

6. 参考文献

- 1) Miyoshi N, Tanimoto A, Yoshida H, Kawaguchi H, *et al.* Novel Microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *In Vivo*, 24(5): 671-80, 2010.
- 2) Kawaguchi H, Miyoshi N, Tanimoto A, Yoshida H, *et al.* Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: Novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet. *J Pharmacol Sci.*, 115(2): 115-21, 2011.
- 3) Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Takahashi Y, Yoshikawa T, Izumi H, Kawarasaki T, Miyoshi N and Tanimoto A. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest Microminipigs. *J Vet Med Sci.*, 74(7): 933–936, 2012.

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

1. 研究の目的

1年以上の長期飼育時の高脂血症および動脈硬化病変の形成について検討する。とくに、エコーによる頸動脈，冠状動脈，大動脈の動脈硬化病変の経時的観察を試みた。

2. 試験日程

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

試験開始日： 2012年3月22日

(ACN 1~15 あるいは Animal No. 1~15)

馴化開始日： 2012年3月22日

馴化終了日/群分け日： 2012年4月3日

給餌開始日： 2012年4月4日

給餌終了日： 2013年3月6日

剖検日： 2013年3月7日

(Animal No. 16, 17)

馴化開始日： 2012年12月7日

馴化終了日： 2012年12月11日

給餌開始日： 2012年12月12日

剖検日： 2013年11月14日

3. 材料及び方法

3.1 試験系

種： ブタ

品種： マイクロミニピッグ

体重(馴化開始時)： 4.0~8.0 kg (ACN 1~15)， 7.0~13.0 kg (Animal No. 16, 17)

月齢(馴化開始時)： 3~4 ヲ月齡 (ACN 1~15)， 4~6 ヲ月齡 (Animal No. 16, 17)

入荷日： 2012年3月1日 (ACN 1~15)， 2012年10月15日 (Animal No. 16, 17)

入手日： 2012年3月22日 (ACN 1~15)， 2012年12月6日 (Animal No. 16, 17)

入手動物数： 雄15匹 (Animal No. 1~15)， 雄2匹 (Animal No. 16, 17)

なお，Animal No. 16, 17は，それぞれSBL703-024で使用したACN19及び20を使用した。

使用動物数： 雄15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

3.2 飼育条件

飼育室：	1017 号室
温度：	許容範囲 20～26°C
湿度：	許容範囲 30～70%
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) あるいは、980 mm (D) × 1800 mm (W) × 900 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．Animal No. 16 及び 17 については体重の約 2%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，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：	2012 年 4 月 4 日～2012 年 7 月 3 日までは，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，2012 年 7 月 4 日～2012 年 9 月 18 日までは，1 群には体重の約 2.5%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 2.5%の特殊配合飼料（を，2012 年 9 月 19 日以降は，1 群には体重の約 2%のマッシュ状飼料（こだから 73，日清丸紅飼料株式会社）を（ただし動物番号 2 は体重の約 2.5%，2012 年 10 月 3 日以降は動物番号 1 は体重の約 1.7%2012 年 11 月 14 日以降は動物番号 3 は体重の約 2.5%，体重が 20 kg を超えた動物は体重の約 1.6%のマッシュ状飼料を与えた），2 及び 3 群には体重の約 2%の特殊配合飼料を（ただし動物番号 6 及び 15 は 2012 年 10 月 3 日以降は体重の約 1.7%，体重が 20 kg を超えた動物については 2012 年 11 月 14 日以降は体重の約 1.6%の特殊配合飼料を与えた），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．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。

清掃及び消毒

室内及びケージ： 水で毎日清掃した。
食器： 毎日水で洗浄済みの食器を使用した。

3.3 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。なお、Animal No. 16, 17 は馴化期間中から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。なお、Animal No. 16, 17 は馴化期間中から試験番号、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。

3.4 馴化

検疫済みのマイクロミニピッグ（雄 15 匹）を入手し、その後、13 日間の馴化期間を設けた。また、追加で検疫済みのマイクロミニピッグ（雄 2 匹）を入手し、その後、5 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、「3.8. 観察及び検査項目」に記載した。

