

201307003A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 谷本 昭英

平成26(2014)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)	1
II 分担研究報告	
1. 長期高脂肪食によるマイクロミニピッグ脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発 (川口博明)	2-20
2. マイクロミニピッグ動脈硬化症モデルを用いたスタチンの薬効試験 (川口博明)	21-42
3. マイクロミニピッグを用いた高脂肪食動脈硬化モデルへの光環境操作睡眠障害の影響評価 (堀内正久)	43-58
4. マイクロミニピッグによるアンジオテンシンⅡの血圧、摘出血管反応および血管内皮細胞 へ及ぼす影響の検証 (宮本 篤)	59-64
III 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV 研究成果の刊行物・別刷	66-
V 参考資料	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

I 総括研究報告書

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

代表研究者：谷本 昭英

研究総括

循環器疾患の克服のため、主因である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。従来のモデル動物はヒトとの類似点が乏しく、とくにマウスは低LDLコレステロール動物であり本来は動脈硬化を来しにくい。よりヒトに類似した動物モデルが求められており、近年はブタがヒトとの生理学・解剖学的な類似性から注目されている。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のサイズはビーグル犬程度であり、一般のミニブタに比べ実験コストが安価で、取扱が容易である。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、MMPig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25年度には、分担研究者の川口らにより、長期間(1年)にわたり高脂肪・コレステロール食を給餌し、心筋梗塞や脳梗塞の自然発症の有無を検討する研究が行われた。高脂血症と粥状動脈硬化の発症は見られたが、経過中に心筋梗塞や脳梗塞の自然発症は見られなかった。しかしながら、頸動脈の動脈硬化病変をエコー観察により経時的に観察することに成功した。大動物を含めて実験動物において動脈硬化の所見を経時的に観察した報告はほとんどなく、今後の活用が期待された。

第2には、分担研究者の川口らにより、平成24年度までに確立された8週間投与モデルを用いて、スタチン投与による高脂血症および粥状動脈硬化についての解析が行われた。スタチンは高脂血症を改善し、大動脈の粥状動脈硬化病変の抑制にも効果が見られた。現在は大動脈の組織学的解析が進行中である。投与されたスタチンはヒトの臨床投与量であり、MMPig動脈硬化モデルがヒトの臨床薬にたいしても十分な反応を示し、今後の薬効試験に有用であることが示唆された。

第3には、分担研究者である堀内らにより、睡眠障害モデルの作出と、睡眠ストレスの負荷による心筋梗塞や脳梗塞の自然発症の有無を試みた。光を操作することによって睡眠障害は生じたが、動脈硬化進展への影響は強くなかった。しかしながら、ヒトと睡眠パターンが酷似しているMMPigにおいて、睡眠障害モデルの作成に成功したことは、今後の脳の高次機能などの研究に活用できる可能性が考えられた。

第4には、分担研究者である宮本らにより、血管リングを用いたex vivoの薬理学的研究を行った。薬理学的な血管の脳底動脈の反応性から、MMPigが霊長類およびイヌ等の実験動物に代わる実験動物になる可能性を示した。

第5には、本来の研究計画には含まれていないが、フルゲノムシーケンスの解析を行い、約90%のゲノムシーケンスに成功し、現在解析中である。

以上、平成25年度は、MMPigが動脈硬化モデルとして非常に優れていることを証明する基盤的な研究成果が得られた。

以下にフルゲノムシーケンスを除く各研究課題について詳細な報告を行う。

II 分担研究報告書

1. 長期高脂肪・高コレステロール食給餌によるマイクロミニピッグ脳梗塞・心筋梗塞モデルの開発

分担研究者：川口 博明

研究概要

目的 当分野におけるこれまでの研究で、世界最小国産ミニブタであるマイクロミニピッグ (MMPig) を用いた高脂肪・高コレステロール食の8週間給餌により動脈硬化を誘発する動脈硬化症モデルの作出に成功した。今回、より長期間の高脂肪・高コレステロール食給餌によってマイクロミニピッグに動脈硬化さらに脳梗塞・心筋梗塞が発生するかを検証する。

方法 3~4ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄14頭を3群に分け、Control群にはnormal diet、HFLCD群とHFHCD群にはHigh fat and low or high cholesterol dietを1年間給餌した。経時的に体重測定、血液検査を実施し、試験終了後、麻酔下放血による安楽殺し、病理解剖を行った。大動脈や心臓などの循環器系器官や脳、その他全身所属器について病理組織学的検索を行う。

