

特集

医療に役立つ実験用ウサギの展望
—その1—高脂血症・動脈硬化に関する研究における
WHHLウサギを用いた研究の貢献塩見 雅志, 伊藤 隆
神戸大学医学部附属動物実験施設

はじめに

動物実験に反対する人々は、動物実験は医学の発展に寄与しておらず、人類の幸福に逆行する、旨の主張を展開している。動物実験を実施している研究者はこのような疑問（誤解）に対して適切に説明することが動物実験の必要性について一般市民（動物権活動家を除く）の理解を得るためには重要である。そのためには、動物実験の結果がヒトに外挿できることを例示することが重要である。すなわち、研究目的を達成するためにはどの動物種あるいは系統が適しているかを慎重に検討する必要がある。この点に着目すると、高脂血症とそれが原因する動脈硬化の研究には実験動物の代表であるマウス・ラット類よりウサギの方が適している。その理由は、ヒトの生体内における脂質代謝はマウス・ラット類と大きく異なるが、ウサギとは類似していることに由来する¹⁾。著者らは、ヒト高コレステロール血症のモデル動物であるWHHLウサギ²⁾を用いて、脂質低下剤/動脈硬化抑制剤の開発に関与してきた³⁻⁸⁾。その薬剤は日本が世界に先駆けて開発したコレステロール合成阻害剤（スタチンと総称）であり、スタチン系薬剤は複数の大規模臨床試験において心臓疾患あるいは脳血管疾患による死亡率を低下させることが認められている。日本では高コレステロール血症と診断される患者は約2000万人、要治療域

にある患者は約900万人と推定されており、スタチン系薬剤は、脂質低下剤服用者の80%以上に投与されている⁹⁾。2000年における服用者数は日本国内で200万人余、欧米諸国と合算すると約2000万人と推計され、2010年には2倍になると予測されている⁹⁾。スタチン系薬剤の開発に関与した著者らの研究を、ウサギを用いた研究が人類の健康に貢献してきた一例として紹介したい。

1. WHHLウサギの特性

WHHLウサギは、高コレステロール血症を示し、その原因は血中のコレステロール運搬体である低比重リポタンパク（LDL）を細胞内に取り込むためのLDL受容体の遺伝子の異常（12塩基対の欠失）により血中にLDLが蓄積することによる²⁾。血中にLDLが蓄積する病態はヒトの高コレステロール血症に類似している。この高コレステロール血症が原因して大動脈や冠動脈などに動脈硬化が自然発生するが、WHHLウサギの動脈硬化病変はヒトの高脂血症に由来する動脈硬化の組織像に類似している²⁾。また、近年の選抜交配によって心筋梗塞を自然発症するウサギ（WHHLMIウサギ）に改良されている（*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, in press）。これらの所見はヒトの家族性高コレステロール血症にきわめて類似している。さらに、高インスリン血症、内臓脂質の蓄積、脳動脈硬化、

表1 脂質代謝におけるヒト, マウス, WHHLウサギの異同¹⁾

	マウスモデル	ヒト	WHHL ウサギ
血中の主要リポタンパク	HDL or VLDL	LDL	LDL
VLDL 中の apoB	apoB-48 & apoB-100	apoB-100	apoB-100
ApoB Editing 酵素	小腸 & 肝	小腸	小腸
コレステロールエステル転送タンパク	なし	あり	あり
肝性リパーゼ	血中へ遊離	細胞膜結合	細胞膜結合
動脈硬化の発生	困難 (一部で自然発症)	自然発症	自然発症
スタチンの作用	無変化 or 上昇	脂質低下	脂質低下

皮膚黄色腫も認められ、脂質代謝異常や動脈硬化等に関する研究およびこれら疾患の治療に関する研究（薬剤や遺伝子治療等）に用いられている。

2. 脂質代謝・動脈硬化に関するヒト, マウス・ラット, ウサギの異同

脂質代謝と動脈硬化に関する動物種間の異同を表1に示す。脂質代謝に関係する主要な酵素（apoB editing 酵素, コレステロールエステル転送タンパク, 肝性リパーゼ等）の作用はヒトとマウス・ラットでは大きく異なっており、その結果、血中のリポタンパク（血中で脂質を運搬するタンパク質）のプロファイルが大きく異なっている。すなわち、ヒトではLDLが主要なリポタンパクであるが、一般のマウス・ラット類では高比重リポタンパク（HDL）、遺伝子操作動物ではHDLと超低比重リポタンパク（VLDL）の割合が高く、肝から分泌されるVLDLもヒトと異なり2種類ある。HDLは抗動脈硬化作用が強いことから、マウス・ラットでは動脈硬化病変が発生しにくい。さらに、臨床で脂質低下作用が認められているスタチン類はマウス・ラットにはほとんど効果が認められない。これに対してウサギでは、脂質代謝に関連する主要な酵素の作用はヒトに類似しており、動脈硬化の発生やスタチンによる脂質低下作用も認められることから、脂質代謝や動脈硬化に関する研究に

