

# コレステロール負荷によって発症したニワトリ胸部大動脈と冠状動脈における動脈硬化症

近藤 康博・本條 幸香・大月 寿栄・阿部 浅樹

(応用動物機能学講座)

## Induction of Atherosclerosis in Aorta and Coronary Artery of Chicken by Orally Administered Cholesterol

Yasuhiro Kondo, Sachika Honjo, Kazumasa Ohtsuki and Asaki Abe

(Department of Animal Science)

Hypercholesterolemia and hyperlipidemia have been important in human health as factors that induce atherosclerotic lesions in brain and heart blood vessel. Various experimental studies have been done to prevent and treat atherosclerotic lesions in animals. In the present study, we assessed the suitability of chickens as experimental animal for atherosclerosis. Newly hatched chicks were fed on 1.0%-or 0.1%-cholesterol (CHO) containing feed. After 3 and 6 months, total cholesterol levels in the sera and histological changes in the aorta and coronary artery of chicks were examined. Total serum cholesterol levels were significantly elevated. In the aorta of chicks fed on 1.0%-CHO-containing feed for 3 and 6 months, intimal thickening and marked accumulation of foam cells were observed. Endothelial cells had disappeared in the aorta of these chicks. A slight accumulation of foam cells was observed in the aortic intima of chicks fed on 0.1%-CHO-containing feed. In the coronary artery, a remarkable thickening of intima with accumulation of foam cells and a marked stenosis of coronary space were observed in chicks fed on 1.0%-CHO-containing feed. The results of present study indicate that the chicken can be a useful experimental animal in the study of hypercholesterolemia, hyperlipidemia and atherosclerosis.

**Key words** : experimental atherosclerosis, cholesterol, chicks

### 緒 言

高コレステロール血症や高トリグリセリド血症などの高脂血症は脳や心臓の血管障害の原因としてヒトの健康上の大きな問題になっている。高脂血症とそれに伴う血管障害を予防・治療するために栄養摂取上の改善や種々の薬物の投与が行われている。実験的に動物に高脂血症やそれに伴う血管障害を引き起こす手段としては、高濃度のコレステロールを含有する飼料で飼育する方法、あるいは Poloxamer 407 や Triton WR 1339 などの親水性の非イオン性界面活性剤薬物を投与する方法<sup>1)</sup>が知られている。ウサギでは、高濃度 (0.5%) のコレステロールを添加した飼料で 6 ヶ月間飼育することによって血清コレステロールレベルの大きな上昇が観察されている<sup>2)</sup>。また、ラットに上記の界面活性剤を投与することによって高コレステロール血症が誘発されている<sup>3)</sup>。一方、ウサギでは実験的な動脈硬化症の作出が報告されている<sup>2)</sup>のに対して、ラットやマウスでは、C57 BL/6 と呼ばれるマウスの 1

系統<sup>4)</sup>を除いて、高脂血症による動脈硬化症の実験的な誘導は報告されておらず、一般に齧歯類は動脈硬化に抵抗性であると考えられている。

以上のことから、多数頭飼育および採血などの実験手技が比較的容易で、かつ高脂血症やそれに伴う動脈硬化症を誘発しやすい実験動物の開発が望まれている。本研究では、高脂血症と動脈硬化症の実験動物としてのニワトリの可能性を探る目的で、孵化直後から 3 ヶ月間あるいは 6 ヶ月間にわたって高濃度のコレステロール (1.0%) を添加した飼料で飼育したニワトリにおける高コレステロール血症の誘発、ならびに胸部大動脈と冠状動脈における動脈硬化性の病変の誘発の様相について追究した。また、低濃度のコレステロール (0.1%) を添加した飼料による高コレステロール血症と動脈硬化症の発症についてもあわせて検討した。

## 材料と方法

### 供 試 鶏

試験には1日齢から6ヶ月齢の白色レグホーン種シェーバー系の雄鶏を用いた。鶏の飼育および実験は岡山大学自然生命科学研究支援センター動物実験指針に準拠して行った。孵化後4週齢までは保温した育雛ケージで、その後6ヶ月齢まで通常の群飼ケージで飼育した。1日齢から4週齢までは市販のチックフード(中国飼料)で、また、4週齢以降は市販の中雛用飼料(中国飼料)で飼育した。