3.5 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。なお、Animal No. 16, 17 はそのまま対照群に割り当てた。

3.6 試験群構成

群	飼料	脂肪 (w/w%)	コレステロール (w/w%)	コール酸ナトリウム (w/w%)	給餌重量 (%/body)	動物数 (動物番号)
1	こだから 73	0	0	0	3	7 (1~5, 16, 17) *
2	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.03	0	3	5 (6~10)
3	特殊配合飼料 (脂肪食)	12	0.1	0	3	5 (11~15)

* : 動物番号 4 の動物は、2012 年 6 月 13 日に試験から除外した。

3.7 給餌重量設定の根拠

文献^{1, 2)}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、長期間の特殊配合飼料(脂肪食)による脳梗塞及び心筋梗塞の病変を確認するため、コレステロール配合量を 2 用量設定した。

3.8 観察及び検査項目

3.8.1 一般状態

観察頻度

馴化期間中： 毎日 1 回以上

給餌期間中： 毎日 1 回以上

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。

3.8.2 体重

測定時期

馴化期間中： 馴化開始日及び馴化終了日

給餌期間中： 給餌 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。

3.8.3 血圧測定

測定時期

馴化期間中： -7 日目に 1 回

ただし、Animal No. 16, 17 は-5~-1 日目の間に 1 回実施した。

給餌期間中： 給餌 84 あるいは 85 日目*に 1 回, 168 あるいは 169 日目に 1 回, 245 あるいは 246 日目に 1 回, 及び 328 あるいは 329 日目に 1

測定方法： 回（12, 24, 35 あるいは 36, 47 あるいは 48 週経過時，給餌前）
*： Animal No. 16, 17 は給餌 76 あるいは 77 日目に実施した。
無麻酔下で生体情報モニタ（BX-10 あるいは BX-10AD, オムロン
コーリン株式会社）を用いて，前肢あるいは上腕から測定し
た。

評価項目： 拡張期圧及び収縮期圧

3.8.4 心拍数測定

測定時期

馴化期間中： -7 日目に 1 回

ただし，Animal No. 16, 17 は-5~-1 日目の間に 1 回実施した。

給餌期間中： 給餌 84 あるいは 85 日目*に 1 回, 168 あるいは 169 日目に 1 回,
245 あるいは 246 日目に 1 回，及び 328 あるいは 329 日目に 1
回（12, 24, 35 あるいは 36, 47 あるいは 48 週経過時，給餌前）
*： Animal No. 16, 17 は給餌 76 あるいは 77 日目に実施した。

測定方法： 「3.7.3 血圧測定」の測定時に生体情報モニタ（BX-10 あるいは
BX-10AD, オムロンコーリン株式会社）に表示される値を記録
した。

3.8.5 X線 CT 検査

検査時期

馴化期間中： -12 あるいは-7 日目に 1 回

ただし，Animal No. 16, 17 は-5~-1 日目の間に 1 回実施した。

給餌期間中： 給餌 84 あるいは 85 日目*に 1 回, 168 あるいは 169 日目に 1 回,
245 あるいは 246 日目に 1 回，及び 328 あるいは 329 日目に 1
回（12, 24, 35 あるいは 36, 47 あるいは 48 週経過時，給餌前）
*： Animal No. 16, 17 は給餌 76 あるいは 77 日目に実施した。

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。

3.8.6 エコー検査

検査時期

馴化期間中： -12 あるいは-7 日目に 1 回

ただし，Animal No. 16, 17 は馴化期間中の検査は実施せず，
SBL703-024 の馴化時の ACN19, 20 のデータを採用した。

給餌期間中： 給餌 63 あるいは 70 日目*に 1 回, 84 あるいは 85 日目*に 1 回,
168 あるいは 169 日目に 1 回, 245 あるいは 246 日目に 1 回，及

び 328 あるいは 329 日目に 1 回 (9 あるいは 10 週経過時, 12, 24, 35 あるいは 36, 47 あるいは 48 週経過時, 給餌前)

* : Animal No. 16, 17 は給餌 76 あるいは 77 日目に実施した.

測定方法 :

超音波診断装置 (SONOS7500, 株式会社フィリップス エレクトロニクス ジャパン メディカル システムズ, 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, 冠状動脈および大動脈の 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.