結果 全動物に一般状態の異常(心臓の異常や神経症状など)はみられなかった。Control群と比較して、HFLCD群およびHFHCD群において体重の有意な上昇がみられた。血清総コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、遊離コレステロール、コレステロール・エステルについて、Control群と比較して、HFLCD群およびHFHCD群において有意な高値および高値傾向が認められた。また、遊離コレステロールとコレステロール・エステルにおいては、HFLCD群と比較して、HFHCD群において有意な上昇がみられた。剖検時肉眼観察ではHFLCD群およびHFHCD群の大動脈に軽度の粥状硬化がみられた。全動物に脳梗塞病変や心筋梗塞病変はみられなかった。

考察 マイクロミニピッグに高脂肪・高コレステロール食を1年間給餌することにより、肥育や高コレステロール血症が認められ、剖検時肉眼観察でも大動脈に軽度の粥状硬化がみられたが、脳梗塞や心筋梗塞の誘発には至らなかった。脳梗塞や心筋梗塞の誘発には、脂肪やコレステロールの投与量や投与期間あるいはその他の負荷の必要性の検討が必要と思われる。今後、病理組織学的検討や脂質代謝関連遺伝子発現の解析を行い、病態解析をすすめる。

A. 研究目的

これまで、様々な種類のブタでの動脈硬化症モデルの作出が試行されており、その給餌におけるコレステロール量、脂肪量、コール酸の有無、実験期間などはいずれも様々である。当分野では2009年に新規の実験動物であるマイクロミニピッグに、高脂肪・高コレステロール・コール酸ナトリウム配合飼料を給餌することによりアテローム性動脈硬化症モデルの作出を試みた。このとき12%脂肪、5%コレステロール、0.7%コール酸を添加した飼料を12週間給餌することで高コレステロール血症および動脈硬化性病変が誘発されることが証明された(文献1、2)。その後0.2~1.5%コレステロール、コール酸無添加、8週間でのアテローム性動脈硬化症モデルの

作出に成功している(文献3)。今回、より長期間(1年間)の高脂肪・高コレステロール食給餌によってマイクロミニピッグに動脈硬化さらに脳梗塞・心筋梗塞が発生するかを検証した。

B. 研究方法

- 1) 動物：3~4ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄14頭
 - 2) 群構成：3群：Control群には普通食、HFLCD群とHFHCD群にはHigh fat (12%) and low (0.03%) or high (0.1%) cholesterol dietを1年間給餌した。
 - 3) 一般状態：毎日
 - 4) 体重測定：毎週
 - 5) 血液検査：2週毎
- 一般血液学的検査10項目：赤血球数(RBC)、

白血球数 (WBC)、ヘマトクリット (Ht)、ヘモグロビン濃度 (Hb)、血小板 (Plat)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球 Hb 量 (MCH)、平均赤血球 Hb 濃度 (MCHC)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)

- 一般血液生化学的検査 22 項目：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、アミラーゼ (Amylase)、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総タンパク (TP)、アルブミン (Alb)、総コレステロール (T-Cho)、遊離型コレステロール (Free-Cho)、中性脂肪 (TG)、ブドウ糖 (Glu)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、リン酸 (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロライド (Cl)

- コレステロール分画 8 項目：高比重リポタンパクコレステロール (HDL-Cho)、低比重リポタンパクコレステロール (LDL-Cho)、超低比重リポタンパクコレステロール (VLDL-Cho)、カイロミクロンコレステロール (CM-Cho)、高比重リポタンパク TG (HDL-TG)、低比重リポタンパク TG (LDL-TG)、超低比重リポタンパク TG (VLDL-TG)、カイロミクロン TG (CM-TG)

6) 剖検：実験終了時に麻酔下出血殺し、病理解剖を行った。

7) 病理組織学的検索

- Oil red O 染色面積比の病理組織学的定量化：大動脈弓から胸部・腹部大動脈の Oil red O 染色による粥状硬化面積の定量化

8) リアルタイム PCR

サンプルに TaqmanR Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Life Technologies) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムにより実施した。手順はキットに推奨されるプロトコールにて以下のように実施した。なお今回、発現解析を行った遺伝子は、LDLR、HMGCR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC、

