

201208020A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ脳梗塞・  
心筋梗塞モデルの開発

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 谷本 昭英

平成25(2013)年4月

## 目 次

I 総括研究報告	
高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発	
谷本 昭英	2-38
【参考資料】	39-205
II 研究成果の刊行に関する一覧表	206
III 研究成果の刊行物・別刷	207-

高脂肪食による非侵襲性マイクロミニピッグ  
脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発

研究代表者：谷本 昭英

【研究要旨】

循環器疾患の克服のため、動脈硬化の病態を解明し、治療法・予防法を開発するための動物モデル開発は不可欠である。我々は世界最小・超小型マイクロミニピッグ (MMPig: Microminipig) に高脂肪・コレステロール食を給餌し、持続的高コレステロール血症と動脈硬化症を誘導した。MMPig は高 LDL コレステロール動物で、食性や睡眠行動などヒトとの類似点も多く、食事制御のみでヒトに類似した動脈硬化病変を誘発できる。一方、睡眠障害はヒトの動脈硬化の危険因子として注目されており、MMP 動脈硬化モデルに睡眠障害を負荷することにより、短期間で動脈硬化病変を進行させ、非侵襲性脳・心筋梗塞モデルの確立を目指す。

平成 23 年度には、高脂肪食 8 週間の食餌性投与を行った。投与 2 週間以後には安定した高脂血症が見られ、コレステロール代謝に関わる分子の肝での発現パターンはヒトときわめて類似していた。また、8 週目の解剖では大動脈を含め全身の動脈にヒトと同様の粥状動脈硬化を形成することを確認した。

平成 24 年度には、比較的低濃度の高コレステロール食負荷で誘導される高脂血症に対する HMG-CoA reductase (スタチン) の阻害剤の効果を検討した。8 週間の実験において、スタチンは有意に高脂血症の改善効果を示した。マウスよりヒトに近い解剖・生理を有する MMPig において、臨床使用薬剤の効果を示した意義は小さくはない。また、1 年以上の長期飼育での観察においては、エコーによる頸動脈などの動脈硬化病変の経時的観察に成功した。これは比較的小型動物であるマウスやウサギでは観察困難な手技であり、MMPig において初めて可能となった。一般的にブタの寿命は 10 年以上であり、今後さらに長期間の飼育とエコーによる病変観察が可能になると考えられる。

以上、1) MMPig は高脂肪食に対してヒトと類似した反応を示し、2) スタチンに対する良好な薬効反応を示すこと、3) さらには、長期飼育による動脈硬化病変の非観血的評価が可能であることなどから、動脈硬化研究に非常に有用な新規の実験動物であることを示す結果をさらに提供した。

今年度は、今後の MMPig 研究の基盤的データとなりうる各臨床検査項目のリファレンスデータの報告を含む、3 報の英文論文を報告した。最終年度に向けては、血管リングを用いた *ex vivo* の研究にすでに着手している。また、昼夜サイクルの攪乱による睡眠障害モデルの導入を予定している。フルゲノムシーケンスの解析は今回報告しないが、約 50% のゲノムの解析に成功した。

研究分担者

宮本 篤	(鹿児島大学 共同獣医学部 教授)
三浦直樹	(鹿児島大学 共同獣医学部 准教授)
川口博明	(鹿児島大学 共同獣医学部 准教授)



## 項 目

A) スタチン投与の高脂血症に対する効果	<b>4-20</b>
1. 研究の目的	4
2. 試験日程	4
3. 材料及び方法	4-16
4. 結果	17-19
5. まとめ	19
6. 参考文献	20
B) 高脂肪・高コレステロール食による長期飼育での内膜肥厚の検証	<b>21-37</b>
1. 研究の目的	21
2. 試験日程	21
3. 材料及び方法	21-35
4. 結果	35-36
5. まとめ	37
6. 参考文献	37
C) 総括	<b>38</b>
D) 学会発表	<b>38</b>
E) 論文発表	<b>38</b>
F) 知的所有権の取得状況	<b>38</b>

<b>【参考資料 A】</b>	<b>A39-A93</b>
-----------------	----------------

Table A1 .....	Clinical signs
Table A2 .....	Body weight
Table A3 .....	Hematology
Table A4 .....	Blood chemistry
Table A5 .....	Necropsy
Table A6 .....	Organ weight

<b>【参考資料 B】</b>	<b>B94-B205</b>
-----------------	-----------------

Table B1 .....	Clinical signs
Table B2 .....	Body weight
Table B3 .....	Blood pressure
Table B4 .....	Heart rate
Table B5 .....	Hematology
Table B6 .....	Blood chemistry
Table B7 .....	Necropsy
Table B8 .....	Organ weight