3.8.7 血液採取

検査時期

馴化期間中 :

-12 及び -5 日目に 1 回

ただし, Animal No. 16, 17 は馴化期間中の検査は実施せず, SBL703-024 の馴化時の ACN19, 20 のデータを採用した.

給餌期間中 :

給餌 14, 28, 56 (Animal No. 16, 17 は給餌 55 日目), 83, 117 (Animal No. 16, 17 は給餌 118 日目), 140, 174, 195, 224, 258, 280, 307 及び 335 日目 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 及び 48 週経過時) に 1 回 (給餌前)

瀕死時 :

剖検前 (可能な限り)

剖検日 :

給餌 337 あるいは 338 日目

採血量

-12 日目 :

約 16.3 mL

-5 日目 :

約 5 mL

給餌 83, 174 及び 258 日目, 瀕死時 :

約 21.3 mL

給餌 335 日目 :

約 23.8 mL

給餌 14, 28, 56 (Animal No. 16, 17 は給餌 55 日目), 117 (Animal No. 16, 17 は給餌 118 日目), 140, 195, 224, 280 及び 307 日目 :

約 19.5 mL

採血方法 :

前大静脈洞から採血した.

血液の処理

-5 日目 :

EDTA-2K で抗凝固処理した全血約 5 mL を採取した.

-12 日目, 給餌 83, 174 日目, 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, 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「3.7.9 血液生化学的検査」に使用した。
- EDTA-2K 全血： 約 6 mL 採血し，EDTA-2K で抗凝固処理した全血のうち 1 mL を「3.7.8 血液学的検査」に使用した。ただし，-12 日目については，約 1mL 採血し，EDTA-2K で抗凝固処理した全血をすべて「3.7.8 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。（
- クエン酸血漿： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を 150 μ L 添加した注射筒を用いて約 1.5mL 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「3.7.8 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。
- 給餌 335 日目：
- 血清： 約 14.5 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，1 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「3.7.9 血液生化学的検査」に使用した。
- EDTA-2K 全血： 約 6 mL 採血し，EDTA-2K で抗凝固処理した全血のうち 1 mL を「3.7.8 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。
- クエン酸血漿： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を 150 μ 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「3.7.8 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。
- 給餌 14，28，56（Animal No. 16，17 は給餌 55 日目），117（Animal No. 16，17 は給餌 118 日目），140，195，224，280 及び 307 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，0.5 mL \times 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「3.7.9 血液生化学的検査」に使用した。

EDTA-2K 全血： 約6 mL採血し、EDTA-2Kで抗凝固処理した全血のうち1 mLを「6.7.8 血液学的検査」に使用した。

クエン酸血漿： 3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液を150μL添加した注射筒を用いて約1.5mL採血し、遠心分離（室温，1710×g，3000rpm，10分間）して得られた血漿を「3.7.8 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。

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。

3.8.8 血液学的検査

検査時期

馴化期間中： -12日目に1回
ただし，Animal No. 16, 17は馴化期間中の検査は実施せず，SBL703-024の馴化時のACN19, 20のデータを採用した。

給餌期間中： 給餌14, 28, 56（Animal No. 16, 17は給餌55日目），83, 117（Animal No. 16, 17は給餌118日目），140, 174, 195, 224, 258, 280, 307及び335日目（2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44及び48週経過時）に1回（給餌前）

瀕死時： 剖検前（可能な限り）

採血方法： ADVIA120を用いる測定項目には，「6.7.7 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，「6.7.7 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 ⁶ /μL	2角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 ^{a)}
白血球	10 ³ /μL	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×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	
血小板	10 ³ /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	

検査項目	単位	測定方法	機種
プロトロンビン時間	s	凝固法	CA-7000 ^{b)}
活性化部分トロンボプラスチン時間	s	凝固法	

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

e) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社)

3.8.9 血液生化学的検査

検査時期

馴化期間中： -12 日目に 1 回

ただし, Animal No. 16, 17 は馴化期間中の検査は実施せず, SBL703-024 の馴化時の ACN19, 20 のデータを採用した.

