

体重： 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。

なお、対照群と比較し、2及び3群で、実験初期の段階で統計学的に有意な低値がみられたが、元々Pre時点から差があったためであり、意義のない変化と考えられた。

血圧測定： 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、対照群と比較し、収縮期血圧の統計学的に有意な高値が3群の47週時にみられたが、投与前値からの変動は軽微であり、拡張期血圧に変化はみられないため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

心拍数測定： 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、対照群と比較し、収縮期血圧の統計学的に有意な高値が2群の47週時にみられたが、投与前値からの変動は軽微であり、用量相関性のない変化であるため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

血液学的検査： 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、対照群と比較し、各パラメータで統計学的に有意な増加あるいは減少が2及び3群で散見されたが、投与前値からの変動は軽微である、個別値は異常値ではない、または用量相関性のない変化であるため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

血液生化学的検査： 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、LDLコレステロールの増加が、給餌2週目終了時点から、観察終了時（給餌48週終了時点）まで統計学的に有意な増加あるいは個別値での増加が2及び3群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。

なお、上記以外にも、対照群と比較し、各パラメータで統計学的に有意な増加あるいは減少が2及び3群で散見されたが、投与前値からの変動は軽微である、個別値は異常値ではない、または用量相関性のない変化であるため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。さらに、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。

剖検所見： 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）で腎臓のう胞がみられ、偶発変化と考えられた。

器官重量（絶対及び相対重量）： 大網、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、対照群と比較した統計学的に有意な差も2群のみでみられ、明らかな用量相関性はみられなかった。

なお、上記以外にも、対照群と比較し、各臓器で統計学的に有意な高値あるいは低値が2及び3群で散見されたが、投与前値からの変動は軽微である、個別値は異常値ではない、あるいは用量相関性のない変化である

ため、偶発変化あるいは意義のない変化と考えられた。

4. 結論

48週間給餌により、2群及び3群で特殊配合飼料による影響（体重、血液生化学的検査の脂質系パラメータ、大動脈の肉眼所見、脂肪関連の器官重量）でみられた。

II 分担研究報告書

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

分担研究者：川口 博明

【研究要旨】

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) を用いた動脈硬化症モデルの作出に成功した。今回、ヒトの動脈硬化症治療薬であるスタチンをマイクロミニピッグ動脈硬化症モデルに12週間投与し、高コレステロール血症および動脈硬化症への薬効を検討する。

方法 3~4ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄18頭を3群に分け、Control群には普通食、HFCD群とHFCD+スタチン群には12%高脂肪・0.1%コレステロール配合飼料を12週間給餌した。さらにHFCD+スタチン群にはスタチン (3 mg/kg BW/day) をオブラートに包み、混餌投与した。経時的に体重測定、血液検査を実施し、試験終了後、安楽殺により剖検を行った。病理組織学的検索を行い、さらにリアルタイムPCRによりHMGCRなどの遺伝子の相対発現比を測定した。

結果 血清総コレステロール、遊離コレステロール、LDL コレステロール、HDL 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、HFCD 群および HFCD+スタチン群が有意な高値を示し、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群に有意な低値および低値傾向が認められた。胸部・腹部大動脈の Oil red O 染色陽性部位がわずかにみられ、その面積を定量化したところ、Control 群と比較して、HFCD 群において陽性面積の有意な増加が、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群において減少傾向がみられた。病理組織学的には HFCD 群の 5 個体および HFCD+スタチン群の 1 個体で、内膜、中膜の肥厚や泡沫細胞浸潤などの動脈硬化性病変がみられた。リアルタイム PCR では HMGCR の相対発現比において、Control 群と比較して、HFCD 群で減少傾向がみられ、HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群で増加 (回復) 傾向がみられた。

考察 本研究により、マイクロミニピッグ動脈硬化症モデルにスタチンを投与することによって HMGCR の相対発現比の増加による高コレステロール血症の抑制がみられ、その結果として動脈硬化性病変の形成が抑制されることが示唆された。