### コレステロール投与

30羽の初生雛を5羽ずつの6群に分け、このうちの2群は重量割合として1.0%となるようにコレステロール(和光純薬)を添加した飼料で3ヶ月間あるいは6ヶ月間飼育した。他の2群は同様に0.1%となるようにコレステロールを添加した飼料で3ヶ月間あるいは6ヶ月間飼育した。残りの2群は3ヶ月時点と6ヶ月時点の対照としてコレステロール無添加飼料で飼育した。5週齢から1週間に一回、鶏の体重を測定した。体重の測定は5週齢から14週齢までは群ごとに、15週齢以降は個体ごとに行なった。

### 血清総コレステロール濃度の測定

コレステロール投与開始後3ヶ月目と6ヶ月目に翼下静脈より採血して血清を分離した。コレステロール測定用キット(和光純薬)を用いて、コレステロールオキシダーゼ法により血清総コレステロールを測定した。

### 血管組織標本の作成

コレステロール投与開始後3ヶ月目と6ヶ月目に、鶏をペントバルビタールで麻酔し、頸動脈を切断して放血致死させた。3ヶ月目には、胸部大動脈を、6ヶ月目には胸部大動脈と心臓を採取して10%ホルマリン液で固定後、定法に従ってパラフィン包埋した。胸部大動脈では大動脈弓の頂部付近で、心臓では、冠状溝から数ミリメートル下方の部分で厚さ5ミクロンの切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色して、顕微鏡で観察した。

## 結 果

### 体重の推移

対照群、1.0%コレステロール投与群、0.1%コレステロール投与群のいずれにおいても、体重は5週齢以降、鶏の成長に伴ってほぼ直線的に増加した(図1)。22週齢から25週齢にかけて、対照と1.0%コレステロール投与群の体重に増加の停滞が観察されたが、各群の体重間に有意な差は認められなかった。

### 血清総コレステロール濃度

1.0%コレステロール投与群の血清コレステロール濃度は投与3ヶ月目には $458.1 \pm 71.0 \text{ mg/dl}$ と対照の値( $114.8 \pm 29.0 \text{ mg/dl}$ )に対して有意に上昇した( $P < 0.01$ )

(Fig. 2)。一方、0.1%コレステロール投与群の血清コレステロール濃度( $119.4 \pm 9.7 \text{ mg/dl}$ )には対照の値との間の有意な差は認められなかった(Fig. 2)。コレステロール投与6ヶ月目においても1.0%コレステロール投与群の値は $516.1 \pm 80.6 \text{ mg/dl}$ と高く、対照の値( $122.6 \pm 12.9 \text{ mg/dl}$ )との間に有意な差( $P < 0.01$ )が認められた(Fig. 2)。一方、投与3ヶ月目と同様、0.1%コレステロール投与群の値( $103.2 \pm 13.0 \text{ mg/dl}$ )と対照の間の差は認められなかった(Fig. 2)。

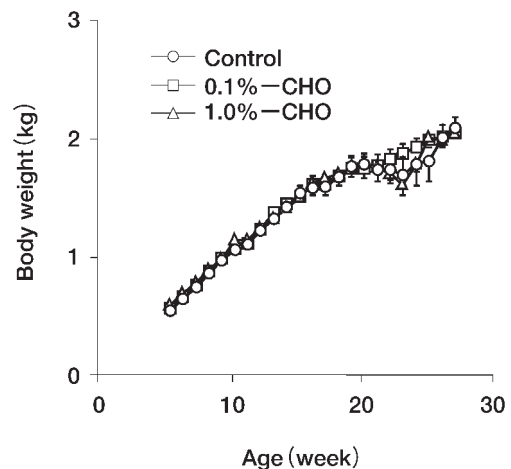


Fig. 1 Body weights of chicks fed on cholesterol-(CHO) containing feeds. Vertical bars indicate SE.