給餌期間中： 給餌 14, 28, 56 (Animal No. 16, 17 は給餌 55 日目), 83, 117 (Animal No. 16, 17 は給餌 118 日目), 140, 174, 195, 224, 258, 280, 307 及び 335 日目 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 及び 48 週経過時) に 1 回 (給餌前)

瀕死時： 剖検前 (可能な限り)

採血方法： 「6.7.7 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 ^{a)}
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-HDAOS 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	JCA-BM6070 ^{a)}
トリグリセリド	mg/dL	GPO-HDAOS 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・F-DAOS 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 ^{b)}	%, mg/dL (整数値)	電気泳動法	エパライザ ^{2c)}
ホモシステイン	μM		-

f) 自動分析装置（日本電子株式会社）

g) 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した。

h) 全自動電気泳動分析装置（株式会社ヘレナ研究所）

3.8.10 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	○	○ ^{b, c)}	○	○
	回腸 ^{a)}	○	○ ^{b, c)}	○	○
大腸	盲腸	○	-	○	○
	結腸	○	-	○	○
	直腸	○	-	○	○
膵臓	-	○	-	○	○
肝臓	○ ^{d)}	○	○ ^{b, c, e)}	○	○
胆嚢	-	○	-	○	○
大動脈 ^{f)}	-	○	○	○	-

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 ^{d)}	○	○	○ ^{b, c)}	○	-
腎臓	左	○	○ ^{b, c)}	○	○
	右	○	○ ^{b, c)}	○	○
膀胱	-	○	-	○	○
精巣	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
精巣上体	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
前立腺	○	○	-	○	○
精嚢	左	○	-	○	○
	右	○	-	○	○
脳 ^{g, h)}	大脳 ⁱ⁾	○	○	○	-
	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	-	○	-	○ ^{j)}
	右	-	○	-	○ ^{j)}
顎下リンパ節	左	-	○	-	○
	右	-	○	-	○
脾臓	○	○	○ ^{b, c, k)}	○	○
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） ^{l)}	-	○	-	○	○
腸間膜脂肪 ^{m)}	○	○	-	○	○
大網	○	○	-	○	○
腰椎 ⁿ⁾	-	○	-	○	-
膝関節（後肢）	左	-	○	-	-
	右	-	○	-	-
腋窩動脈 ^{o)}	-	-	○	-	-
肉眼的異常部位	-	○	-	○	○

○：実施する

-：実施しない

o) パイエル板を含む部分及び含まない部分の2カ所

p) 5 mm 角2片を1本のチューブ（試験委託者指定のチューブ）に入れ、それぞれの臓器で5本

- q) 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
- r) 胆嚢を含む
- s) 2 分割/例, 外側右葉: 肝薬物代謝酵素測定用とした
- t) 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.
- u) 脳底動脈から大脳動脈輪を含む
- v) 脳は容器に固定液とともに入れた
- w) 頭頂葉, 側頭葉, 間脳
- x) 骨幹部
- y) 2 g を 1 サンプル/例: 抗体ライブラリ用とした
- z) 腰部, 皮下脂肪を含む
- aa) 腸間膜リンパ節を含む
- bb) L4: ホルマリン固定, L5: 70%エタノール固定
- cc) 腋窩動脈は 1 サンプル(左右それぞれ)を凍結

3.8.10.1 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: 給餌期間終了の翌日

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, メドトミジン水溶液(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, 「3.7.7 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した.

3.8.10.2 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.

3.8.10.3 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%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン混合液、精巣はブアン液、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した。切り出し後、固定液に浸した。なお、脳、心臓及び大動脈は容器に 10%中性緩衝ホルマリン液を入れた。

標本作製： 固定及び切り出しを実施後、標本を作製した。

3.8.10.4 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（脾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°C 以下）で送付時まで保存した。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。

3.8.10.5 薬物代謝酵素用の肝臓組織の採取

採取時期： 剖検時

採取器官及び組織： 肝臓（外側右葉）

採取方法： 器官重量実施後に、肝臓外側右葉を 2 分割（横断）し、サンプルパック×2 個に入れて、速やかに液体窒素にて凍結させた。

3.8.10.6 遺伝子解析用の組織の採取

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（脾臓付着遠位端から遠位 5 cm 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た）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°C）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。それを 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°C）で保存した。残りの半分は「3.7.10.9 腋窩動脈の採取」で凍結した。