結論 マイクロミニピッグは *in vivo*, *in vitro* および培養細胞実験を行うのに適しており、高血圧モデルをはじめ今後、実験動物として期待される。

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、ヒトの動脈硬化症治療薬であるスタチンをマイクロミニピッグ動脈硬化症モデルに 12 週間投与し、高コレステロール血症および動脈硬化症への薬効を検討した。また、それに伴った脂質関連遺伝子の相対発現比の変化についても検討した。

B. 研究方法

- 1) 動物：3~4 ヵ月齢のマイクロミニピッグ雄 18 頭を用いた。
- 2) 群構成：3 群：Control 群には普通食、HFCD 群と HFCD+スタチン群には 12%高脂肪・0.1%コレステロール配合飼料を 12 週間給餌した。さらに

HFCD+スタチン群にはスタチン（3 mg/kg BW/day）をオブラートに包み、混餌投与した。

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) 被験物質：スタチン

7) 剖検：実験終了時に麻酔下で放血殺し、病理解剖を行った。

8) 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

9) 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。

10) 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）検定を行った。

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、食欲不振や運動不耐性などの臨床徴候は認められなかった。

2) 体重

体重および体重増加率はControl群と比較して、HFCD群およびHFCD+スタチン群ともに高値を示したが、HFCD群とHFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

3) 血液学的検査

RBC、WBC、MCV、MCHにおいて、3群間に有意な変化はみられなかった。

Hb、Ht、MCHC、PLT、PT、APTTにおいて、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、一過性の変化あるいは病理組織学的異常を伴わない変化であり、意義はないと考えられた。

4) 血液生化学的検査

□ 血清脂質関連マーカーについて：

T-Cho 値において、Control群と比較してHFCD群およびHFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD群と比較してHFCD+

スタチン群では持続的低値を示した。

LDL-Cho 値において、Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。

HDL-Cho 値において、Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。

Free-Cho 値において、Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。

CE 値において、Control 群と比較して、HFCD 群および HFCD+スタチン群は持続的高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では持続的低値を示した。

VLDL-Cho 値において、Control 群と比較して、HFCD 群は 6 週目に高値を示したが、HFCD+スタチン群に有意な変化はみられなかった。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では、2、6 週目に低値を示した。

CM-Cho において、Control 群と比較して、HFCD 群は 12 週目に、HFCD+スタチン群は 6 週目に低値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では 6 週目に低値、8 週目に有高値を示した。

TG において、3 群間に有意な変化はみられなかった。

LDL-TG において、Control 群と比較して、HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 8 週目に有高値を示した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群では 12 週目に高値を示した。

HDL-TG において、Control 群と比較して、HFCD 群は 8、12 週目に低値を示したが、HFCD+スタチン群に有意な変化はみられなかった。HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

VLDL-TG において、Control 群と比較して、HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 4 週目に低値を示した。

HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

CM-TG において、Control 群と比較して、HFCD 群に有意な変化はみられなかったが、HFCD+スタチン群は 10 週目に高値を示した。HFCD 群と HFCD+スタチン群間に有意な変化はみられなかった。

□ 肝臓の機能に関する項目について

AST、GGT、T-Bill、D-Bill 値において、3 群間に持続的な有意な変化はみられなかった。

ALT、ALP 値において、Control 群と比較して HFCD 群は試験開始以降、持続的に有意な低値を示したが、基準値（文献 5）内の変化であり、意義はないと考えられる。

□ 腎臓の機能に関する項目について

BUN 値において、HFCD 群および HFCD+スタチン群に有意な変化がみられたが、基準値（文献 5）内での変化あるいは病理組織学的異常を伴わない変化であり、意義はないと考えられた。

