

3) SHR を用いた血圧上昇抑制作用の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 白井 展也

はじめに

高血圧は脳卒中の危険因子の一つと言われていることから、血圧に関する研究は多くなされている。高血圧モデル動物の代表として、1963年に京都大学にてウイスター京都ラットより開発された spontaneously hypertensive rat (SHR)がある。また、この中から脳卒中を発症しやすい系統を選抜して stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP)がある。このほかにもいくつかの本態性高血圧症の自然発症モデル動物はあるので、実験の目的や利用のしやすさを考え、選択する。本稿では SHR を用いた in vivo 試験における評価方法について紹介する。

血圧測定装置については、各社から様々な手法の装置がでている。装置も実験目的や環境などに則したものを購入し、使用する。ここでは、非観血式(非侵襲式)の尾静脈で測定する装置について説明を行う。

準備するもの

1. 動物

- ・高血圧動物 (SHR/Izm または SHRSP/Izm)。通常は雄。なお、動物の調達食品機能性評価マニュアル集の I-3-2)を理解した上で調達する。
- ・血圧上昇の抑制効果を確認するためには、8週齢以降から行った方がよい。一定の週齢まで行くと、高い血圧で一定になる。また、高食塩負荷により血圧の上昇が可能である。
- ・使用する動物は、実験前に2~3週間程度市販固形標準飼料などで予備飼育をして飼育環境に慣らしておく。
- ・予備飼育の期間、頻繁に実験動物と接触を持ち、実験動物が人間との接触になれる様にする。また、この期間に実際に血圧を測り、血圧の測定に動物も慣らしておくが良い。
- ・動物の購入は途中死亡の可能性も考え、一群あたり1~2匹多めに購入しておく。ただし、試験年齢や飼育期間がきわめて低いもしくは短い場合や、逆にきわめて高いもしくは長くなる場合は、購入頭数を増減させる。

2. 飼育

動物の飼育は、信頼の置けるデータの収集のためにも必ず動物の福祉に沿った飼育管理が行われている施設で行う。特に血圧は実験動物のストレスにより変化しやすいので、環境には注意しなければならない。また、動物の走逸には十分に

注意する。詳しくは食品機能性評価マニュアル集の I-3-2)を参照。

- ・市販の動物飼養用飼料

- ・餌箱

食品成分を粉末飼料に混ぜて給仕する場合必要となる。ガラス製，ステンレス製いずれでも大丈夫である。長期間の食品成分の血圧降下を確認する場合は，餌の摂取量が大事になる。餌の取りこぼしや餌箱の転倒がない様なものを選ぶ。若い個体は体重が低く，餌箱の転倒は起きにくい，高齢ラットの場合，餌箱と同じ体重になるので転倒されることがある。SHR の場合一日 20g 前後摂取する。これをもとに餌箱のサイズと後述する実験用調製飼料の調製を行う。

- ・給水瓶

飼育ケージが自動給水式でない場合，必要となる。また，食品成分を液体にて長期間投与する場合必要となる。ラット（50g）一匹あたり一日 20～45ml 飲水する。通常の水であるなら 2～3 日の交換で十分であるが，食品成分を入れたもの場合は，毎日交換を行った方がよい。給水瓶に頼らないで，液体を直接経口摂取させる方法もある。単回投与の場合，この直接経口投与が用いられる。詳しくは食品機能性評価マニュアル集の I-3-2)を参照のこと。

- ・体重計

長期間の食品成分の血圧降下を確認する場合は，体重の管理が欠かせない。SHR の場合，高齢の個体では体重が 500g 程度になるので，1kg までではかれるものがあればよい。体重も非麻酔下で測るので，ラットの動きに影響されないものが便利である。

- ・実験用調製飼料

使用する実験用飼料には内容が明らかになっているものを用いる。自分で飼料調製を行う場合は，由来が明らかである純化した飼料材料を用い調製を行う。表 1 に米国国立栄養研究所（American Institute of Nutrition; AIN）が発表する標準飼料組成を示す。

表 1 代表的飼料組成

AIN-93G 組成 (g/kg)		AIN-93M 組成 (g/kg)	
コーンスターチ	397.486	コーンスターチ	465.692
カゼイン	200.000	カゼイン	140.000
デキストリン化コーンスターチ		デキストリン化コーンスターチ	
	132.000		155.000
スクロース	100.000	スクロース	100.000