## A) スタチン投与の高脂血症に対する効果

### 1. 研究の目的

比較的低濃度の高コレステロール食負荷で誘導される高脂血症に対する HMG-CoA reductase (スタチン) 阻害剤の効果を検討した。

### 2. 試験日程

給餌開始前日を-1 日目, 投与開始日を投与 0 日目, 投与開始週を投与 1 週目と起算した。

試験開始日: 2012 年 11 月 1 日

馴化開始日: 2012 年 11 月 1 日

馴化終了日/群分け日: 2012 年 11 月 13 日

特殊配合飼料給餌開始日及び投与開始日:  
2012 年 11 月 14 日

特殊配合飼料給終了日及び餌投与終了日:  
2013 年 2 月 6 日 (Nos. 1~3, 7~9, 13~15) 及び  
2013 年 2 月 11 日 (Nos. 4~6, 10~12, 16~18)

剖検日: 2013 年 2 月 7 日 (Nos. 1~3, 7~9, 13~15) 及び  
2013 年 2 月 12 日 (Nos. 4~6, 10~12, 16~18)

試験終了日: 2013 年 3 月 31 日

### 3. 材料及び方法

#### 3.1 被験物質

名称: HMG-CoA 還元酵素阻害薬  
(一般名: スタチン 商品名: アトルバスタチン)

製造元: ファイザー株式会社

保存条件: 室温

#### 3.2 被験物質の投与

投与経路: 経口 (混餌)

投与経路の選択理由: 被験物質の薬効を適切に評価できる経路のため

投与方法: 委託者より入手した被験物質をオブラートに包み、特殊配合飼料中にそのまま混じり、飼料と一緒に給餌摂取させた。

投与方法の選択理由: 混餌投与では通常用いられる方法である。

投与回数及び投与期間: 1 日 1 回, 週 7 日, 12 週間投与 (計 84 回投与)

投与回数及び投与期間の選択理由: 動脈硬化への薬効を確認できると推測される回数及び期間を設定した。

投与量： 3 mg/kg/day  
投与量は、最新の体重を基に個別に算出した。  
投与時刻： 飼料の摂餌時間及び除餌時間に合わせた。

### 3.3 試験系

種： ブタ  
品種： マイクロミニピッグ  
体重（馴化開始時）： 2.0～10.0 kg  
月齢（馴化開始時）： 3～4 ヶ月齢  
入荷日： 2012年10月15日  
入手日： 2012年10月31日  
入手動物数： 雄20匹  
使用動物数： 雄18匹  
繁殖生産者及び所在地： 富士マイクラ株式会社  
〒418-0005 静岡県富士宮市宮原 260-1

### 3.4 飼育条件

飼育室： 大動物試験区域 VIII  
温度： 許容範囲 20～26℃  
湿度： 許容範囲 35～70%  
換気回数： 15回／時間  
照明： 1日12時間（07：00～19：00点灯）の人工照明

#### 飼育ケージ

材質： ステンレス  
大きさ： 900 mm (D) × 900 mm (W) × 800 mm (H)  
収容数： 1匹／ケージ

#### 飼料

馴化期間中： 体重の約3%のマッシュ状飼料（こだから73，日清丸紅飼料株式会社）を1日1回09：00～13：00に与え，翌日の08：30～10：00に残った餌の回収を行った。なお，馴化開始日は体重測定及び観察終了後に餌を与えた。また，採血日，エコー検査日，心拍数測定日，血圧測定日及びX線CT検査日は，採血，測定あるいは検査終了後に餌を与えた。

給餌期間中： 1群には体重の約3%のマッシュ状飼料（こだから73，日清丸紅飼料株式会社）を，2及び3群には体重の約3%の特殊配合飼料を，3群にはさらに被験物質（3 mg/kg/day）をオブラートで包み混餌投与した。1日1回08：00～13：00に与え，翌日の08：

00～11：00に残った餌の回収を行った。剖検日の前日は、全例について17：00前後に残った餌を回収した。なお、採血日、エコー検査日、心拍数測定日、血圧測定日及びX線CT検査日は、採血あるいは測定終了後に餌を与えた。

飲水： 水道法水質基準に適合した水を自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

#### 清掃及び消毒

室内及びケージ： 水で毎日清掃した。また動物は4週間に1回以上洗浄・消毒済みのケージに移動した。

食器： 毎日水で洗浄済みの食器を使用した。

### 3.5 動物の識別法

個体： 馴化期間中は各個体の右耳介内側に油性インク、ネスコデルマーク（アルフレッサファーマ株式会社）あるいはアニマルマーカで記入したACN（Acclimation Number）により識別した。群分け以降は、左耳介内側に油性インク、ネスコデルマーク（アルフレッサファーマ株式会社）あるいはアニマルマーカで記入した動物番号により識別した。