Cre 値について、3 群とも同様の推移を示した。

□ 電解質の項目について

Na、K、Ca、IP、Cl 値において、有意な変化がみられたが、基準値（文献 5）内の変化であり、意義はないと考えられた。

□ その他の酵素について

CK、LDH、Amylase、Glucose 値について、3 群とも同様の推移を示した。

Albumin、TP 値について HFCD 群および HFCD+スタチン群に有意な変化がみられたが、基準値（文献 5）内の変化であり、意義はないと考えられた。

5) 剖検時肉眼的所見

Control 群の一頭で左精巣上体に嚢胞がみられたが、偶発所見と考えられた。

6) 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。HFCD 群において腹部大動脈を中心にわずかに Oil red O 染色陽性部位がみられた。また、Oil red O 染色陽性部位の面積の定量化を行い、その結果、Control 群と比較して、HFCD 群で高値を示

した。HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で低値傾向を示した。

7) 病理組織学的検索

Control 群では動脈において動脈硬化性病変は認められなかった。HFCD 群では6頭中5頭、HFCD+スタチン群では6頭中1頭の動脈に動脈硬化性病変が認められた。

総腕頭動脈では HFCD 群の2個体で内、中膜の肥厚がみられ、そのうち1個体では弾性線維破壊、もう1個体では内膜における泡沫細胞浸潤がみられた。

右頸動脈では HFCD 群の3個体で内膜肥厚がみられ、そのうち2個体では内膜における泡沫細胞が認められた。もう1個体では線維性被膜の形成、弾性線維破壊がみられた。

腹部大動脈では HFCD 群の1個体で病変が形成され、内、中膜の肥厚と内膜における泡沫細胞浸潤が認められた。

左頸動脈では HFCD+スタチン群の1個体で病変が形成され、内膜における泡沫細胞が認められた。

その他、全身臓器において著変はみられなかった。

8) リアルタイム PCR

肝臓の LDLR、HMGCR、NPC1L1、SRB1、LIPC 遺伝子の相対発現比は、Control 群と比較して、HFCD 群において減少傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で増加傾向がみられた。肝臓の SREBF1、SREBF2 遺伝子の相対発現比は、3群間で有意差および傾向は認められなかった。小腸の APOBEC1 遺伝子の相対発現比は、Control 群と比較して、HFCD 群において減少傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で増加傾向がみられた。また、小腸の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は、Control 群と比較して、HFCD 群において増加傾向、HFCD 群と比較して、HFCD+スタチン群で減少傾向がみられた。

【考察】

1) 体重

体重増加率において HFCD 群および HFCD+スタチン群は有意な高値を示したことにより、高脂肪・高コレステロール食により肥育が促進したと考えられる。スタチンによる肥育の抑制効果はみられなかった。

2) 血清脂質関連マーカーについて

T-Chol 値において、Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は2週目以降持続的に有意な高値を示した。HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群では2、4週目に有意な高値が認められた。試験期間中の HFCD+スタチン群の値の上昇は基準値内に留まっており、スタチンの効果で初期のコレステロール値が抑制されたことが考えられる。6週目以降 HFCD 群と HFCD+スタチン群間の有意差が消失したのは HFCD 群の個体の生体内において恒常性機構が働き、Control 群の値に近づいたためと考えられる。

HDL-Chol、Free-Chol 値において、Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群は2週目以降持続的に有意な高値を示した。HFCD 群と比較して HFCD+スタチン群では2、8、10、12週目または2、4、6週目に有意な低値が認められた。CE 値では8週目にのみ Control 群と比較して HFCD+スタチン群に有意差がみられないものの、3群でおおむね T-Chol と同様の推移となっている。

LDL-Chol 値において8週目以降 Control 群と比較して HFCD 群および HFCD+スタチン群で有意差は消失するが、T-Chol と同様の推移となっている。これらについても T-Chol と同様に生体内において恒常性機構が働き、Control 群の値に近づいたためと考えられる。

CM-Chol 値において HFCD 群、HFCD+スタチン群とも値が増減するが、持続性はなく意義はないと考えられる。

VLDL-Chol、TG、CM-TG、HDL-TG、LDL-TG、VLDL-TG 値において、3群とも同様の推移を示しており、高脂肪・コレステロール食給餌およびスタチン投与の影響を受けていないことが考えられる。

