

論文審査の結果の要旨

氏名：中山 駿矢

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：カニクイザルを用いた循環器病態生理学に関する研究

審査委員：(主査)	教授	鯉江 洋
(副査)	教授	山谷 吉樹
	教授	佐藤 雪太

循環器疾患はがん、脳血管疾患とならび、ヒトの死因の上位を占める疾患である。そのため、国内外の多くの研究機関においては循環器疾患に特化した研究が推進されている。循環器疾患ではその中心となる心臓のみならず、腎泌尿器や腸肝循環、脳血流など様々な要因が交差し、複雑に絡み合うことから、実験動物を用いた *in vivo* 研究が特に重要であることが知られている。現在までに様々な実験動物モデルとして、遺伝子導入や遺伝子変異、免疫誘導などによる疾患モデルマウスや疾患モデルラットが作成されてきた。実際、これらのモデルにより様々な基礎的研究が発展しており、現在でも多くの医薬品が市場へと流通している。一方で、心筋細胞をはじめとする種々の細胞において動物種間の差異が存在することが近年報告されている。特に心筋細胞におけるイオンチャネルの発現は小動物とヒトの間で異なることが知られ、すでに流通した医薬品が不整脈などの副作用によって市場撤退するという例も散見されている。これらの背景から、国際医薬品調和会議（ICH）はサルをはじめとした中・大型動物を用いた前臨床試験および研究の重要性を提言している。

カニクイザルはヒトと同じ霊長目に属し、チンパンジーやオランウータンなどの類人猿について近縁な狭鼻猿類であり、現在のところヒトと遺伝学的に最も近縁な実験動物として知られている。またその形態もヒトに近く、心臓構造なども類似している。

こうしたことからカニクイザルを用いた循環器研究が近年報告され始めているものの、その血液検査値や心電図などの基礎的報告は少なく、ヒトや他種の実験動物の基準値を外挿することにより研究が行われてきた。しかしながら、前述のように動物種間では様々な要因により生理学的機能が異なることが多く、他の動物種の外挿だけではさらなる研究の発展は難しいと考えられている。そのため、国内外の企業、研究機関、研究者から、カニクイザルの新たな循環器疾患モデルやその評価のための基準値の樹立は常に強く求め続けられている。そこで本研究ではサル類を用いた循環器生理を明らかとし、サル類循環器研究の基盤とすることを目的に、血液学、心電図、心エコー図検査の3つの観点から検討を行った。また、最終的にこれらの研究によって得られた基準値をもとに循環器疾患に罹患したサルを用いて、その診断精度および有用性の検討を行った。

1. 循環器疾患診断のための血液検査基準値に関する研究

血液検査は様々な情報を得ることのできる有用な検査法であることから、臨床および研究分野においてルーチンで行われている。一方でサル類におけるこれらの報告はほとんど存在していない。本研究ではサル類における全血球計算値および動脈血液ガスの基準値を明らかにするため、検討を行った。実験には国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターにおいて繁殖、飼育されたオス 21 頭、

メス 41 頭の計 62 頭のカニクイザルを用いた。また、これらのサルを年齢ごとに 3 群に分け、加齢性の変化についても検討を行った。なお、全血球計算のうち白血球百分比については自動計算機によるカウントではエラーや測定不可例が多く、データが不足していたため本研究では検討しなかった。

動脈血液ガスの多くの項目は性差がみられず、安定した結果を示した。一方で二酸化炭素分圧 (PCO₂) ならびに総二酸化炭素濃度 (ctCO₂) はオスで有意に高い値を呈し、活動量や筋肉量の差による CO₂ 排泄量の違いが影響することが考えられた。また、加齢に伴って PCO₂ は上昇し、重炭酸イオンやベースエクセス (B. E.) も相対して上昇が認められた。一方で血液 pH などは一定の値を示し、重炭酸緩衝系などの作用によるホメオスタシス機構が明らかとなった。

全血球計算でも性差は認められなかった一方、加齢に伴って赤血球数の上昇やヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の増加が認められた。

これらの結果から、カニクイザルにおける全血球計算ならびに動脈血液ガスの基準値を明らかにすることができた。

2. 正常心電図および QT 補正式に関する研究

心電図はヒト医療、獣医療において重要な心疾患診断ツールであることから、様々な研究が行われている。特に、心筋細胞のイオンチャネル発現は動物種により差があることが報告されており、国際医薬品調和会議 (ICH) は霊長類をはじめとする中・大型動物使用の重要性を提言している。しかしながら、サル類の心電図におけるデータは小規模なものに限られており、またサルを対象とした心電図の補正式は報告されていない。本研究では、オス 162 頭、メス 191 頭、計 353 頭の大規模群を用いることで心電図基準値を検討し、さらにサル類に対応した理想的な心電図補正式を検討した。