ケージ： 馴化期間中は試験番号、ACN及び性別を表示したケージカードを使用した。群分け以降は試験番号、群、性別及び動物番号を表示したカラーケージカードを使用した。

### 3.6 馴化

検疫済みのマイクロミニピッグ（雄20匹）を入手し、その後、13日間の馴化期間を設けた。馴化期間中における観察及び検査の頻度ならびに方法の詳細については、「7.10. 観察及び検査項目」に記載した。ACN19及び20については、群分けまでに試験から除外した。

### 3.7 動物の群分け

馴化終了日に、群間で体重に偏りが生じないように、体重の層別無作為化（MiTOXシステム、Ver 2.0、三井造船システム技研株式会社）によって群分けした。群間で血清中脂質代謝マーカー〔総コレステロール、トリグリセリド及び低比重リポタンパク（LDL）〕のデータに有意差がないことを確認した。

### 3.8 試験群構成

群	飼料	脂肪 (w/w%)	コレステロール (w/w%)	給餌重量 (%/body)	被験物質量* (mg/kg/day)	動物数 (動物番号)
1	こだから 73	0	0	3	-	6 (1~6)
2	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	3	-	6 (7~12)
3	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	3	3	6 (13~18)

\*：被験物質は飼料に混合して，動物に与えた。

### 3.9 給餌重量設定の根拠

文献<sup>1,2)</sup>により，脂肪食を与えることにより動脈硬化が誘発されることが知られている．本試験では，特殊配合飼料（脂肪食）による動脈硬化モデルを作成するためにコレステロール配合量を設定し，動脈硬化に対するスタチンの薬効を確認できる量と推測される 3 mg/kg/day を設定した．

### 3.10 観察及び検査項目

#### 3.10.1 一般状態

##### 観察頻度

馴化期間中： 毎日 1 回

投与期間中： 毎日 1 回

剖検日： 1 回

観察方法： 生死の確認とあわせて一般状態観察を行った．

#### 3.10.2 体重

##### 測定時期

馴化期間中： 馴化開始日及び馴化終了日

投与期間中： 投与 0 日目より 7 日ごとに週 1 回（給餌前）

剖検日： 1 回（器官重量の相対重量及び剖検時の麻酔量算出のため）

測定方法： 電子天秤（HP-40K，HP-60K あるいは GP-60K，株式会社エー・アンド・デイ）で測定した．

#### 3.10.3 X 線 CT 検査

##### 検査時期

馴化期間中： -5 日目に 1 回

投与期間中： 投与 83，84 あるいは 85 日目に 1 回（12 週経過時，給餌前）

撮影方法： X 線 CT 装置（全身用 X 線 CT 装置 Auklet，東芝メディカル株



式会社)を用いて胸部から腹部(体幹部)を撮影した。

### 3.10.4 エコー検査

#### 検査時期

馴化期間中： -13あるいは-6日目のどちらかで1回

投与期間中： 投与83, 84あるいは85日目に1回(12週経過時, 給餌前)

測定方法： 超音波診断装置(LOGIQ Book XPあるいはVivid i, GEヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いて, 頸部血管を確認し, 頸動脈部位のIMT測定と動脈硬化あるいはそれに起因した変化の有無を調べた。(また, 臨床症状が認められた場合に心エコーの検査も実施した。)

### 3.10.5 血液採取

#### 検査時期

馴化期間中： -7日目に1回

投与期間中： 投与15, 28, 42, 56, 75及び83日目に1回(給餌前)

瀕死時： 剖検前(可能な限り)

剖検日： 投与85あるいは90日目

#### 採血量

馴化期間中, 瀕死時： 約26.3 mL

投与15, 28, 42, 75日目： 約13 mL

投与56日目： 約14.8 mL

投与83日目： 約24.5 mL

#### 剖検日

投与85日目： 約2.5 mL (Nos. 1~3, 7~9, 13~15)

投与90日目： 約4.3 mL (Nos. 4~6, 10~12, 16~18)

採血方法： 前大静脈洞から採血する。

#### 血液の処理

馴化期間中, 瀕死時

血清： 約12 mL採血し, 室温で20~60分間静置後, 遠心分離(室温, 1710×g, 3000 rpm, 10分間)して血清を得た。得られた血清を0.2 mL×1本(血清中ホモシステイン測定用, 測定担当者: 鹿児島大学 叶内 宏明), 0.7~1 mL×4本(血清中蛋白測定用), 0.5 mL×1本に分注し, 超低温フリーザー(許容範囲: -70°C以下)で凍結保存した。残り(約1 mL)を「3.10.7 血液生化学的検査」に使用した。