3.8.10.7 抗体ライブラリ用の脾臓組織の採取

採取時期： 剖検時
採取器官及び組織： 脾臓
採取方法： 50mL のファルコンチューブに脾臓 2g を 1 サンプル採取し、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。

3.8.10.8 腋窩動脈の採取

採取時期： 剖検時
採取器官： 左腋窩動脈（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（1 cm 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）で保存した。大動脈弓部については、「3.7.10.6 遺伝子解析用の組織の採取」の採取方法にて、採取した大動脈弓部の半分（遺伝子解析用の組織の採取に使用しなかった残り）を 1 本の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）で保存した。

3.8.10.9 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、注射筒で採取した。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。

3.8.11 便採取

採取時期
馴化期間中： -7 日目に 1 回（給餌前）
給餌期間中： 給餌 83, 168, 258 及び 335 日目（給餌前）

3.9 統計学的手法

馴化期間中及びモデル作製期間中の体重、血圧測定、心拍数測定、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及び3群）」の各2群間の比較を行う。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 の検定を行う。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%とする。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い。

4. 結果および考察

4.1 一般状態

(Tables B1-1~B1-5)

結果の詳細は Table B1 に示した。

特殊配合飼料による影響はいずれの動物においてもみられなかった。

なお、対照群の1例（No. 2）で投与後221日目に横臥位、体温低下がみられ、試験から除外した。また、1例（No. 4）は、体重の増加がみられず、異常動物と判断し、71日目に試験から除外した。1例（No.3）で給餌246日目に死亡した。また、2群の1例（No. 8）で329日目に死亡がみられた。これらは、原因不明であるが、高用量の3群でみられなかった変化であり、特殊配合飼料の摂餌とは無関係の偶発変化と考えられた。

4.2 体重

(Tables B2-1~B2-4)

結果の詳細は Table B2 に示した。

2群及び3群で、対照群と比較し体重増加が大きく、これは特殊配合飼料の摂餌に起因した変化と考えられた。

なお、2群の体重の小さな動物が1例死亡したため、観察終了時点（給餌48週終了時点：49週目）では、2群と3群の体重平均値で用量依存はみられなかった。

4.3 血圧測定

(Table B3)

結果の詳細は Table B3 に示した。

特殊配合飼料による影響はいずれの動物においてもみられなかった。

4.4 心拍数測定

(Table B4)

結果の詳細は Table B4 に示した。

特殊配合飼料による影響はいずれの動物においてもみられなかった。

4.5 血液学的検査

(Tables B5-1~B5-20)

結果の詳細は Table B5 に示した。

特殊配合飼料による影響はいずれの動物においてもみられなかった。

4.6 血液生化学的検査

(Tables B6-1~B6-76)

結果の詳細は Table B6 に示した。

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、LDL コレステロールの増加が、給餌 2 週目終了時点（3 週目）から、観察終了時（給餌 48 週終了時点：49 週目）まで継続してみられた。これらは 2 群よりも 3 群の方が高い値を示し、特殊配合飼料の用量に関連していた。

対照群と比較し、尿素窒素の減少が 2 及び 3 群でみられたが、特殊配合飼料摂取との関連性及び原因は不明であった。

4.7 動脈エコー所見

3 群（0.1% コレステロール投与群）では、投与 9 ヶ月目で、頸動脈、冠状動脈、大動脈に動脈硬化による肥厚性病変が観察され、内膜・中膜比の増加が見られた。2 群（0.03% コレステロール投与群）においては、対象群と比較して有意な差は見られなかった。

4.8 剖検所見

(Table 7)

結果の詳細は Table B7 に示した。

3 群の 2 例（No. 14, 15）で大動脈の白色線条がみられ、特殊配合飼料摂取に起因した変化と考えられた。

その他、2 群の 1 例（No. 10）で頸動脈の血管壁の肥厚、3 群の 1 例（No. 13）で頸動脈の結節、2 例（No. 14, 15）で心膜腔の心嚢水貯留、心臓の赤色巣、頸動脈の硬結がみられた。