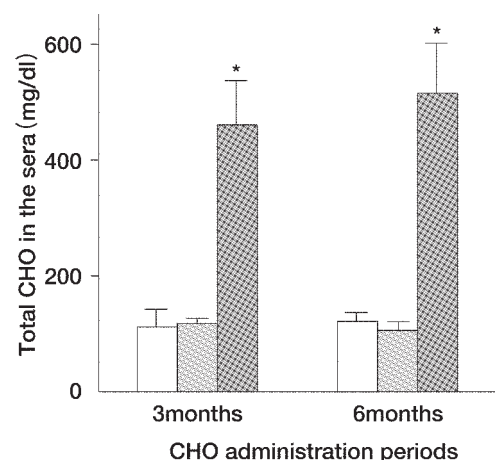


Fig. 2 Serum CHO levels of chicks fed on CHO-containing feeds.

Open column, dotted column and shadowed column represent control, 0.1% CHO and 1.0% CHO, respectively. Vertical bars indicate SE. \* = Significantly different t from mean of the control ( $P < 0.05$ ).

## 組織学的な変化

### 1. 胸部大動脈

コレステロール投与3ヶ月目においては、対照群（図3-A）、0.1%投与群（図3-B）の胸部大動脈の組織には異常は観察されなかった。一方、1.0%コレステロール投与群の3ヶ月目には、すべての標本において、内膜の顕著な肥厚および内膜の内腔側での多数の泡沫細胞の集積が観察された（図3-C）。内皮細胞はすべての標本において脱落しているのが観察され、標本によっては、内皮細胞は血管内縁全体にわたって、あるいは血管内縁の一部で認めることができなかった（図3-C）。

コレステロール投与6ヶ月目には、0.1%コレステロール投与群では、すべての標本において内膜の内皮下に軽度な泡沫細胞の集積が認められた（図3-D）。しかし、0.1%コレステロール投与群の内皮細胞には異常は認められなかった（図3-D）。1.0%コレステロール投与群では、すべての標本で内膜の肥厚と内膜における泡沫細胞の顕著な集積が認められ、さらに、すべての標本において血管内腔全体に及ぶ内皮細胞の欠損が観察された（図3-E）。

### 2. 冠 状 動 脈

コレステロール投与6ヶ月目の対照（図4-A）および

0.1%投与群（図4-B）の冠状動脈の組織には異常は観察されなかった。また、心臓の他の組織にも異常は観察されなかった。一方、1.0%コレステロール投与群では、すべての標本において冠状動脈内膜の一部に泡沫細胞の集積を伴う肥厚が観察され、肥厚が強度の例（図4-C）では、肥厚による冠状動脈内腔の狭窄が認められた。1.0%投与群においても心臓の他の部位での変化は観察されなかった。

## 考 察

本研究の結果は、高濃度のコレステロール添加飼料の長期給与によってニワトリに高コレステロール血症と動脈硬化症を引き起こし得ることを示している。これらのニワトリの体重は対照とほぼ同様に上昇したことから、高濃度コレステロール飼料の給与はニワトリの成長に影響するほどの有害な作用を及ぼさなかったと考えられる。

血液中のコレステロールは低密度リポタンパク（LDL）と高密度リポタンパク（HDL）中に多く含まれている。LDLは酸化ストレスなどによって酸化されて酸化LDLが生じる。血液から血管の内膜に取り込まれた酸化LDLは血液から内膜に遊走・侵入したマクロファージによってスカベンジャー受容体を介して取り込まれる<sup>9)</sup>。スカベ