EDTA-2K全血： 約1 mLを「3.10.6 血液学的検査」に使用した。

- クエン酸全血： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を1 mL添加した注射筒を用いて約10 mL採血した。
- T-TAS 測定： 約1.8 mL採血し、直ちに指定のクエン酸採血管に入れ、すぐに転倒攪拌した。血液の採取後、直ちにT-TAS測定装置で計測した。
- クエン酸血漿： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を150  $\mu$ L添加した注射筒を用いて約1.5 mL採血し、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して得られた血漿を「3.10.6 血液学的検査」のプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に使用した。
- 投与15，28，42，75日目
- 血清： 約12 mL採血し、室温で20～60分間静置後、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して血清を得た。得られた血清を0.2 mL $\times$ 1本，0.7～1 mL $\times$ 4本（血清中蛋白測定用），0.5 mL $\times$ 1本に分注し、超低温フリーザー（許容範囲：-70 $^{\circ}$ C以下）で凍結保存した。残り（約1 mL）を「3.10.7 血液生化学的検査」に使用した。
- EDTA-2K 全血： 約1 mLを「3.10.6 血液学的検査」に使用した。
- 投与56日目
- 血清： 約12 mL採血し、室温で20～60分間静置後、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して血清を得た。得られた血清を0.2 mL $\times$ 1本，0.7～1 mL $\times$ 4本（血清中蛋白測定用），0.5 mL $\times$ 1本（に分注し，超低温フリーザー（許容範囲：-70 $^{\circ}$ C以下）で凍結保存した。残り（約1 mL）を「3.10.7 血液生化学的検査」に使用した。
- EDTA-2K 全血： 約1 mLを「3.10.6 血液学的検査」に使用した。
- T-TAS 測定： 約1.8 mL採血し、直ちに指定のクエン酸採血管に入れ、すぐに転倒攪拌した。血液の採取後、直ちにT-TAS測定装置で計測した。
- 投与83日目
- 血清： 約12 mL採血し、室温で20～60分間静置後、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して血清を得た。得られた血清を0.2 mL $\times$ 1本，0.7～1 mL $\times$ 4本（血清中蛋白測定用），0.5 mL $\times$ 1本に分注し，超低温フリーザー（許容範囲：-70 $^{\circ}$ C以下）で凍結保存した。残り（約1 mL）を「3.10.7 血液生化学的検査」に使用した。
- EDTA-2K 全血： 約1 mLを「3.10.6 血液学的検査」に使用する。

クエン酸全血： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を1 mL添加した注射筒を用いて約10 mL採血した。

クエン酸血漿： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を150  $\mu$ L添加した注射筒を用いて約1.5 mL採血し、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して得られた血漿を「3.10.6 血液学的検査」のプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の測定に使用した。

#### 剖検日

投与85日目（Nos. 1~3, 7~9, 13~15）

血清： 約2.5 mL採血し、室温で20~60分間静置後、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して血清約1 mLを得た。

投与90日目（Nos. 4~6, 10~12, 16~18）

血清： 約2.5 mL採血し、室温で20~60分間静置後、遠心分離（室温，1710 $\times$ g，3000rpm，10分間）して血清約1 mLを得た。

T-TAS測定： 約1.8 mL採血し、直ちに指定のクエン酸採血管に入れ、すぐに転倒攪拌した。血液の採取後、直ちにT-TAS測定装置で計測した。

写真撮影： 各検査日の血清をデジタルカメラで全例撮影した。

### 3.10.6 血液学的検査

#### 検査時期

馴化期間中： -7日目に1回

投与期間中： 投与15, 28, 42, 56, 75及び84日目に1回（給餌前）

瀕死時： 剖検前（可能な限り）

なお、CA-7000を用いる測定項目（PT, APTT）については、-7日目及び投与83日目のみ実施した。

採血方法： ADVIA120を用いる測定項目には、「3.10.5 血液採取」にて得られたEDTA-2K全血を使用した。CA-7000を用いる測定項目には、「3.10.5 血液採取」で得られた血漿を使用した。

検査項目及び方法： 次の表に示す。

検査項目	単位	測定方法	機種
赤血球	10 <sup>6</sup> / $\mu$ L	2角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 <sup>a)</sup>
白血球	10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
ヘマトクリット	%	計算式：（平均赤血球容積 $\times$ 赤血球）/10	
ヘモグロビン	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法	

検査項目	単位	測定方法	機種
血小板	10 <sup>3</sup> /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球容積	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球ヘモグロビン量	pg	計算式：（ヘモグロビン／赤血球）×10	
平均赤血球ヘモグロビン濃度	g/dL	計算式： [ヘモグロビン／（赤血球×平均赤血球容積）] ×1000	
プロトロンビン時間	s	凝固法	CA-7000 <sup>b)</sup>
活性化部分トロンボプラスチン時間	s	凝固法	

a) 総合血液学検査装置 (Siemens Healthcare Diagnostics Manufacturing Ltd.)

b) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社)

### 3.10.7 血液生化学的検査

#### 検査時期

馴化期間中： -7 日目に 1 回

投与期間中： 投与 15, 28, 42, 56, 75 及び 83 日目に 1 回 (給餌前)

瀕死時： 剖検前 (可能な限り)

採血方法： 「3.10.5 血液採取」にて得られた血清を用いた。

検査項目及び方法： 次の表に示す。

検査項目	単位	測定方法	機種
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	JCA-BM6070 <sup>a)</sup>
アラニンアミノトランスフェラーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
アルカリホスファターゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
乳酸脱水素酵素	IU/L	JSCC 標準化対応	
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
クレアチンキナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
アミラーゼ	IU/L	BG5P 基質法	
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
直接ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
総蛋白	g/dL	ビウレット法	
アルブミン	g/dL	BCG 法	
総コレステロール	mg/dL	COD-HMMPS 法	

検査項目	単位	測定方法	機種
遊離コレステロール	mg/dL	コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法	
トリグリセリド	mg/dL	GPO-HMMPS 法, グリセリン消去法	
ブドウ糖	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	
尿素窒素	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法	
クレアチニン	mg/dL	クレアチニナーゼ・HMMPS 法	
無機リン	mg/dL	PNP-XDH 法	
カルシウム	mg/dL	MXB 法	
ナトリウム	mEq/L	電極法	
カリウム	mEq/L	電極法	
塩素	mEq/L	電極法	
コレステロール分画 <sup>b)</sup>	%, mg/dL (整数値)	電気泳動法	エパライザ <sup>2)</sup>
ホモシステイン	μM		-

a) 自動分析装置（日本電子株式会社）

b) 検査項目：高比重リポタンパク（HDL），低比重リポタンパク（LDL），超低比重リポタンパク（VLDL），カイロミクロン（CM），TG 分画も合わせて実施する。

c) 全自動電気泳動分析装置（株式会社ヘレナ研究所）

### 3.10.8 病理学的検査

病理学的検査器官及び組織一覧表

器官及び組織名	器官重量	固定	凍結試料 送付	湿標本 送付	切り出し
気管	-	○	-	○	○
肺（気管支を含む）	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
舌	-	○	-	○	○
顎下腺	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
食道	胸部	○	-	○	○
胃	胃体部	○	-	○	○
	幽門部	○	-	○	○
小腸	十二指腸	○	-	○	○
	空腸	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	○
	回腸 <sup>a)</sup>	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	○
大腸	盲腸	○	-	○	○
	結腸	○	-	○	○
	直腸	○	-	○	○
膵臓	-	○	-	○	○
肝臓	○ <sup>d)</sup>	○	○ <sup>b, c, e)</sup>	○	○
胆嚢	-	○	-	○	○
大動脈 <sup>f)</sup>	-	○	○	○	-

器官及び組織名	器官重量	固定	凍結試料 送付	湿標本 送付	切り出し
心臓 <sup>d)</sup>	○	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	-
腎臓	左	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	○
	右	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	○
膀胱	-	○	-	○	○
精巣	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
精巣上体	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
前立腺	○	○	-	○	○
精嚢	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
脳 <sup>g, h)</sup>	大脳 <sup>i)</sup>	○	○	○	-
	小脳		○	○	-
	橋		○	○	-
	延髄		○	○	-
脊髄	胸部	-	○	-	○
坐骨神経	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
胸骨／胸骨骨髓	-	○	-	○	○
大腿骨／大腿骨骨髓	左	-	○	-	○ <sup>j)</sup>
	右	-	○	-	○ <sup>j)</sup>
顎下リンパ節	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
脾臓	○	○	○ <sup>b, c)</sup>	○	○
胸腺	○	○	-	○	○
下垂体	○	○	-	○	○
甲状腺	○	○	-	○	○
上皮小体	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
副腎	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
眼球／視神経	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
涙腺	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
骨格筋（大腿四頭筋）	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
皮膚（腹部）	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
皮膚（背部） <sup>l)</sup>	-	○	-	○	○
腸間膜脂肪 <sup>m)</sup>	○	○	-	○	○
大網	○	○	-	○	○
腰椎 <sup>n)</sup>	-	○	-	○	-
腋窩動脈 <sup>o)</sup>	-	-	○	-	-
肉眼的異常部位	-	○	-	○	○