3) 動脈硬化病変について

大動脈弓および胸部、腹部大動脈に Oil red O 染色を実施した結果、HFCD 群の特に腹部大動脈にわずかに染色陽性部位がみられた。高脂肪・コレステロール食給餌により動脈硬化は増悪を示し、スタチン投与によりその改善傾向がみられたが、微細な変化であるため、Histometry (内膜病変面積の定量化)によるさらなる検討が必要と考えられる。

病理組織学的に内膜、中膜の肥厚、内膜における

泡沫細胞浸潤などが認められた。Control 群では動脈硬化性病変はみられず、HFCD 群で6頭中5頭に病変がみられることから、動脈硬化性病変が飼料中のコレステロール量に依存していることが考えられる。また HFCD+スタチン群では病変が6頭中1頭にしかみられないことから、スタチンによって病変の発生や進行が抑えられていることが考えられるが、Histometry (内臓病変面積の定量化) による詳細な検討が必要である。

4) リアルタイム PCR

本研究では HMGCR、LDLR、NPC1L1、SREBF1、SREBF2、SRB1、LIPC、APOBEC1 について Control 群を基準にした各遺伝子の相対発現比を測定した。

HMGCR とは HMG CoA 還元酵素と呼ばれ、メバロン酸経路で作用する還元酵素のひとつである。コレステロール生合成の律速酵素であり、望ましい血清中コレステロール量の維持の中心的な役割を有している。インスリン、甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、胆汁酸、コレステロールは全て HMGCR 発現に強い影響を与え、さらに HMGCR 発現には日内変動があり、断食や再給餌によっても劇的な変化を起こす。本研究においても HMGCR の相対発現比は HFCD 群でわずかに減少しており、食餌中コレステロールによると考えられる。スタチンはヒトにおいてこの HMGCR を標的として血清中コレステロール値を減少し、冠状動脈系疾患のリスクも減少し、動脈硬化性病変のサイズも減少させる[。スタチンは NADPH とは結合せず、HMGCR とのみ結合する。さらにスタチン治療による HMGCR 阻害は LDLR 発現を刺激する。本研究ではスタチン投与による LDLR、HMGCR の増加 (回復) 傾向がみられたことにより、マイクロミニピッグもスタチンに対してヒトと同様の作用機序をもつと考えられる。

LDLR とは、LDL、VLDL、 β -VLDL、IDL と結合する受容体であり、ほとんど全ての細胞に存在するが、肝臓に最も多く存在するとされる。多数の研究者が異なる動物モデルでの LDLR 遺伝子の発現における食餌脂肪酸の影響を測定している。ヒトにおいて細胞膜に発現する LDLR 遺伝子の変異が、致死的な遺伝性疾患である家族性高コレステロール

血症の約 85% の原因である。また、ブタにおいて細胞内に供給される食餌由来のコレステロール量が過剰であると LDLR の mRNA 発現量が減ることが知られている。本研究でも LDLR 遺伝子の相対発現比は HFCD 群でやや減少し、食餌中コレステロールによると考えられる。

SRB1 とはスカベンジャー受容体のひとつであり、HDL、LDL、VLDL などの天然のリポ蛋白と結合する[41]。リポ蛋白と結合した SRB1 は選択的なリポ蛋白コレステロールの摂取を介在し、選択的な摂取には血漿 HDL から組織 (特に肝臓とステロイド産生組織) へと HDL 粒子の劣化なしで配送することが含まれる。様々な系統の細胞において SRB1 の発現レベルは HDL への遊離コレステロール流出の割合と相関している。ヒトにおいて SRB1 の抗動脈硬化の役割は証明されているが、マクロファージにおける SRB1 の抗動脈硬化への役割はコレステロール流出を促進する傾向があるだけで明らかでない。ほとんどの肝臓の SRB1 発現は肝細胞で検出され、ハムスターでは食餌中の植物由来不飽和脂肪酸は肝臓の SRB1 発現と HDL コレステロール・エステル吸収を刺激する。高コレステロール血症ラットにおいてストレプトゾトシン誘発性糖尿病は SRB1 タンパクの発現レベルを上昇させ、血清 HDL の減少と正に相関していた。ただし、ラットでは肝臓の SRB1 レベルまたは HDL コレステロール・エステル転送が食餌中コレステロール量の変化で調整されているが、マウスとハムスターでは認められない。本研究では HFCD 群で有意な変化は認められず、マイクロミニピッグでは高脂肪・コレステロール食給餌により SRB1 の発現が変動しないと考えられる。しかしながら、HFCD+スタチン群では高値傾向を示していることから、スタチン投与により SRB1 の相対発現比が上昇する可能性はあると考えられる。