APOBEC1 の 8 項目であり、それぞれブタの μ RNA に特異的なプライマー・プローブを用いた。LDLR、HMGCR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC では肝臓から抽出した RNA サンプルでそれぞれの発現を、NPC1L1 と APOBEC1 では小腸から抽出した RNA サンプルでそれぞれの発現を解析した。

9) 統計学的処理

得られたデータ値について、SPSS を用いた t 検定を行った。Oil red O 染色面積比の病理組織学的定量化については SPSS を用いたノンパラメトリック (Mann-Whitney U) 検定。

C. 研究結果

【結果】

1) 一般状態

実験期間中は全頭健康であり、食欲不振や運動不活性などの臨床徴候は認められなかった。

2) 体重

Control 群と比較して、HFLCD 群および HFHCD 群において体重の有意な上昇がみられた。

3) 血液学的検査

3 群間で有意な変化がみられたが、基準値 (文献

4) 内の変化、一過性の変化であり、意義はないと考えられた。

5) 血液生化学的検査

- 血清脂質関連マーカーについて

血清総コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、高比重リポ蛋白コレステロール、遊離コレステロール、コレステロール・エステルについて、Control 群と比較して、HFLCD 群および HFHCD 群において有意な高値および高値傾向が認められた。

- その他、肝臓、腎臓の機能に関する項目や電解質などについて

3 群間で有意な変化がみられたが、基準値 (文献 5) 内の変化、一過性の変化であり、意義はないと考えられた。

6) 剖検時肉眼的所見

HFLCD 群および HFHCD 群の大動脈に軽度の粥状硬化がみられた。

7) Oil red O 染色

大動脈弓および胸部、腹部大動脈に Oil red O 染

色を実施した。HFLCD 群および HFHCD 群において腹部大動脈を中心に軽度に Oil red O 染色陽性部位がみられた。現在、Oil red O 染色陽性部位の面積の定量化を行い、解析中である。

8) 病理組織学的検査

現在、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製中である。

9) リアルタイム PCR

肝臓の LDLR, HMGCR, NPC1L1, SRB1, LIPC、小腸の APOBEC1, NPC1L1 遺伝子の相対発現比を解析中である。

【考察】

マイクロミニピッグに高脂肪・高コレステロール食を1年間給餌することにより、肥育や高コレステロール血症が認められ、剖検時肉眼観察でも大動脈に軽度の粥状硬化がみられたが、脳梗塞や心筋梗塞の誘発には至らなかった。脳梗塞や心筋梗塞の誘発には、脂肪やコレステロールの投与量や投与期間あるいはその他の負荷の必要性の検討が必要と思われる。今後、病理組織学的検討や脂質代謝関連遺伝子発現の解析を行い、病態解析をすすめる。

参考文献

- Miyoshi N, Horiuchi M, Inokuchi Y, Miyamoto Y, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Izumi Y, Miyajima H, Nagata R, Misumi K, Takeuchi T, Tanimoto A, Yasuda N, Yoshida H, Kawaguchi H. Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *In Vivo*. 24:671-680 (2010)
- Akioka K, Kawaguchi H, Kitajima S, Miura N, Noguchi M, Horiuchi M, Miyoshi N, Tanimoto A. Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of atherosclerosis in microminipigs. *In Vivo*. 28(1):81-90 (2014).
- Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Ayaori M, Uto-Kondo H, Ikegawa M, Noguchi M, Wang KY, Izumi H, Tanimoto A. Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Microminipig Fed a High-Fat/High-Cholesterol Diet. *J Atheroscler Thromb*. 21(3):186-203 (2014)
- Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, Shameshima H, Miyoshi N, Tanimoto A, Maruyama I. Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig. 27:357-361 (2013).
- Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, Noguchi M, Izumi H, Miyoshi N, Tanimoto A. Sex differences of serum lipid profile in novel microminipigs. 27:617-621.(2013).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
投稿準備中
- 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし

実験プロトコール

1. 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

(動物番号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

(動物番号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

給餌終了日： 2013年11月12日

剖検日： 2013年11月13日

2. 材料及び方法

2.1 試験系

種： ブタ

品種： マイクロミニピッグ

体重 (馴化開始時)

動物番号1～15： 3.0～6.6 kg

動物番号16, 17： 10.9～11.7 kg

月齢 (馴化開始時)

