

動脈硬化モデル作出のための低タンパク・アデニン飼料の開発

1. 目的

腎障害および石灰化による動脈硬化誘発を目的とした、低タンパク・アデニン飼料へのビタミンDの添加の影響を検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

13週齢 雄 Jcl:SD ラット 20匹

(2) 給与飼料

- ① AIN-93M 改変食 (コントロール) : AIN 群
- ② LP (AIN-93M ベース低タンパク・アデニン添加食
(CP2.5%、アデニン 0.75%)) : LP 群
- ③ LP + ビタミン D 0.01%添加食
(約 5,000IU/100g、要求量 100IU/100g に対して 50 倍) : LP+VD1 群
- ④ LP+ビタミン D 0.02%添加
(約 10,000IU/100g、要求量 100IU/100g に対して 100 倍) : LP+VD2 群

Ingredient	Control	LP	VD1	VD2
		g/kg diet		
Cornstarch	543.192	639.592	639.492	639.392
Casein	140.000	25.000	25.000	25.000
Maltodextrin	50.000	60.000	60.000	60.000
Sucrose	100.000	100.000	100.000	100.000
Soybean oil	40.000	40.000	40.000	40.000
Cellulose (avicel)	50.000	50.000	50.000	50.000
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35.000	35.000	35.000	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000	10.000	10.000	10.000
L-Cystine	1.800	0.400	0.400	0.400
Choline bitartrate	2.500	2.500	2.500	2.500
tert-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008
CaCO ₃	2.500	1.000	1.000	1.000
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	25.000	29.000	29.000	29.000
Adenine	0.000	7.500	7.500	7.500
Vitamin D ₃ (50万IU)	0.000	0.000	0.100	0.200
Total	1000.0000	1000.0000	1000.0000	1000.0000

Nutrient Composition		Control	LP	VD1	VD2
Moisture	%	6.94	8.04	8.93	9.4
Crude Protein	%	12.55	5.09	4.78	4.87
Crude Fat	%	4.06	4.01	3.95	4.11
Crude Fiber	%	2.6	2.5	2.5	2.6
Ash	%	4.41	4.29	4.24	4.19
Calcium	%	0.87	0.88	0.85	0.83
Phosphorus	%	0.91	0.91	0.9	0.89
Vitamin D ₃	IU/100g	90	80	4570	8870

表 1. 給与飼料組成および成分

(3) 飼育方法

- ① 温度および湿度：温度＝ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度＝40～60%
- ② 照明：12時間の明暗サイクル（点灯時間 8:00～20:00）
- ③ ケージ：ポリカーボネートケージ（345×403×177mm）に単飼
- ④ 飼料：自由摂取
- ⑤ 飲水：水道水を自由摂取

(4) 試験方法

供試動物は、導入時に体重を指標に4群に分け、1週間の馴致後（CE-2 給与）に試験飼料の給与を開始、給与期間は4週間とした。

各試験群について、給与開始から28日経過後に、15時間の絶食（18:00～翌 9:00）をかけた後解剖を実施し、胸部および腹部大動脈、さらに頸動脈を採取して、組織切片を作成した。切片は von kossa 染色、あるいはアリザリンレッド S 染色により血管へのカルシウム沈着の程度を観察した。その他、血清を採取して -80°C で保存し、組織染色結果によって血中カルシウム、リン、クレアチニン、尿素窒素の測定を行った。