NPC1L1 とは NPC1 ファミリーの脂質転送物質であり NPC1 と 51% のアミノ酸を共有する。最初に報告されたのはラットとヒトの腸細胞の頂端膜であり、NPC1L1 の細胞内の局在は肝臓癌細胞系統で観察された。NPC1L1 は小腸におけるコレステロール吸収に関わる蛋白質であり、ラットでは小腸にのみ発現するが、ヒトでは肝臓にも発現しており、胆汁へのコレステロール排出の調節や肝臓へのコレス

テロール蓄積の促進などを行う。食餌中のコレステロールは NPC1L1 を刷子縁からエンドソームへと誘発する。エゼチミブはこの NPC1L1 を分子標的とする薬である。ただしこの薬は NPC1L1 遺伝子型の違いによりその有効性が異なる。また、前述のスタチンによる治療は近年のデータが小腸におけるコレステロール吸収の上昇と関連していると示唆しており、そのひとつである Atorvastatin は脂質異常症のヒトにおいて NPC1L1 の腸での発現を増加させることが明らかとなった。本研究において、小腸の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は HFCD 群で高値傾向を示したことにより、コレステロール吸収に関連していると考えられる。スタチンによって、この NPC1L1 遺伝子は HFCD 群と比較し低値傾向を示しており、これはスタチンの影響かコレステロール吸収抑制の作用によると考えられる。肝臓の NPC1L1 遺伝子の相対発現比は、HFCD 群において低値傾向が認められた。これは NPC1L1 がコレステロール吸収に関与しており、高コレステロール血症の状態であるために肝臓では発現が減少する可能性が考えられる。HFCD+スタチン群は Control 群と同等の発現であり、スタチン投与により NPC1L1 の発現が維持される可能性が考えられる。

APOBEC1 とはアポリポ蛋白をコードする複合体で、APOBEC ファミリーの第 1 の要素であり、胃腸組織においてアポリポ蛋白 B の mRNA からアミノ基を取り除く複合体の触媒機能を有する。本研究では HFCD 群で低値傾向が認められることから、NPC1L1 と同様に高脂肪・コレステロール食給餌による影響と考えられる。スタチン投与により APOBEC1 は HFCD 群に対し増加（回復）傾向があり、スタチンの影響かコレステロール吸収抑制の結果によると考えられる。

LIPC とは、肝由来の分泌タンパク質で血管内皮に存在し、カイロミクロン等のトリアシルグリセロールを加水分解し、より高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸を生成することでリポタンパク質代謝が促進され、脂質代謝に重要な役割を担っている。本研究で HFCD 群に対して HFCD+スタチン群は高値傾向が認められた。

SREBF とはステロールの規定要素を結合する因子である。SREBF 1、2 とも高脂肪・コレステロー

ル食給餌およびスタチン投与による影響はないと考えられる。

【結論】

本研究により、マイクロミニピッグ動脈硬化症モデルにスタチンを投与することによって HMGCR の増加による高コレステロール血症の抑制がみられ、その結果として動脈硬化性病変の減少が起こることが示唆された。今後、食餌中コレステロール量や試験期間、詳細な病理組織学的検討などが必要と考えられる。

参考文献

1. 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)
2. 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).
3. 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)
4. 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).