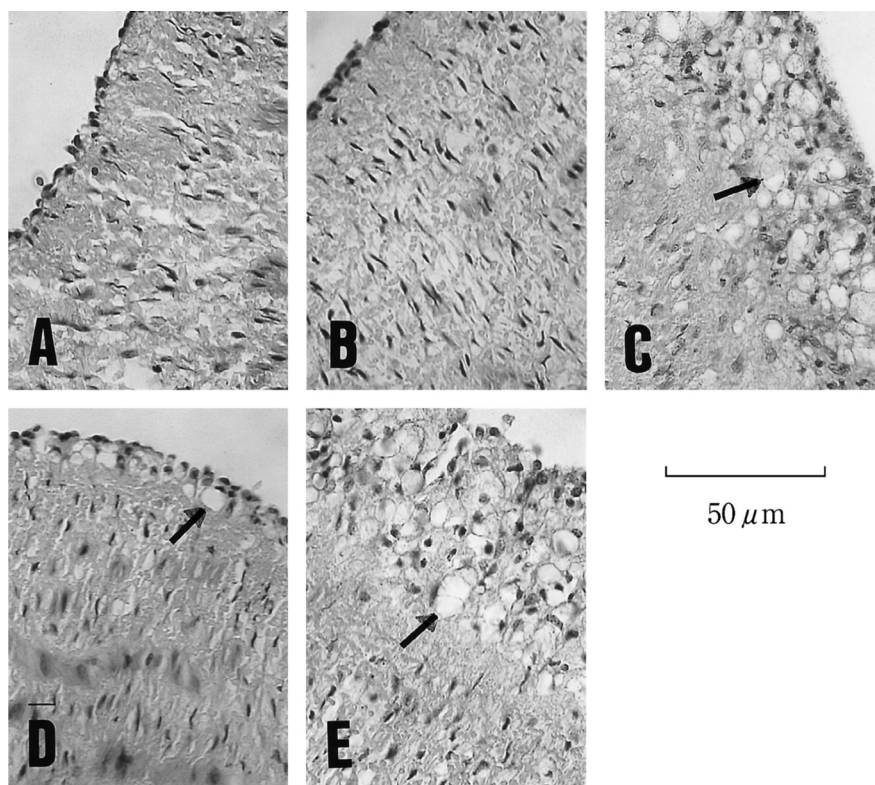


Fig. 3 Histological changes in the aorta of chicks fed on CHO-containing feed.

A: control, B: fed on 0.1%-CHO containing feed for 3 months, C: fed on 1.0%-CHO containing feed for 3 months, D: fed on 0.1%-CHO containing feed for 6 months and E: fed on 1.0%-CHO containing feed for 6 months. Arrows in C, D and E indicate representative foam cells in the intima. In C and E, no endothelial cells were observed.

ンジャー受容体を介する取り込みには負のフィードバック機構は存在しないため、マクロファージによる酸化 LDL の取り込みは無制限に行われる結果、マクロファージのよって処理し切れない酸化 LDL が油滴としてマクロファージ内に存在して泡沫細胞となって内膜に沈着して内膜の肥厚が引き起こされると考えられている。一方、酸化 LDL 取り込みによって刺激されたマクロファージは種々のサイトカインを分泌し、さらに、マクロファージを動員して内膜の肥厚を一層助長させるとされている<sup>5)</sup>。本実験において見られた胸部大動脈の内膜肥厚と泡沫細胞の集積や、冠状動脈内膜の肥厚や泡沫細胞の集積も高コレステロール血症に伴って誘発された上記の過程によると考えられる。一方、低濃度コレステロール (0.1%) 投与群では、高コレステロール血症は誘発されなかったにもかかわらず、投与 6 ヶ月目には、軽度ながらも胸部大動脈内膜に泡沫細胞の集積が観察され、動脈硬化の兆候が認められた。この結果は実験的なコレステロール負荷によって血清コレステロールレベルが正常に保たれている場合でも動脈硬化が引き起こされ得ることを示しており、一つの可能性として、血管内膜への LDL の取り込みが血清脂質レベルを維持するための一つの機構であるとも推測できる。

実験的な動脈硬化症はウサギでは誘発できる<sup>2)</sup>が、ラットやマウスでは引き起こすことが容易ではなく、動脈硬化に関する研究や動脈硬化症に対する薬品の開発の大きな障害になっている。コレステロールの用量に依存してニワトリに高コレステロール血症が発症し、さらに、それに伴って胸部大動脈と冠状動脈に動脈硬化に典型的な病理組織所見が観察されたことは、ニワトリが高脂血症や動脈硬化症研究のための有効な実験動物たり得ることを示している。

ラットやマウスにおいて実験的な動脈硬化症を誘導しにくい原因についてはいまだその詳細は明らかにされていないが、動脈硬化を起こしやすいウサギに比べて、ラットやマウスでは、細胞外脂質の沈着に関与するとされる動脈壁中の酸性ムコ多糖の含量が少ないことがその原因の一つではないかと推測されている<sup>6)</sup>。本研究の結果は高脂血症や動脈硬化症の実験動物としてのウサギとニワトリの類似性を示唆していると考えられる。今後はニワトリにおける実験的な高脂血症と動脈硬化の特性についてさらに検討を加えて、この分野における有用な実験動物としてのニワトリの意義を確立する必要があると考えられる。