適している。

3. スタチンを用いた脂質低下試験

スタチンの血清コレステロール低下作用は大きく2つに分けられる。LDL（血中コレステロール）の異化の亢進と肝からのコレステロール（VLDL）の分泌の低下である。スタチンをWHHLウサギに4週間投与し、プラセボ群と比較すると、肝のミクロゾーム分画におけるLDL受容体のmRNAの発現量が増加する⁵⁾。この効果は胆汁酸を吸着する陰イオン交換樹脂薬との併用によって相加的に亢進する。スタチン類はコレステロール合成を拮抗阻害することから、ヒトにおけるスタチンの脂質低下作用は、肝細胞におけるコレステロール合成阻害によるコレステロールの減少を補うためにLDL受容体の発現が亢進することによって由来すると考えられており、WHHLウサギを用いた研究はヒトにおける仮説を裏付けている。

肝からのVLDLコレステロールの分泌速度は、界面活性剤であるtriton WR-1339を静注しVLDLの異化を阻害することによって測定できる。スタチン投与4週目にトライトンを静注し、トライトン投与前と投与後に超遠心法によって調製したVLDL画分の脂質成分を測定したところ、中性脂肪を指標としたVLDLの分泌速度はプラセボ群と同様であったが、コレステロールを指標にする

とVLDLの分泌速度は低下した⁶⁾。すなわち、スタチンは肝から分泌されるVLDL中のコレステロール含量を低下させたことを示している。コレステロールを多く含むVLDLは冠動脈病変の進行と関連が認められており、動脈硬化の進展に強く関係しているマクロファージの泡沫化も亢進することから、スタチンのコレステロール低下作用は動脈硬化の抑制を考える上で重要である。肝からのVLDLコレステロールの分泌の低下も肝細胞におけるコレステロールの供給減少を抑制するためと考えられる。

4. 動脈硬化抑制試験

血清コレステロールを低下させる目的は心疾患に繋がる動脈硬化病変の進展を抑制することにある。動脈硬化予防試験は発生を遅延させる一次予防実験とすでに発生している病変の進展抑制あるいは退縮を調べる二次予防実験の2種類がある。

最初の一次予防実験（1984年～1987年）³⁾では、動脈病変が発生する前の離乳直後のWHHLウサギにスタチンを6カ月間投与して血清コレステロールを低下させると、冠動脈の動脈硬化の進展を抑制できることを観察した。この所見は、コレステロール低下療法が冠動脈病変の進展抑止に有効であることを具体的に示した最初の報告であった。臨床に対応した二次予防試験では、動脈硬化病変がすでに発生している10月齢のWHHLウサギを用いて1年間薬剤を投与して、動脈病変に対する作用を検討した。最初の二次予防試験（1986年～1988年）⁴⁾では、食物中のコレステロールや胆汁酸の吸収阻害作用がある陰イオン交換樹脂薬とスタチンを併用投与してさらに強力にコレステロールを低下させると、冠動脈のみならず大動脈でも動脈硬化病変の進展が抑制され、さらに動脈硬化病変の構成成分が変化することを観察した。当時は、病変の質の変化に重大な意味があること