5. 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

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 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、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給餌投与終了日：

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)

2. 材料及び方法

2.1 被験物質

名称： スタチン (一般名：スタチン)

製造元： ファイザー株式会社

保存条件： 室温

2.2 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ぜ、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。

2.3 試験系

種： ブタ

品種： マイクロミニピッグ
 体重
 馴化開始時： 6.5～9.2 kg
 群分け時： 6.9～9.2 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

2.4 飼育条件

飼育室： 大動物試験区域 VIII
 温度： 許容範囲 20～26°C
 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
 また以下の期間は投与、X線CT検査、エコー検査あるいは剖検時の麻酔のため点灯した。
 2013年2月6日 20：01～20：40
 2013年2月7日 19：00～19：12

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（こたから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（こたから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

	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。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。

2.5 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。
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。

2.6 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。

2.7 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。

2.8 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。

2.9 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、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。

2.10 観察及び検査項目

2.10.1 一般状態

例数：	全例
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。

2.10.2 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
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-60K, 株式会社エー・アンド・デイ）で測定した。

2.10.3 X線CT検査

例数：	全例
検査時期	
馴化期間中：	-5日目に1回
投与期間中：	投与84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。

2.10.4 エコー検査

例数：	全例
検査時期	
馴化期間中：	-13あるいは-7日目に1回
投与期間中：	投与84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。）

2.10.5 血液採取

例数：	全例
-----	----

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)
 剖検日： 投与 85 あるいは 90 日目

採血量

馴化期間中： 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した。

血液の処理

馴化期間中

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 1 mL を血液学的検査に使用した。

クエン酸全血： 3.8 w/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、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。

クエン酸血漿： 3.8 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を 150 µL 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×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。

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×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) 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 1 mL を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×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 1 mL を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×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 1 mL を血液学的検査に使用した。

クエン酸全血: 3.8 w/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, 血小板測定に用いた。

クエン酸血漿: 3.8 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を 150 μL 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×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。

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×g, 3000 rpm, 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×g, 3000 rpm, 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。

2.10.6 血液学的検査

例数: 全例

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)

なお, CA-7000 を用いた測定項目 (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 を用いた測定項目には、「7.10.5 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	
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)

2.10.7 血液生化学的検査

例数： 全例

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)

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	

検査項目	単位	測定方法	機種	
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		
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 ^{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*		-

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)

2.10.8 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	○	-	○	○

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
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)}		-	○	○	○	-
心臓 ^{f)}		○	○	○ ^{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)}	○ ^{j)}
	右	-	○	-	○ ^{j)}	○ ^{j)}
顎下リンパ節	左	-	○	-	○	○
	右	-	○	-	○	○
脾臓		○	○	○ ^{b, c}	○	○
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) ^{k)}		-	○	-	○	○
腸間膜脂肪 ^{l)}		○	○	-	○	○

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
大網	○	○	-	○	○
腰椎 ^{m)}	-	○	-	○	-
腋窩動脈 ⁿ⁾	-	-	○	-	-

○：実施した

-：実施しなかった

p) パイエル板を含む部分及び含まない部分の2カ所

q) 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

r) 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

s) 胆嚢を含む

t) 2分割/例、外側右葉：肝薬物代謝酵素測定用とした

u) 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。

v) 脳底動脈から大脳動脈輪を含む

w) 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

x) 頭頂葉、側頭葉、間脳

y) 骨幹部

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

2.10.8.1 剖検

例数： 全例

検査時期： 投与期間終了の翌日

検査方法： 体重を測定後、メデトミジン水溶液（ドミトール, 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、「10.7.5 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った。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。

2.10.8.2 器官重量（絶対及び相対重量）

例数： 全例

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1kg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。

2.10.8.3 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。

例数： 全例

次の動物は、上皮小体が確認できなかったため固定できなかった。

上皮小体（右）：No. 8, 9, 10, 13, 14, 15

上皮小体（左）：No. 14, 15, 16, 18

固定方法（湿標本）： 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、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。

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

例数： 全例
 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、パイエル板は避ける）は 5 mm 角 2 片を 1 本のチューブに入れ各臓器 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。

2.10.8.5 薬物代謝酵素用の肝臓組織の採取

例数： 全例
 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、超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で保存した。

2.10.8.6 遺伝子解析用組織の採取

例数： 全例
 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 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