3. 結果

(1) 摂餌量および飲水量

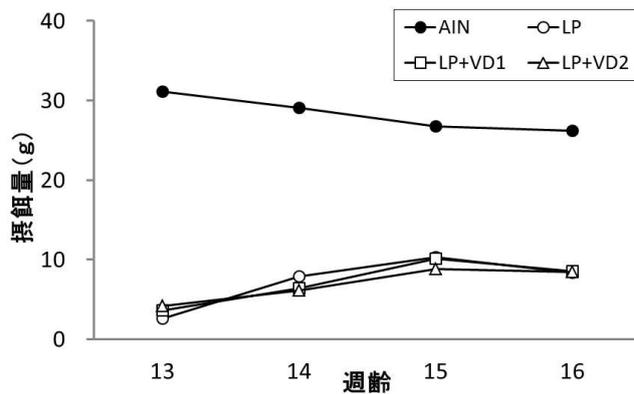


図 1. 摂餌量の推移

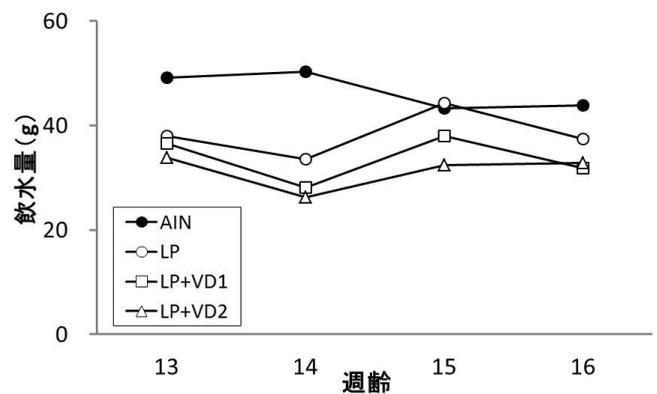


図 2. 飲水量の推移

LP 群、VD1 群、および VD2 群の 1 日の摂餌量は、AIN 群よりも少なかった。日々の水の消費量には、試験群間で大きな差はなかった。

(2) 体重

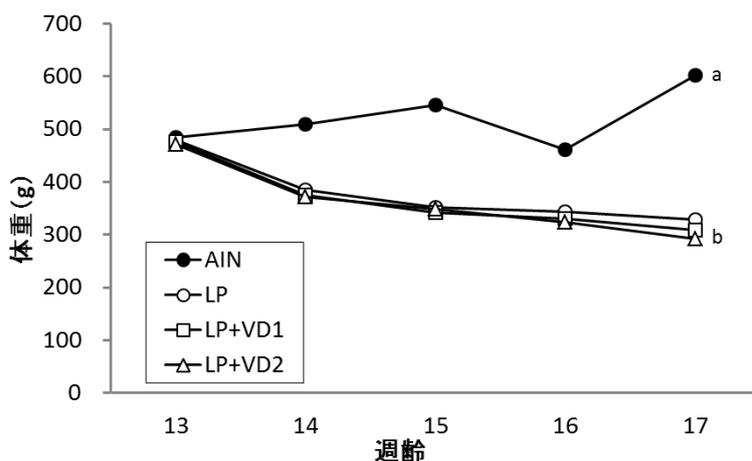


図 3. 体重推移

LP 群、VD1 群、および VD2 群の体重は試験開始直後から減少した。14 週目から、LP 群、VD1 群、および VD2 群と AIN 群との間に有意差が見られた。

(3) 解剖結果

① 空腹時体重

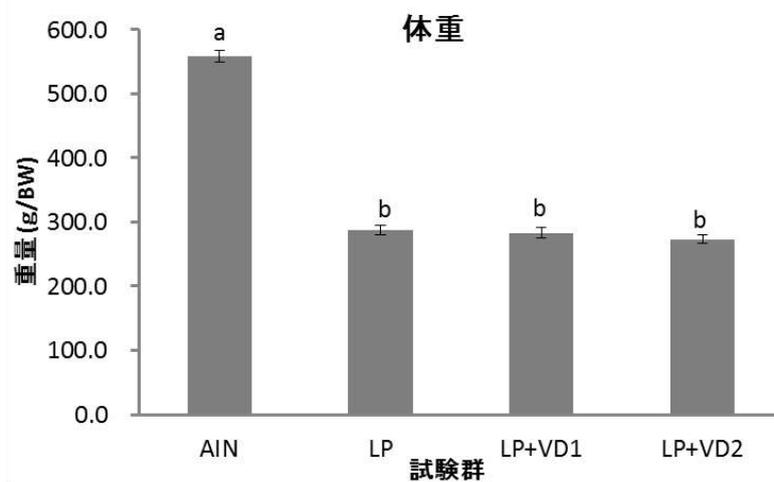


図 4. 空腹時体重

低タンパク・アデニン飼料を与えたラット (LP 群、VD1 群、VD2 群) の空腹時体重は、AIN 群よりも有意に低かった。

② 臓器重量 (体重当たり)