## 要 約

動脈硬化症モデル動物としてのニワトリの有用性を検討する目的で、コレステロール添加飼料で飼育したニワトリにおける高コレステロール血症と胸部大動脈および冠状動脈における動脈硬化症の発症について調べた。1.0%のコレステロールを添加した飼料で飼育したヒナでは、高コレステロール血症が発症するとともに、胸部大動脈では泡沫細胞の集積を伴う内膜の肥厚が、冠状動脈では同様に、内膜の肥厚とそれに伴う血管内腔の狭窄が観察され、典型的な動脈硬化症が発症した。0.1%添加飼料では、高コレステロール血症は生じなかったが、胸部大動脈では泡沫細胞の軽度の蓄積が認められた。以上のように、飼料を介するニワトリへのコレステロールの負荷は、添加量に依存する高コレステロール血症と動脈硬化症を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果は、高脂血症やそれに伴う動脈硬化症のモデル動物としてニワトリが有用であることを示唆している。

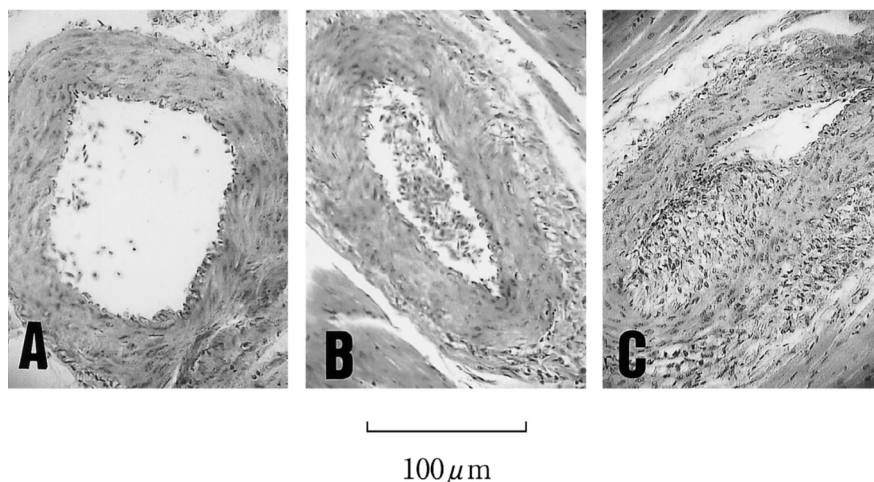


Fig. 4 Histological changes in the coronary artery of chicks fed on CHO-containing feed for 6 months.

A: control, B: fed on 0.1%-CHO containing feed and C: fed and C: fed on 1.0%-CHO containing feed. Remarkable thickening of the intima with accumulation of foam cells and marked stenosis of coronary space were observed in C.

## 文 献

- 1) Schurr, P. E., J. R. Schultz and T. M. Parkinson : Triton-induced hyperlipidemia in rats : an animal model for screening hypolipidemic drugs. *Lipids*, **7**, 68-74 (1971)
- 2) Ohara, Y., T. E. Peterson and D. G. Harvison : Hypercholesterolemia increased endothelial superoxide anion production. *J. Clin. invest.*, **91**, 2546-2551 (1993)
- 3) Okazaki, M., M. Suzuki and K. Oguchi : Changes in coagulative and fibrinolytic activities in triton WR-1339-induced hyperlipidemia in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **52**, 353-361 (1990)
- 4) Warren, K. P. and E. E. Eugene : Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57 BL/6 mouse. *Atherosclerosis*, **136**, 115-123 (1998)
- 5) 児玉龍彦・高橋 潔・渋谷正史 : 血管生物学. pp. 75-83, 講談社, 東京 (1997)
- 6) Mullinger, R. N., Manley, G : Glycosaminoglycans and atherosclerosis in animal aortas, *J. Atheroscler. Res.*, **9**, 108-111 (1969)