトの高脂血症と HLR strain の類似性について比較検討する(表4)。

1) 血清性状: Fredrickson type (以下 F type という) I, V では血清中のカイロマイクロンによって静置血清にクリーム状浮上層が認められ、血清蛋白の電気泳動では泳動図原点が濃染されるといわれている。また type IV では血清中の中性脂肪は増加するがコレステロールの著明な増加はないといわれている。HLR strain では静置血清は若干白濁するが、クリーム状浮上層は認

められず、電気泳動図原点の濃染も認められなかった。また S-ch 値は異常な高値を示した。したがって血清性状は F type I, IV, V とは異なり、カイロマイクロンが存在せず、S-ch 値も顕著な高値を示すといわれている type II, III に類似した。

2) 血糖の代謝異常: F type I, II を除いた各 type で多少なりとも血糖の代謝異常が認められ、とくに type IV では90%の患者に糖尿病型の高血糖が認められている。HLR strain では高血糖は認められなかったので F type I, II のに類似した。

3) 高尿酸血症: F type では II 型に多発し、III, IV, V 型ではときに発生する程度であるといわれている。HLR strain は高尿酸血症を伴わないので type II とは類似しなかった。

4) 高血圧: F type III では高血圧がみられるといわれている。HLR strain でも正常ウサギに比較して若干高血圧を示したので type III と類似した。

5) 遺伝様式: F type II, IV は優先遺伝を示し、I, III, V は劣性遺伝を示すといわれている。HLR strain は劣性遺伝を示すので [8] F type I, III, V に類似した。

6) Atherom の発現状況: 動脈の Atherom は F

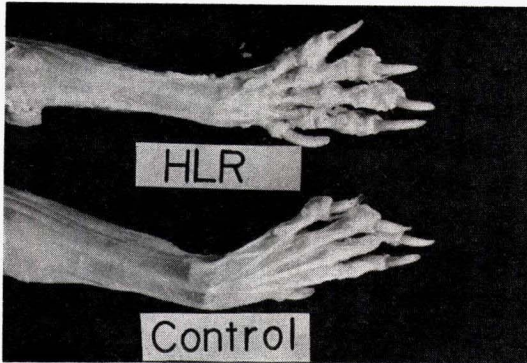


Fig. 5 Xanthoma of the articuli digitorm of manus of HLR-P (30 month age)

type II, III, IV に発現するがとくに II, III 型での発現頻度が高く大動脈, 腎動脈, 冠状動脈, 脳底動脈等に発現するといわれている。HLR strain においては大動脈の Atherom が剖検した5例全例に認められ, また HLR-P では腎動脈, 冠状動脈, 脳の細動脈にも発現した。したがって Atherom の発現状況からは, HLR strain は F type II, III によく類似した。

7) Xanthoma の性状: Xanthoma は F type のいずれにも発現するが, type II, III では扁平あるいは結節性のものが多いといわれている。HLR-P でも図5に示したように扁平あるいは結節性のものが発現したことから Xanthoma の性状は Ftype II, III に類似した。

8) その他の所見: F type I, V では網膜脂血症が発現し, type II では皮膚, 腱, 眼球等の脂質沈着が特徴的にみられるといわれている。HLR strain では眼球の脂質沈着が1例観察され type II との類似が考えられた。

以上 Fredrickson によって分類されたヒトの高脂血のI型からV型までの各型の症状と HLR strain の諸症状とを比較検討した結果, 血清性状, Atherom, Xanthoma の発現状況, 遺伝様式等から HLR strain は比較的 Fredrickson type のIII型に類似するものであると考えられた。したがって HLR strain はヒトの高脂血症のIII型の疾患モデル動物となり得るものと考えられる。

要 約

1羽の自然発症高脂血ウサギを原種畜として近親繁殖を重ね次のような成績を得た。

1) 親仔交配, 兄妹交配あるいは戻し交配による高脂血症ウサギの出現率は F_3 で50%, F_4 で57.1%に達し, また F_4 の04 line における近交係数, 血縁係数はそれぞれ50%, 76.3%に達した。

2) この高脂血症ウサギの系統すなわち HLR strain の特性は血清コレステロール, β リポ蛋白, 総脂質が異常な高値を示し, 正常ウサギに比較してそれぞれ約10倍, 約9倍, 約5倍の高値を示すこと。また高尿酸血症, 高血糖症は認められなかったが若干高血圧を示すこと, さらに動脈に顕著な Atherom が発現し, また指関節部に Xanthoma の発生が認められること等である。

3) ヒトの高脂血症の分類である Fredrickson の5つの type と比較して HLR strain は血清性状, 遺伝様式, Atherom, Xanthoma の発現状況等から Fredrickson の III 型に比較的類似しているものと判断された。

本報告の要旨の一部は第9回, 第10回の日本実験動物研究会ならびに第23回日本実験動物談話会にて報告した。なおこの研究の一部は文部省科学研究費(特定研究「実験動物の純化と開発」課題番号022201)の援助によるものである。つぎに本研究に御協力頂いた麻布獣医科大学中村経紀教授, 二宮博義講師に謝意を表する。

文 献

- [1] Bragdon, J. H. (1952). Spontaneous Atherosclerosis in the rabbit. *Circulation*, 5, 641-648.
- [2] Feigenbaum, A. S. and Gaman, E. M. (1967). Influence of mother's milk on incidence of spontaneous aortic lesion in weanling rabbits.
- [3] Fredrickson, D. S. and Lees, R. S. (1965). A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation*, 31, 321-327.
- [4] Fredrickson, D. S. Levy, R. I. and Lees, R. S. (1967). Fat transport in lipoproteins an Integrated Approach to mecanisums and Disorders. *New Engl. J. Med.*, 276, 34-44, 94-103, 148-156, 215-225, 278-281.
- [5] Kesten, H. D. (k 935). Early incidence of spontaneous medial degeneration in the

- aorta of the rabbit. Arch. Pathol., 20, 1-8.
- [6] Kobernick, S. D. and Hashimoto, Y. (1963). Histochemistry of Atherosclerosis. Lab. Inves. 12, 685-696.
- [7] 近藤恭司(1969). 実験動物学総論, 田島嘉雄編, 朝倉書店, 東京, 73.
- [8] Kondo, T., Watanabe, Y. (1975). A genetic hyper lipemic rabbits. Exper. Anim. 24, 89-94.
- [9] Levin, I. and Larkin, J. H. (1910). Spontaneous lesion in the rabbit. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 7, 109-110.
- [10] Muzum, F. R., Elliot, A. H. and Evans, R. D. (1930). The occurrence and nature of spontaneous arteriosclerosis and nephritis in the rabbit. Arch. Path. 10, 679.
- [11] 内藤元男 (1970). 新編家畜育種学, 養賢堂, 東京, 93.
- [12] Ophuls, W. (1907). Spontaneous arteriosclerosis of aorta in a rabbit. J. Amer. Med. Ass., 48, 326.
- [13] 鈴木 潔 (1972). 実験動物学各論, 田島嘉雄編, 朝倉書店, 東京, 77-30.
- [14] 渡辺嘉雄・中村経紀(1975). 家兔の異なる給餌法における血清コレステロール値, 麻布獣医大研究報告, 30, 141-145.