大豆油	70.000	大豆油	40.000
セルロース	50.000	セルロース	50.000
AIN-93G ミネラル混合物	35.000	AIN-93M ミネラル混合物	35.000
AIN-93G ビタミン混合物	10.000	AIN-93M ビタミン混合物	10.000
L-システイン	3.000	L-システイン	1.800
重酒石酸コリン	2.500	重酒石酸コリン	2.500
BHT	0.014	BHT	0.008

3. 血圧測定

- ・血圧測定装置；tail-cuff 式の自動血圧装置.
- ・パソコン
- ・保温装置；血圧測定装置と対で販売されている.
- ・カフのゴムの予備；尾を加圧させるカフのゴムは消耗しやすい. そのため何時消耗しても良い様に，常時予備のゴムを用意しておく.
- ・プリンター；電子媒体での記録はデータが消える事もあるので，紙媒体での記録を行う.
- ・JK ワイパー
- ・タオル

プロトコール

1. 飼育環境と測定環境が異なる場合は 30 分前に測定する部屋に入れておく.
2. ラットを保定する保温器を 39℃にする.
3. ラットを興奮させない様に保定する.
4. 保温器に保定後，5 分以上安定させる.
5. 尾にカフを入れ，尾の中央付近から胴体側に設置する.
6. 自動的に測定が始まるまで待つ. または，脈動が安定した時に測定をスタートする.
7. 三回測定を行う.
8. 測定終了後，速やかにラットをケージに戻す.

注意すべき点

- ・血圧は周日変化（サーカディアンリズム：概日リズム）があるので，測定は一定の時刻で行う.
- ・近年の血圧測定器は自動化されているので測定開始までの時間が早い. しかしなかなか測定が始まらない場合もある. その場合は実験動物に直接飼育室内の

空調の風が当たってないか確認する。また、尾が直接机などに当たっている場合は、せっかく保温器で温めた体温を逃がすことになる。尻尾が冷えない様に、尾の下にタオルなどを敷く。

- ・測定は三回以上行う。三回とも近似した値が得られれば良いが、ばらつく場合が多い。その場合は、実験動物の様子をみて測定回数を増やす。ただし、長時間の保定は実験動物にはストレスである。そのため、血圧が高くなることもあるので注意する。その場合は後日改めて測定する方が良い。また長期間の飼育で血圧の変化を見る場合は、2~3日続けて測定を行い、平均値を採る事も有効である。いずれの方法を採るにしても論文に記載する。

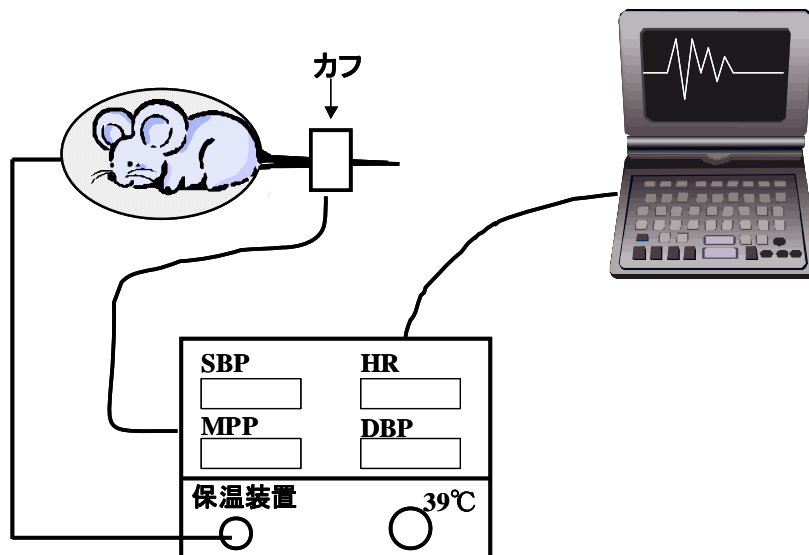


図 1 血圧測定の概略

参考文献

- 1) 河村幸雄, 高血圧モデル動物を用いた評価, 「食品機能研究法」, 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一 編, (光琳), pp.113-115 (2000).
- 2) 美野輪治, 細胞工学別冊: 実験プロトコールシリーズ, 「マウス表現型解析プロトコール」, 理化学研究所ゲノム科学総合研究センターゲノム機能情報研究グループ 編, (秀潤社), pp.148-151 (2006).
- 3) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C., AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).