○：実施した

-：実施しなかった

a) パイエル板を含む部分及び含まない部分の2ヵ所

b) 5 mm 角2片を1本のチューブに入れ、それぞれの臓器で5本

c) 5 mm 角に細断した組織片の3サンプル／例、肝臓は外側左葉：遺伝子解析用とした

d) 胆嚢を含む



- e) 2分割ノ例, 外側右葉: 肝葉物代謝酵素測定用とした
- f) 大動脈弓から外・内腸骨動脈の全域, 左右頸動脈及び左右腎動脈含む, 心臓及び大動脈は容器に固定液とともに入れた. 大動脈弓部 (心臓との切断面) は厚さ 2mm 程度でスライスし, ドーナツ状の組織片を 5mm 程度に細断し, 遺伝子解析用 (RNAlater に浸して冷蔵保存) と凍結保存用の 2つのチューブに分けた.
- g) 脳底動脈から大脳動脈輪を含む
- h) 脳は容器に固定液とともに入れた
- i) 頭頂葉, 側頭葉, 間脳
- j) 骨幹部
- k) 腰部, 皮下脂肪を含む
- l) 腸間膜リンパ節を含む
- m) L4: ホルマリン固定, L5: 70%エタノール固定
- n) 腋窩動脈は 1 サンプル (左右それぞれ) を凍結

### 3.10.8.1 剖検

#### 検査時期

- 死亡例: 発見後速やかに実施する.
- 瀕死例: 試験責任者の判断により, 速やかに実施する.
- 生存例: 投与期間終了の翌日

#### 検査方法

- 死亡例: 体重を測定後, 外表, 内部器官及び組織を肉眼的に観察する.
- 瀕死例及び生存例: 体重を測定後, メデトミジン水溶液 (ドミツール, Orion Corporation, 1 mg/mL, 0.04 mL/kg), 塩酸ケタミン水溶液 (Kamud Drugs Pvt. Ltd., 50 mg/mL, 0.1 mL/kg) 及びミダゾラム (10mg/2mL, 0.04mL/kg) を筋肉内投与し, 「16.7 血液採取」に従い採血後に, ペントバルビタールナトリウム (東京化成工業株式会社) 水溶液 (64.8 mg/mL, 0.5 mL/kg) の前大静脈洞からの静脈内投与あるいは耳介静脈内投与により麻酔を行い, 放血安楽死させ, 外表, 内部器官及び組織を肉眼的に観察する.

### 3.10.8.2 器官重量 (絶対及び相対重量)

- 測定方法: 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す器官について, 電子天秤 (HR-200, FX-3000N, GF-3000 あるいは HF-3000, 株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて測定した. さらに, 剖検時の体重から 1 kg あたりの相対重量を算出した. なお, 左右個別に測定した器官については, 左右の合計値も算出した.

### 3.10.8.3 臓器の固定及び切り出し

- 検査器官及び組織: 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す.
- 固定方法 (湿標本): 器官及び組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した. 肉眼的異常部位として摘出した場合, 眼球及び視神経は 3%グ

ルターールアルデヒド・2.5%ホルマリン混合液，精巢はブアン液，その他の器官及び組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する．切り出し後，固定液に浸した．また，腰椎に関しては，L4 は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定，L5 を 70%エタノールで固定した．

標本作製： 固定及び切り出しを実施後，標本を作製した．

#### 3.10.8.4 肝臓外側左葉，腎臓，心臓，脾臓，空腸，回腸の凍結組織の採取

採取時期： 剖検時

採取器官及び組織： 肝臓外側左葉，腎臓，心臓，脾臓，空腸，回腸

採取方法： 肝臓外側左葉，腎臓（左，皮質），心臓（心臓尖部），脾臓，空腸（膵臓付着遠位端から遠位 5cm の部位），回腸（回盲口から近位 5cm の部位，パイエル板は避ける）は 5mm 角 2 片を 1 本のチューブに入れそれぞれの臓器で 5 本ずつ採取した．液体窒素にて凍結させ，超低温フリーザー（許容範囲：-70℃ 以下）で保存した．なお，サンプル採取部位はできるだけ肉眼観察で病変の強くない部位とした．

#### 3.10.8.5 遺伝子解析用組織の採取

採取時期： 剖検時

採取器官及び組織： 肝臓外側左葉，腎臓，心臓，脾臓，空腸，回腸，大動脈弓部

採取方法： 各臓器の採取にあたっては RNAase の混入を防ぐため清潔な器具を使用し，開腹後に出来るだけ速やかに実施した（開腹後 10 分以内）．肝臓外側左葉，腎臓（左，皮質），心臓（心臓尖部），脾臓，空腸（膵臓付着遠位端から遠位 5cm の部位），回腸（回盲口から近位 5 cm の部位，可能な限りパイエル板は避ける）から 5mm 角 3 片を採取し，1 サンプルずつ RNAlater（1 mL）を分注したチューブ（にそれぞれ入れ，送付時まで冷蔵庫（許容範囲：1~9℃）で保存した．なお，サンプル採取部位はできるだけ肉眼観察で病変の強くない部位とした．大動脈弓部の採取については心臓との切断面のリングを厚さ 2mm 程度でスライスし，ドーナツ状の組織片を得た．さらに 5mm 程度に細断して，数個（6 個程度）の組織片を得た．均等に半分にし，半分をまとめて RNAlater（1 mL）を分注したチューブに 1 本に入れ，送付時まで冷蔵庫（許容範囲：1~9℃）で保存した．残りの半分は「3.10.8.7 腋窩動脈の採取」で凍結した．