なお、対照群の 1 例（No. 5）で腎臓の嚢胞がみられた。

4.9 器官重量（絶対及び相対重量）

(Tables B8-1～B8-4)

結果の詳細は Table B8 に示した。

大綱，腸間膜脂肪の絶対及び相対重量が，対照群と比較し高値傾向を示した。これらは特殊配合飼料摂取に起因した変化と考えられたが，群平均値では2群の方が3群より高値であり，明らかな用量相関性はみられなかった。

5. まとめ

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。

6. 参考文献

- 1) Miyoshi N, Tanimotio A, Yoshida H, Kawaguchi H, *et al.* Novel Microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *In Vivo*, 24(5): 671-80, 2010.
- 2) Kawaguchi H, Miyoshi N, Tanimoto A, Yoshida H, *et al.* Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: Novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet. *J Pharmacol Sci.*, 115(2): 115-21, 2011.
- 3) Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Takahashi Y, Yoshikawa T, Izumi H, Kawarasaki T, Miyoshi N and Tanimoto A. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest Microminipigs. *J Vet Med Sci.*, 74(7): 933-936, 2012.

C) 総括および来年度計画の概要

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提供した. 論文業績として, 今年度は 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 報の英文論文の報告をした. 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ズ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, 次年度においてはより高いカバー率を目指して最新世代のシーケンサーによる解析を予定している.

D) 学会発表

1. H Kawaguchi, T Yamada, N Miyoshi, A Tanimoto. The world smallest Microminipigs: Type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascuopathy and Neutral Lipid Storage Disease. 19-20th April, 2013 (大阪大学中之島センター, 大阪)
2. A Tanimoto, H Kawaguchi, N Miyoshi. Atherosclerosis and cholesterol metabolism in Fujimicrapig. 第 85 回日本薬理学会年会 2012.3.14-16 (国立京都国際会館, 京都)
3. A Miyamoto, I.Md. Zahorul, H Kawaguchi, N Miura, E Yamazaki-Himeno, M Shiraishi, N Miyoshi, A Tanimoto. Effect of continuous intravenous infusion of angiotensin II on Microminipig basilar arterial responsiveness. 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.21-23 (福岡国際会議場, 福岡)
4. 青江史貴, 山田知信, 川口博明, 三浦直樹, 和泉博之, 谷本昭英, 三好宣彰. マイクロミニピッグを用いた食餌性動脈硬化症モデルの開発. 第 153 回日本獣医学会学術集会 2012.3.27-29 (大宮ソニックシティ, さいたま市)
5. 三浦直樹, 伊藤隆史, 川口博明, 永里朋香, 細川和也, 三好宣彰, 谷本昭英, 丸山征郎. 世界最小富士マイクラピッグ動脈硬化モデルによる高脂血症と血栓形成能に関する検討. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6.7-9 (ハイアットエージェンシー東京, 東京)
6. I.Md. Zahorul, M Nishimura, H Kawaguchi, N Miura, T Iwanaga, E Yamazaki-Himeno, M Shiraishi, N Miyoshi, A Tanimoto, A Miyamoto. Effect of continuous intravenous infusion of angiotensin II on blood pressure and basilar arterial responsiveness to vasoactive substances in Microminipig. 第 154 回日本獣医学会学術集会 2012.9.14-16. (岩手大学, 盛岡市)

E) 論文発表 研究成果の刊行に関する一覧表 (P206) に記載

F) 知的所有権の取得状況 該当なし

Table 1-1 Clinical signs in male microminipigs

Study No. SBL703-024

Group	Animal No.	Sign code	Time	Day of dosing													
				1			2			3			4			5	
				0123456	7890123	4567890	1234567	8901234	5678901	2345678	9012345	6789012	3456789				
1	1			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	2			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	3			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	4			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	5			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	6			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
2	7			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	8			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	9			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	10			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	11			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	12			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
3	13			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	14			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	15			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	16			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	17			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	18			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				

Notes) - : No abnormal signs + : Non-graded signs 1 : Slight 2 : Moderate 3 : Severe