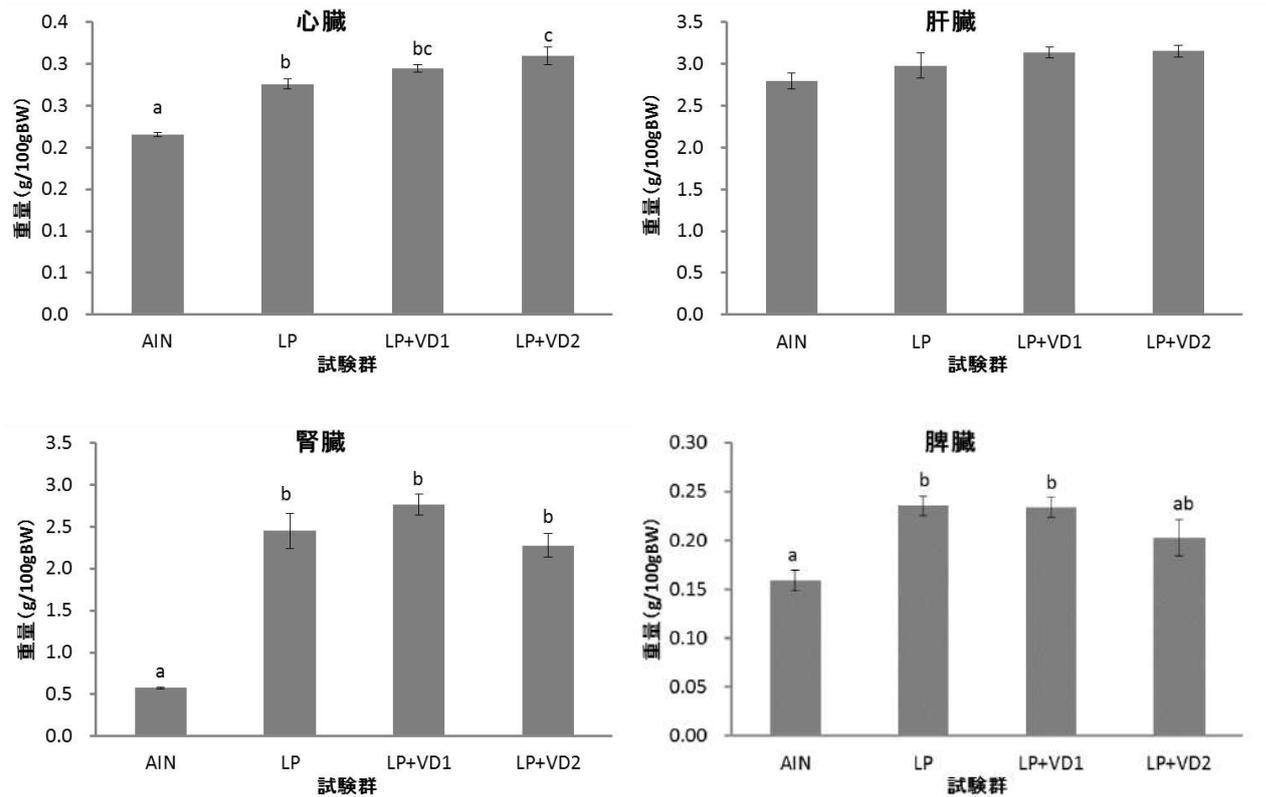


図 5. 体重当たりの臓器重量

心臓、腎臓および脾臓の重量は試験群間で有意差が見られたが、肝臓の重量には有意差は見られなかった。低タンパク・アデニン飼料を与えたラットの中でも、VD2 群の心臓の重量は LP 群よりも有意に増加した。