動物番号1～15： 3～4 カ月齢

動物番号16, 17： 4～6 カ月齢

入荷日

動物番号1～15： 2012年3月1日

動物番号16, 17： 2012年10月15日

入手日

動物番号1～15： 2012年3月22日

動物番号16, 17： 2012年12月6日

入手動物数： 雄15匹 (動物番号1～15)，雄2匹 (動物番号16, 17)

なお，動物番号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 17 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
 動物選択の理由： 文献^{1, 2, 3)}にて報告されている試験系を用いた。

2.2 飼育条件

試験区域： 大動物試験区域 IV
 温度： 許容範囲 20～26℃
 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。動物番号 16 及び 17 については体重の約 2%のマッシュ状飼料を 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%のマッシュ状飼料を、2 及び 3 群には体重の約 2.5%の特殊配合飼料を与えた。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。

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。
 環境エンリッチメント： おもちゃを常時供与した。
 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。

2.3 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で記入した動物番号により識別した。なお、動物番号 16 及び 17 は馴化期間中より左耳介内側に油性インク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、動物番号 16 及び 17 は馴化期間中より試験番号、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。

2.4 馴化

2012 年 3 月 22 日に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、2012 年 12 月 7 日に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、「7.8 観察及び検査項目」に記載した。

2.5 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、動物番号 16 及び 17 はそのまま対照群に割り当てた。

2.6 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 は給餌 71 日目 (2012 年 6 月 13 日) に、動物番号 2 は給餌 221 日目に試験から除外した。ま

た動物番号3は給餌246日目に、動物番号8は給餌329日目に死亡した。

2.7 給餌重量設定の根拠

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。

2.8 観察及び検査項目

2.8.1 一般状態

例数： 全例

観察頻度

馴化期間中： 毎日1回

給餌期間中： 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。

2.8.2 体重

例数： 全例

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あるいはHP-60K、株式会社エー・アンド・デイ）で測定した。

2.8.3 血圧測定

例数： 全例

測定時期

馴化期間中： -7日目に1回

ただし、動物番号16及び17は-2日目の間に1回実施した。

給餌期間中： 給餌83*、168**、245***及び328日目に1回（12、25、36、47週経過時、給餌前）

*：動物番号16及び17は給餌76日目に実施した。

**：動物番号16及び17は給餌174日目に実施した。

***：動物番号16及び17は給餌252日目に実施した。

測定方法： 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）を用いて上腕から測定した。

評価項目： 拡張期圧及び収縮期圧

2.8.4 心拍数測定

例数： 全例

測定時期

馴化期間中： -7日目に1回

ただし、動物番号16及び17は-2日目に1回実施した。

給餌期間中： 給餌83*, 168**, 245及び328日目に1回(12, 25, 36, 47週経過時, 給餌前)

*：動物番号16及び17は給餌76日目に実施した。

**：動物番号16及び17は給餌174日目に実施した。

***：動物番号16及び17は給餌252日目に実施した。

測定方法： 「7.8.3 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)に表示された値を記録した。

2.8.5 X線CT検査

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -12あるいは-7日目に1回

ただし、動物番号16及び17は-2日目に1回実施した。

給餌期間中： 給餌84*, 168**, 245, 328日目に1回(12, 25, 36, 47週経過時, 給餌前)

*：動物番号16及び17は給餌76日目に実施した。

**：動物番号16及び17は給餌174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。

2.8.6 エコー検査

例数： 全例

採取時期

馴化期間中： -12あるいは-7日目に1回

ただし、動物番号16及び17は-2日目に1回実施した。

給餌期間中： 給餌63*, 84, 168**, 245***, 328日目に1回(12, 25, 36, 47週経過時, 給餌前)

*：動物番号16及び17は給餌76日目に実施した。

**：動物番号16及び17は給餌174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。)

2.8.7 血液採取

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -12 及び-5 日目に1回

ただし、動物番号 16 及び 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 (動物番号 16 及び 17 は給餌 55 日目), 83, 117 (動物番号 16 及び 17 は給餌 118 日目), 140, 174 (動物番号 16 及び 17 は給餌 168 日目), 195, 224, 258, 280, 307 及び 335 (動物番号 16 及び 17 は給餌 336 日目) 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)