得られた心電図ではカニクイザルはヒトに比べ非常に早い心拍数を示すが、その一方で、各波形の振幅はヒトや既存のサル類の心電図と一致していた。

また、6 種の補正式を用いて RR 間隔と補正 QT 間隔の相関を求めた。既存の補正式ではヒト成人の QT 間隔補正に用いられる Bazett 式が最も良好な補正結果を示した。さらに既存の集団補正式をもとに RR 間隔と QT 間隔の相関から「べき指数」を算出し、 $[QT_c]=[QT]/[RR]^n$ の式に代入し、新規補正式を作成した。得られた「べき指数」は 0.576 であり、この新規補正式を用いた補正 QT 間隔は RR 間隔と相関のない結果を示した。また、補正された QT 間隔は 350~400ms とヒトの補正 QT 間隔基準値と近い値を示していた。さらに補正 QT 間隔 400ms 以上の個体を精査すると、糖尿病や心筋症などの多くの潜在性疾患を検知した。

以上より、本研究ではカニクイザル大規模群における心電図基準値を確立し、実験用サル類に対応した理想的な QT 補正式を作出した。

3. 心エコー図検査の基準値に関する研究

超音波画像診断は生体内を非侵襲的に、リアルタイムで観察することのできる有用な手法である。なかでも循環器においては心エコー図検査が広く用いられている。しかしカニクイザルでは、心エコー図検査を用いた体系的な心機能評価基準の報告がなされていなかった。本研究では、医科学研究に用いられるカニクイザルにおける心機能評価基準を作成するためオス 86 頭、メス 111 頭の計 197 頭を対象に心エコー図検査を実施し、基準値を作成した。また、年齢ごとに 3 つの群に分類し、心機能および構造の加齢性変化についても検討を行った。

その結果、心臓構造は体重に比例して増加が認められ、性成熟後からは変化が認められなかった。これらのことから性成熟までは心臓サイズが増加することが示された。また、心拍出量も心臓サイズに比例して増加が認められた。一方で、心収縮率を示す左室内径短縮率(FS)ならびに左室駆出率(EF)は体重や年齢に関わらず一定の値を示した。また、心臓内の弁口部流速は左室拡張早期流入血流速 (E wave) の加齢に伴う低下が認められた。

以上より、心臓サイズは性成熟まで増加するが、心臓の主たる機能である全身への駆出は年齢にかかわらず一定に保たれることが示された。本結果はヒトにおいてもほぼ同様の傾向が示されており、カニクイザルはヒトの循環器動態を忠実に反映することが示された。

4. 自然発症心疾患の診断と病態評価に関する研究

前項までの研究により、医科学研究モデルとしてのカニクイザルにおける基礎的基準値が確立された。これらをもとに本研究では、ヒトのモデル動物であるカニクイザルにおける心疾患の早期発見ならびに診断を目的とし、全血球計算、動脈血液ガス、心電図や心エコー図検査を相互に活用し、診断精度の検討を行った。

本研究では霊長類医科学研究センターにおいて繁殖・飼育されたオス9頭、メス30頭の計39頭を用いた。これらの動物に対し、心電図検査ならびに心エコー図検査を実施し、構造的ならびに電気生理学的な異常を判断し、心疾患群ならびに正常群に分類した。また心疾患は主に拡張型心筋症群と弁膜症群に分類された。なお、全血球計算のうち白血球百分比については自動計算機によるカウントではエラーや測定不可例が多く、データが不足していたため本研究では検討しなかった。

これらの結果、動脈血液ガスでは心疾患罹患群においてPCO₂およびctCO₂などの二酸化炭素濃度、補正重炭酸イオン濃度の増加が認められた。また、全血球計算ではヘモグロビン濃度や赤血球数などの高値や赤血球恒数の低下などが認められた。

以上より、心疾患カニクイザルにおいて動脈血液ガスの変化が起こることが示された。これにより、心疾患モデルザルへの動脈血液ガス分析検査は有用であり、従来の血液検査や心電図検査などの生理学的検査と併せて検査を行うことで、より早期での心疾患診断が可能となることが示唆された。

以上のことから、本研究において実験用カニクイザルにおける各種循環器関連の検査基準値が確立された。また、これにより高感度かつ簡便な心疾患のスクリーニング法が確立された。

得られた基準値をスクリーニングに用いることで、早期における心疾患の診断が可能となり、有用なサル類心疾患モデルの抽出が可能となった。また、心疾患モデルザル作成においても本基準値を用いることでより詳細な分類が可能となり、さらなる循環器疾患研究の発展が期待される。さらに、早期診断・治療による実験動物のAnimal welfareの向上にも寄与すると考えられる。

よって本論文は、博士（獣医）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 2年 2月 21日