(4) アリザリンレッド染色および von Kossa 染色

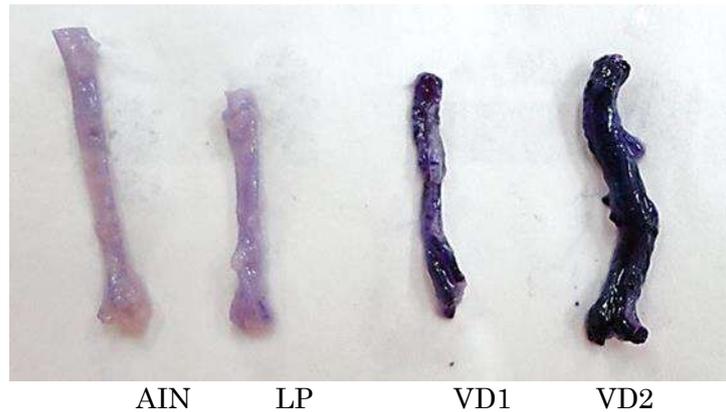


写真 1. 腹部大動脈のアリザリンレッド染色

AIN 群のいずれも、アリザリンレッド染色では染色されず、腹部大動脈における石灰化を示さなかった。LP 群のうちの 1 匹は染色が確認された。VD1 群および VD2 群ではすべてのラットで染色が確認され、血管石灰化を示唆した。

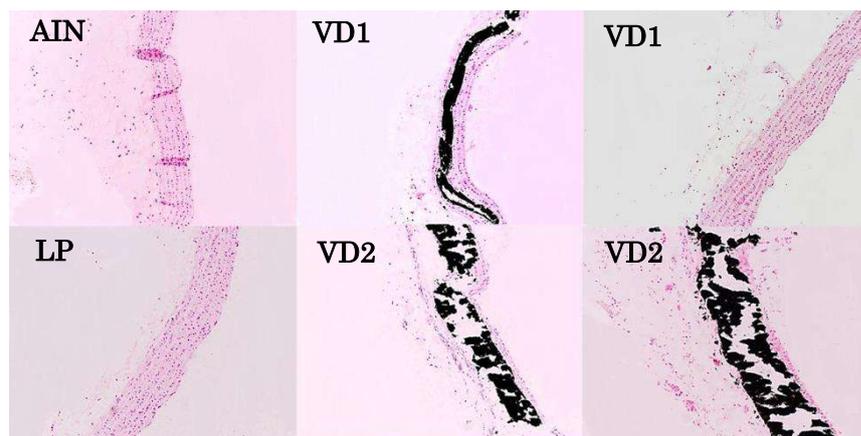


図 6. 胸部大動脈の von Kossa 染色

AIN 群および LP 群の胸部大動脈はフォンコッサ染色では染色されず、カルシウム沈着は確認されなかった。対照的に、VD1 群 6 匹のうちの 4 匹および VD2 群 6 匹すべてで有意に染色され、カルシウム沈着が確認された。