採血量

-12 日目： 約 16.3 mL

-5 日目： 約 5 mL

給餌 83, 174 (動物番号 16 及び 17 は給餌 168 日目) 及び 258 日目：

約 21.3 mL

約 16.3 mL (動物番号 16 及び 17 の給餌 168 及び 258 日目)

給餌 335 日目 (動物番号 16 及び 17 は給餌 336 日目)：

約 23.8 mL

約 17.0 mL mL (動物番号 16 及び 17)

給餌 14, 28, 56 (動物番号 16 及び 17 は給餌 55 日目), 117 (動物番号 16 及び 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 (動物番号 16 及び 17 は給餌 168 日目) 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×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), 0.7~1 mL×4 本 (血清中蛋白測定用), 0.5 mL×1 本 (HMGB1 用) 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 を血液学的検査に使用し, 残りの約 5 mL は血小板測定に用いた。動物番号 16 及び 17 において, 168 日目以降の EDTA-2K 全血は血液学的検査用 1 mL のみ採血し, 血小板用 5 mL は採血しなかった。ただし, -12 日目については, 約 1 mL 採血し, EDTA-2K で抗凝固処理した全血をすべて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、直ちに試験委託者がT-TAS測定装置で計測した。なお、動物番号16及び17は168日目以降採血しなかった。

クエン酸血漿： 3.8 w/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，3000 rpm，10 分間）して得られた血漿を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，3000 rpm，10 分間）して血清を得た。得られた血清を 0.2 mL \times 1 本（血清中ホモシステイン測定用），0.7~1 mL \times 4 本（血清中蛋白測定用），0.5 mL \times 1 本（HMGB1 用），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 を血液学的検査に使用し、残りの約 5 mL は血小板測定に用いた。

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。なお、動物番号 16 及び 17 は 168 日目以降採血しなかった。

クエン酸血漿： 3.8 w/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，3000 rpm，10 分間）して得られた血漿を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する。

給餌 14, 28, 56（動物番号 16, 17 は給餌 55 日目），117（動物番号 16 及び 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，3000 rpm，10 分間）して血清を得た。得られた血清を 0.2 mL \times 1 本（血清中ホモシステイン測定用），0.7~1 mL \times 4 本（血清中蛋白測定用），0.5 mL \times 1 本（HMGB1 用）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 を血液学的検査に使用し、残りの約 5 mL は血小板測定にもちいた。

クエン酸血漿： 3.8 w/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，3000 rpm，10 分間）し得られた血漿を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。

2.8.8 血液学的検査

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -12 日目に 1 回

ただし、動物番号 16 及び 17 は馴化期間中の検査は実施せず、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 (動物番号 16 及び 17 は給餌 55 日目), 83, 117 (動物番号 16 及び 17 は給餌 118 日目), 140, 174 (動物番号 16 及び 17 は給餌 168 日目), 195, 224, 258, 280, 307 及び 335 (動物番号 16 及び 17 は給餌 336 日目) 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)

採血方法： ADVIA120 を用いた測定項目には、血液採取にて得られた EDTA-2K 全血を、CA-7000 を用いた測定項目には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	ADVIA120 ^{a)}
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ズチン時間	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)

2.8.9 血液生化学的検査

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -12 日目に 1 回

ただし、動物番号 16 及び 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 (動物番号 16 及び 17 は給餌 55 日目), 83, 117 (動物番号 16 及び 17 は給餌 118 日目), 140, 174 (動物番号 16 及び 17 は給餌 168 日目), 195, 224, 258, 280, 307 及び 335 (動物番号 16 及び 17 は給餌 336 日目)

日目) 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)

採血方法: 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	JCA-BM6070 ^{a)}	
アルブミン	g/dL	BCG 法		
総コレステロール	mg/dL	COD-HDAOS 法**		
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-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 ²⁾
ホモシステイン	μM	鹿児島大学で測定した*		-

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した.

c) 全自動電気泳動分析装置 (株式会社ヘレナ研究所)