#### 3.10.8.6 腋窩動脈の採取

採取時期： 剖検時  
採取器官： 左右腋窩動脈（分岐部より 1cm 遠位の部位），大動脈弓部（心臓との切断面）  
採取方法： 左右の腋窩動脈を採取し，適当な長さ（1cm 前後）採取し，それぞれチューブに入れ液体窒素にて凍結させ，超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で送付時まで保存した。

#### 3.10.8.7 髄液の採取

採取時期： 剖検時  
採取量： 1 mL 以上  
採取方法： 脳室に注射針を穿刺し，注射筒で採取する．採取後は液体窒素にて凍結させ，超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で送付時まで保存した。

#### 3.10.9 便採取

採取時期  
馴化期間中： -7 日目に 1 回  
投与期間中： 投与 15, 28, 42, 56, 75 及び 83 日目に 1 回（給餌前）  
採取方法： ケージ内に残存する便を，便の表面を含むように 1.5 mL エッペンチューブ 2 本に適量の便を採取し，冷蔵した。

#### 3.11 統計学的手法

馴化期間中及びモデル作製期間中の体重，血液学的検査，血液生化学的検査，器官重量（絶対及び相対重量）のデータについては，「1 群」と「特殊配合飼料群（2 群）及び薬物含有特殊配合飼料（3 群）」の各 2 群間の比較を行った．また，2 群と 3 群についても群間の比較を行った．各データはまず，F 検定により等分散性の検定を行い，等分散の場合は student-t 検定を行う．F 検定により等分散性が認められなかった場合は Welch の検定を行った．これらの検定及び計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア（ユックムス株式会社）を使用し，有意水準は 5%（片側）とした．一般状態，X 線 CT 検査，エコー検査及び剖検所見については検定を実施しなかった。

## 結果及び考察

### 4. 結果

#### 4.1 一般状態

(Tables A1-1～A1-2)

結果の詳細は Table A1 に示した。

観察期間を通じて、全例で死亡、瀕死屠殺はみられなかった。

一般状態において全例で異常はみられなかった。

#### 4.2 体重

(Table A2)

体重結果の詳細は Table A2 に示した。

対照群と比較し、統計学的に有意な体重増加が 2 群（脂肪食）で投与後 50 日目から投与期間終了時までみられ、3 群（脂肪食+スタチン投与）で投与後 35 日目から投与期間終了時までみられた。なお、2 群と 3 群の間では統計学的な有意差はみられなかった。

これらの結果から脂肪食による体重増加の影響は示唆されたが、スタチンによる明確な効果は確認できなかった。

#### 4.3 血液学的検査

(Tables A3-1～A3-9)

血液学的検査結果の詳細は Table A3 に示した。

脂肪食による影響、スタチンによる影響はみられなかった。

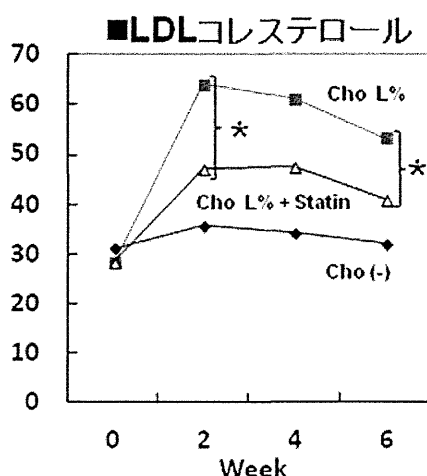
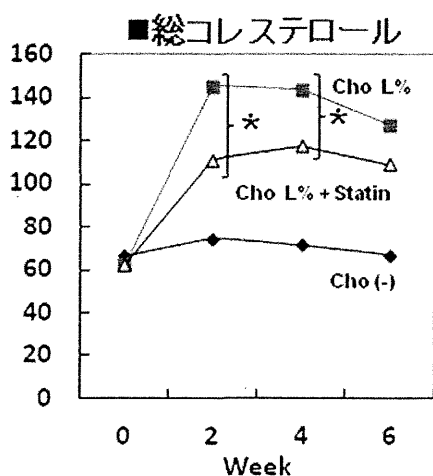
なお、対照群と比較し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度及び MCHC の統計学的に有意な低値、血小板の統計学的に有意な高値が 2 群あるいは 3 群で投与期間中に散見され、PT 及び APTT の統計学的に有意な高値が 3 群で散見されたが、投与期間を通じてではなく一過性の変化であるため、あるいは投与前値から著変のない変化であるため、あるいは個別値では異常値ではないため、あるいは他に関連する変化がみられていないため、あるいは以前の試験で脂肪食摂餌モデルではみられなかった変化であるため、これらの変化は偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