これらのデータは、低タンパク・アデニン飼料へのビタミン D の添加により動脈石灰化の頻度を劇的に増加させることを示す。

(5) 血液分析

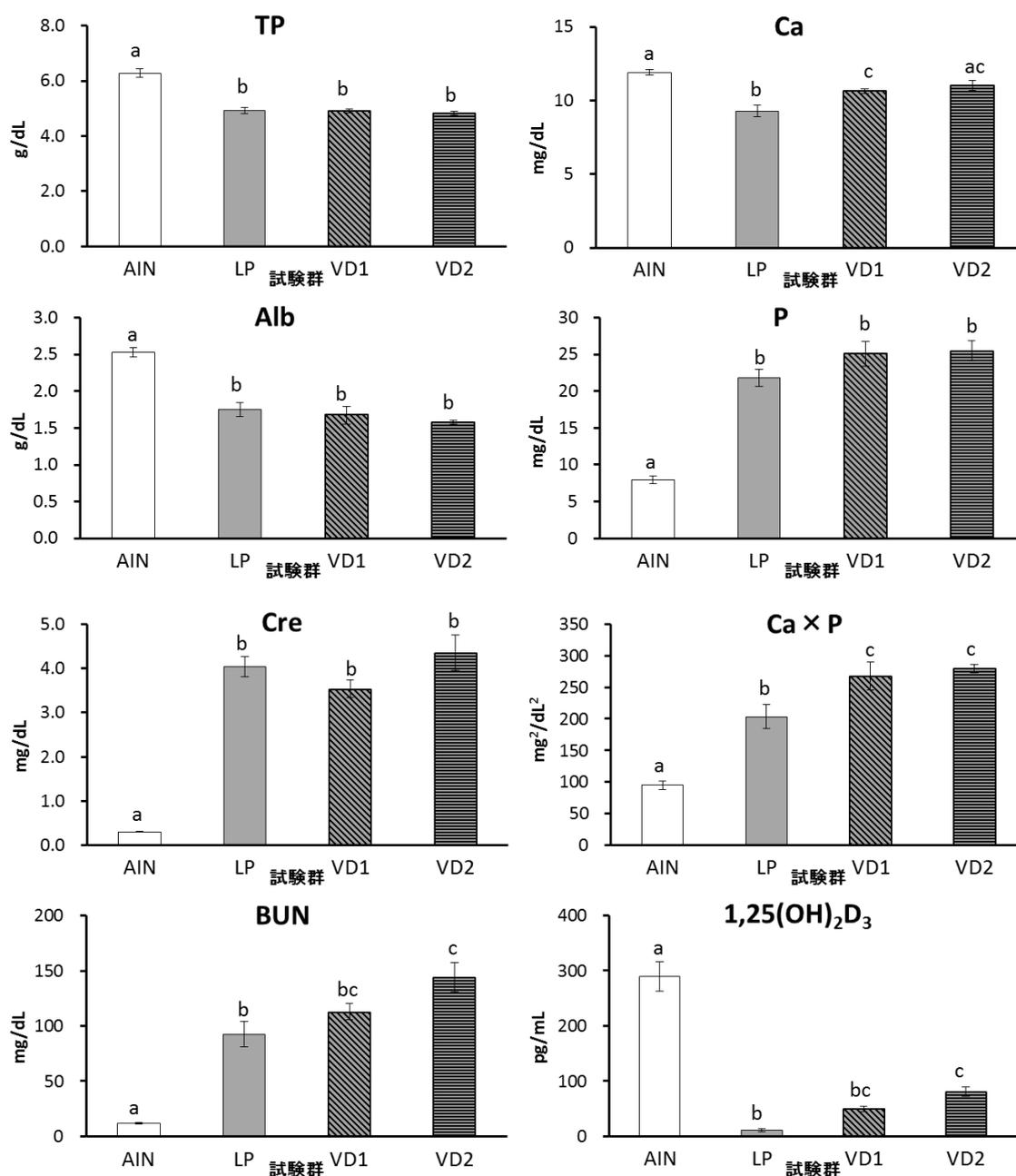


図 7. 血液分析

LP 群、VD1 群、および VD2 群における総タンパク質、アルブミン、および 1,25 (OH) ₂D₃ の血清レベルは、AIN 群よりも有意に低くなった。一方、LP 群、VD1 群、および VD2 群のクレアチニン、BUN、P、および Ca×P 生成物の血清レベルは、AIN 群よりも有意に高くなった。LP 群および VD1 群における Ca の血清レベルは、AIN 群よりも有意に低くなったが、AIN 群および VD2 群の間には有意差はなかった。LP 群と比較して、VD2 群では BUN、1,25 (OH) ₂D₃、および Ca×P 生成物レベルの有意な増加が見られた。