に気付いていなかった。

5. 動脈硬化病変の安定化試験

1990年代になると、スタチンを用いた複数の大規模臨床試験の結果が発表され、スタチン類の投与によって心疾患による死亡率を改善できることが報告された。しかし、冠動脈造影による観察では動脈硬化による冠動脈狭窄の改善が軽度あるいは認められないことも確認された。すなわち、スタチンの心疾患予防効果は、当初考えられていた動脈硬化の進展抑制以外のメカニズムによる可能性があることが示唆された。当時（1991年～1993年）、著者らは、動脈硬化病変を免疫組織染色あるいは特殊染色し、その病理組織像を画像解析装置に転送して定量解析する方法を考案していた¹⁰⁾。現在この技術は動脈硬化に関する研究で多くの研究者が使用している。この方法を用いてスタチンの二次予防試験をWHHLウサギで実施し、動脈硬化病変の不安定化に対するスタチンの作用を検討した（1991年～1994年⁷⁾、1994年～1997年⁸⁾）。スタチンを投与することによって、プラセボ群に比較して、病変中のマクロファージと細胞外蓄積脂質が低下し、平滑筋細胞とコラーゲンが増加することを確認した。さらに、Harvard Medical Schoolのグループとの共同研究によって、スタチンの投与によってマクロファージが分泌するプロテアーゼや組織因子が減少することが明らかとなった。プロテアーゼは動脈硬化病変の線維性被膜の主要な構成成分であるコラーゲンを分解して動脈硬化病変を破綻しやすい病変に変化させると考えられている。組織因子は血栓形成に関与することから、脆弱化した病変が破綻した場合の血栓形成に深く関与すると指摘されている。当時、動脈硬化に由来する心突然死（急性冠症候群）は、冠動脈の動脈硬化病変が破綻して閉塞性血栓を生ずることが主因であると考えられ始め、

破綻した病変では表層の線維性被膜が菲薄化し、その下層に大きなリピッドコアが存在し、破綻した部位の近傍に炎症性細胞が集簇していることが報告されていた。また、急性冠症候群で死亡した患者の冠動脈血管造影の解析においては、心疾患の原因になった冠動脈には狭窄が軽度の病変が多数観察されていた。すなわち、急性冠症候群の原因になる動脈硬化病変は、狭窄の程度より破綻しやすい質（多量の脂質関連成分と薄い線維性被膜）が問題と考えられるようになった。著者らは動脈硬化プラークの安定性を定量的に評価するために、病変構成成分の比率（マクロファージの面積＋細胞外蓄積脂質の面積）／（平滑筋細胞の面積＋コラーゲン線維の面積）を計算し、プラーク不安定化指数として提唱した⁸⁾。現在この指数は世界的に使われ始めている。著者らのスタチンを用いた研究結果は、スタチンの投与によって動脈硬化病変が破綻しやすい病変から安定した病変に変化したことを示唆しており、大規模臨床試験の結果を具体的に説明する最初の報告となった。

おわりに

本稿では、WHHLウサギを用いた薬剤による動脈硬化治療研究を紹介した。脂質代謝や動脈硬化に関する研究ではウサギを用いた実験が有用であることを紹介したが、この分野の研究はウサギを用いるだけですべてを解明できるわけではなく、ウサギが適さない分野もある。一部に、遺伝統御され微生物統御されていなければ実験動物としては不適切であるとする考えがある。すなわち、現状ではこの定義に合致する実験動物はマウス・ラット類にほとんど限定されてしまう。遺伝統御されていることは望ましいが、より重要な点は実験に使用する動物種が研究目的に対応しているかどうか、ヒトあるいは目的とする動物種に外挿できるかどうかであるとする。比較生物学的なデー

タの蓄積が実験動物学の課題として今後ますます重要となるであろう。さらに付け加えるならば、ヒトの病態に関する最新の情報を入手し、その情報に対応した系統あるいはモデル動物を実験に使用することがヒトに外挿できる実験成績を残す上で重要であることは論を待たない。

文 献

- 1) 塩見雅志 他：自然発症高脂血症動物モデル。日本臨床 59：617-620, 2001.
- 2) 塩見雅志：WHHLウサギの系統開発過程とその特性。医学のあゆみ 157：714-719, 1991.
- 3) Watanabe Y. et al.: Preventive effect of pravastatin sodium, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on coronary atherosclerosis and xanthoma in WHHL rabbits. *Biochim Biophys Acta* 960: 294-302, 1988.
- 4) Shiomi M. et al.: Suppression of established atherosclerosis and xanthomas in mature WHHL rabbits by keeping their serum cholesterol levels extremely low. *Atherosclerosis* 83: 69-80, 1990.
- 5) Kuroda M. et al.: Effects of pravastatin sodium alone and in combination with cholestyramine on hepatic and adrenal low density lipoprotein receptors in homozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Japan J Pharmacol* 59: 65-70, 1992.
- 6) Shiomi M. et al.: Pravastatin sodium, a competitive inhibitor of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, decreases the cholesterol content of newly secreted very-low-density lipoprotein in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Metabolism* 43: 559-564, 1994.
- 7) Shiomi M. et al.: Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1938-1944, 1995.
- 8) Shiomi M. et al.: Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. *Atherosclerosis* 157: 75-84, 2001.
- 9) DecisionBase 6: Hyperlipidemia. 1-50, Decision Resources, Inc, 2002.
- 10) Shiomi M. et al.: Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions differ; an immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb* 14: 931-937, 1994.