** : 動物番号 16 及び 17 の給餌 258 日目以降は下記測定方法を使用した.

総コレステロール : COD-HMMPS 法

トリグリセリド : GPO-HMMPS 法, グリセリン消去法

クレアチニン : クレアチナーゼ・HMMPS 法

2.8.10 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, d}	○	○	
	回腸 ^{a)}	○	○ ^{b, d}	○	○	
大腸	盲腸	○	-	○	○	
	結腸	○	-	○	○	
	直腸	○	-	○	○	
膵臓	-	○	-	○	○	
肝臓	○ ^{d)}	○	○ ^{b, c, e)}	○	○	
胆嚢	-	○	-	○	○	
大動脈 ^{d)}	-	○	○	○	-	
心臓 ^{d)}	○	○	○ ^{b, d)}	○	-	
腎臓	左	○	○	○ ^{b, d)}	○	
	右	○	○	○ ^{b, d)}	○	
膀胱	-	○	-	○	○	
精巣	左	○	○	-	○	
	右	○	○	-	○	
精巣上体	左	○	○	-	○	
	右	○	○	-	○	
前立腺	○	○	-	○	○	
精嚢	左	○	○	-	○	
	右	○	○	-	○	
脳 ^{g, h)}	大脳 ^{d)}	○	○	-	○	-
	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)}	○ ^{j)}
	右	-	○	-	○ ^{j)}	○ ^{j)}

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
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) ^{d)}		-	○	-	○	○
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カ所

b) 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

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/例、外側右葉：肝薬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、心臓及び大動脈は試験委託者が用意した容器あるいは試験施設が用意した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2 mm 程度でスライスし、ドーナツ状の組織片を5 mm 程度に細断後、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) 脳は試験委託者が用意した容器あるいは試験施設が用意した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) 2 g を1サンプル/例：抗体ライブラリ用とした

l) 腰部、皮下脂肪を含む

m) 腸間膜リンパ節を含む

n) L4：ホルマリン固定、L5：70%エタノール固定

o) 腋窩動脈は1サンプル (左右それぞれ) を凍結

2.8.10.1 剖検

例数： 全例 (死亡例は除く)

検査時期： 給餌期間終了の翌日

検査方法： 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 (10 mg/2 mL, 0.04 mL/kg) を筋肉内投与し, 「7.8.7 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. 動物番号7の左上皮小体は肉眼で確認できなかった.

2.8.10.2 器官重量 (絶対及び相対重量)

例数 : 全例 (死亡例は除く)
 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 あるいは GF-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.

2.8.10.3 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.
 例数 : 全例 (死亡例は除く)
 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. 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. 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.

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

例数 : 全例 (死亡例は除く)
 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 5 cm の部位), 回腸 (回盲口から近位 5 cm の部位, パイエル板は避けた) は 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.

2.8.10.5 薬物代謝酵素用の肝臓組織の採取

例数 : 全例 (死亡例は除く)
 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。サンプルは超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で保存した。

2.8.10.6 遺伝子解析用の組織の採取

例数： 全例（死亡例は除く）

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（脾臓附着遠位端から遠位 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 5 mm 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入れ、送付時まで冷蔵庫（許容範囲：1~9°C）で保存した。ただし、動物番号 16 及び 17 については冷蔵庫（許容範囲：1~9°C）で一晩保存し、その後フリーザー（許容範囲：-15°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。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 2 mm 程度でスライスし、ドーナツ状の組織片を得た。さらに 5 mm 程度に細断し、数個（6 個程度）の組織片を得た。均等に半分にし、半分はまとめて RNAlater（1 mL）を分注したチューブに 1 本に入れ、冷蔵庫（許容範囲：1~9°C）で保存した。残りの半分は腋窩動脈の採取で凍結した。

2.8.10.7 抗体ライブラリ用の脾臓組織の採取

例数： 全例（死亡例は除く）

採取時期： 剖検時

採取器官及び組織： 脾臓

採取方法： 50 mL のファルコンチューブに脾臓 2 g 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）で保存した。

2.8.10.8 腋窩動脈の採取

例数： 全例（死亡例は除く）

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）採取した。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。大動脈弓部については、遺伝子解析用の組織の採取方法にて、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。

2.8.10.9 髄液の採取

例数: 全例(死亡例は除く)
 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)で保存した。

2.8.11 便採取

例数: 全例
 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)
 採取方法
 馴化期間中: 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、委託者が持ち帰るまで超低温フリーザー(許容範囲:-70°C以下)で保存した。
 給餌期間中: 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。

2.9 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かった。

3. 結果

状態悪化・死亡した対照群の動物のデータは、統計から除外し、新たに追加した対照群2例のデータを加えて、統計処理をし、評価した。

一般状態: 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。