#### 4.4 血液生化学的検査

(Tables A4-1～A4-38)

血液生化学的検査の結果の詳細は Table A4 に示した。

対照群と比較し、総コレステロール、遊離コレステロール、HDL コレステロール濃度の統計学的に有意な増加が、2 群（脂肪食）及び 3 群（脂肪食+スタチン投与）で投与後 15 日目



対照群と比較し、BUNの有意な減少が2群及び3群で、投与後15日目から投与期間終了時までみられ、特殊配合飼料摂取あるいはスタチン投与との関連性及び原因は不明であった。また、カイロミクロンコレステロール濃度の有意な減少が2あるいは3群でみられたが、他のコレステロール分画の動きと異なる動きであり、特殊配合飼料摂取あるいはスタチン投与との関連性及び原因は不明であった。

なお、対照群と比較し、2群あるいは3群で、ALT、ALP、ALP、アミラーゼ、直接ビリルビン、総蛋白、アルブミン、Ca、K、HDLトリグリセリド濃度及び比率、VLDLトリグリセリド濃度及び比率の統計学的に有意な低値がみられ、クレアチニン、Cl、LDLトリグリセリド濃度、カイロミクロントリグリセリド濃度及び比率、LDLトリグリセリド比率の統計学的に有意な高値がみられ、総ビリルビン、グルコース、無機リン、LDH及びClの統計学的に有意な低値及び高値がみられた。これらの変化は投与期間を通じてではなく一過性の変化であることや、投与前値から著変のない変化であるため、個別値では異常値ではないため、他に関連する変化がみられていないため、あるいは、以前の試験で脂肪食摂取モデルではみられなかった変化であるため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

2群と比較し、3群でALT、ALP、LDH、 $\gamma$ -GT、CK、LDLトリグリセリド濃度の統計学的に有意な高値が、総蛋白、グルコース、無機リンの統計学的に有意な低値がみられた。これらの変化は投与期間を通じてではなく一過性の変化であることや、投与前値から著変のない変化であるため、個別値では異常値ではないため、あるいは他に関連する変化がみられていないため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

#### 4.5 剖検所見

(Table A5)

3群（脂肪食+スタチン投与）の1例（No. 13）で心臓：白色線条（左冠状動脈，軽度）がみられた。

これらの結果から脂肪食による影響が示唆されたが，スタチンの効果は肉眼変化ではみられなかった。

なお，3群の1例（No. 14）で，心臓の左冠状動脈の欠損，大腿骨の骨折，対照群の1例（No. 1）で精巣上体のう胞がみられたが，偶発変化と考えられた。

#### 4.6 器官重量

(Tables A6-1～A6-4)

器官重量の結果の詳細は Table A6 に示した。

対照群と比較し，2群（脂肪食）及び3群（脂肪食+スタチン投与）で腸間膜脂肪の絶対及び相対重量の統計学的に有意な高値がみられた。3群では大網の絶対及び相対重量の統計学的に有意な高値がみられ，2群も高値傾向であった。また，肝臓の絶対重量も2及び3群で高値傾向がみられた。2群及び3群で明確な違いはみられなかった。

これらの結果から脂肪食による影響が示唆されたが，スタチンの効果は器官重量ではみられなかった。

なお，対照群と比較し，2群で下垂体及び胸腺の絶対重量の統計学的に有意な高値，3群で右及び左右腎臓の絶対重量の統計学的に有意な高値，精巣の相対重量の統計学的に有意な低値，2及び3群で副腎及び心臓の相対重量の有意な低値がみられたが，個別値では通常値であるため，片側性的変化であるため，絶対あるいは相対重量のみの変化であるため，他に関連する変化がみられていないため，あるいは，以前の試験で脂肪食摂餌モデルではみられなかった変化であるため，偶発変化と考えられた。

2群と比較し，3群で下垂体の絶対重量の統計学的に有意な低値がみられたが，個別値では通常値であるため，絶対重量のみの変化であるため，及び関連する変化はみられていないため，偶発変化と考えられた。

#### 5. まとめ

平成24年度には，比較的低濃度の高コレステロール食負荷で誘導される高脂血症に対する HMG-CoA reductase (スタチン) の阻害剤の効果を検討した。8週間の実験において，スタチンは有意に高脂血症の改善効果を示した。マウスよりヒトに近い解剖・生理を有する MMPig において，臨床使用薬剤の効果を示した意義は小さくはない。