

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 RNeasy (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。

2.10.8.7 腋窩動脈の採取

例数： 全例
 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。

2.10.8.8 髄液の採取

例数： 全例
 No. 7 は髄液を採取できなかった。
 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。

2.10.8.9 便採取

例数： 全例
 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。ただし、投与 28 及び 42 日目の採取便については超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で保存した。

2.11 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 検定を行った。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。

3. 結果

一般状態： 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。

体重： 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。

血液学的検査： 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。

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日目から投与期間終了時までみられた。また、LDLコレステロール濃度の有意な増加が、2群で投与15～42日目に、3群で投与28及び42日目にみられ、2群についてはその後も増加傾向がみられたが、3群は対照群とほぼ同程度に回復した。VLDLコレステロールの有意な増加が2群で投与42日目にみられたが投与期間終了時には対照群と差はみられなかった。カイロミクロンコレステロールの減少が2群で投与83日目、3群で投与42日目にみられた。また各コレステロール分画の濃度の変動に関連して各比率も変動がみられた。

2群と比較し、3群で総コレステロールの統計学的に有意な減少が投与後15及び28日目にみられ、遊離コレステロールの統計学的に有意な減少が投与後15～42日目に、また、これらは、その後も統計学的な有意差はみられないものの2群に比べ減少傾向を示した。LDLコレステロール濃度の有意な減少が投与後15、42日目にみられ、その他の検査日も統計学的な有意差はみられないものの2群に比べ減少傾向がみられた。HDLコレステロール濃度の有意な減少が投与後15、56～83日目にみられた。VLDLコレステロール濃度の有意な減少が投与15及び42日目にみられたが投与期間終了時には2群との差はみられなかった。また各コレステロール分画の濃度の変動に関連して各比率も変動がみられた。

これらの結果から脂肪食によるコレステロール関連の増加への影響が示唆され、主に投与初期の段階ではスタチンによるコレステロール関連の増加抑制の効果も確認できたが、投与終了時でのスタチン効果は軽微であ

った。

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餌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、 γ -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。

剖検所見： 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。

器官重量： 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、片側性の変化であるため、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。

4. 結論

12週間給餌により、特殊配合飼料による影響が3群（脂肪食+スタチン投与）及び2群（脂肪食）でみられた。

また、スタチンによるコレステロール関連の増加抑制の効果は、血液生化学的検査の脂質系で軽微な効果がみられた。

II 分担研究報告書

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

分担研究者：堀内 正久

【研究要旨】

目的 疫学的な研究によって明らかにされた種々の動脈硬化修飾因子が、どのような機構で動脈硬化進展に関わっているのかを明らかにすることは重要である。本研究では、疫学的に動脈硬化修飾因子とされる睡眠障害（起こりうる状況として、長時間労働をイメージしている）と動脈硬化進展の関連を明らかにするために、新規に開発されたミニブタ高脂肪食誘発動脈硬化モデルを用いて実験を行なった。具体的には、光環境を操作し明期時間を長くすること（人工的な長時間労働）によって、どのような睡眠障害が起こるかを確認すること。また睡眠障害によって動脈硬化病変に対してどのような影響が生じるかを生理学的、病理学的に評価した。

方法 光環境を、明期を長くすること、光量を増加させることで操作した。睡眠障害の評価は、活動量計および腹腔内埋め込み型の体温測定計で行った。動脈硬化の進展は、病理学的に行い、血液生化学的な検査も合わせて行った。

結果 明期を長くすること、光量を増加させることでミニブタに睡眠障害が発症した。睡眠障害は、暗期の活動量増加と朝方の活動量低下を特徴とした。体温測定でも、暗期の体温下降が鈍く、早朝の照明点灯時での体温上昇反応が遅かった。これらの所見は、ヒトが「夜更かし」時に経験する現象と似た所見と考えられた。血中指標の変化は、睡眠障害群で、HDL コレステロールが高いことが認められた。動脈硬化病変は、すべての動物にみられたが、著しい差異は認められなかった。睡眠障害の影響があるかどうか、病変の定量的解析を実施中である。

考察 光を操作することによって、睡眠障害は生じたが、睡眠障害群で、HDL コレステロールが高いことから、動脈硬化進展にはむしろ抑制的な影響を与えた可能性が考えられた。睡眠障害によって、体重減少が生じ、結果的に給餌量が少なくなったことが一つの理由として考えられた。本動脈硬化モデルは、摂取脂肪量に依存して動脈硬化を生じることから、摂取脂質量の減少が、動脈硬化進展に抑制的に働いたと考えられた。暗期に、睡眠障害を生じたが、明期については、何ら干渉を行わなかったため、夜間の睡眠障害が昼間に代償された可能性が考えられた。

結論 光環境操作によって睡眠障害は生じたが、動脈硬化進展への影響は、強くなかったと考えられた。

A. 研究目的

動脈硬化の進展に影響を与える環境因子の探索は、疫学的な観察研究によってなされている。疫学的な研究によって明らかにされた種々の動脈硬化修飾因子がどのような機構で動脈硬化進展に関わっているのかを明らかにすることが、医薬品の開発やそのような環境因子の暴露を本当に避ける必要があるのかといった実臨床における患者指導につながることは明白である。動脈硬化修飾因子の動脈硬化進展の詳細な機序解明のためには、適切な動物モデルが必要であることは論を待たない。本研究では、疫学的に明らかにされた、睡眠障害（長時間労働によって生

じる）と動脈硬化進展の関連を明らかにするために、新規に開発されたミニブタ高脂肪食誘発動脈硬化モデルを用いて、光環境を操作することによって生じる睡眠障害の影響を生理学的、病理学的に評価した。

B. 研究方法

1) 高脂肪食負荷と光環境負荷

4ヶ月令のミニブタ（マイクロミニピッグ；富士マイクラ）を15頭購入し、新日本科学（AAALAC認証施設、鹿児島）動物実験施設にて飼育を行った。全ての動物に、高脂肪食（通常食に1.5%コレステロールを添加）を体重3%に相当する量を1日量として、1日1回（10時または16時）また

は、1日2回給餌した^{2, 3)}。体重は1週間に1回測定した。光環境として、以下の3つの条件で飼育した(それぞれ5頭)。

1群:照明時間(12時間:0700-1900)、光量(50-100Lx)、光源(室内蛍光灯)

2群:照明時間(20時間:0700-2400、2400-0300)、光量(300Lx)、光源(LEDランプ)

3群:照明時間(20時間:0700-2400、2400-0300)、光量(1200Lx)、光源(LEDランプ) 2) 睡眠・覚醒リズムの測定

① 活動量

活動量は、Ambulatory Monitoring 社の Octagonal Basic Motionlogger を用いた。

② 体温

体温は、マイクロチップ埋め込み型機器を用いて測定した。測定にあたって、埋め込み部の検討を行い、深部体温と比較的温度変化が似ていた耳根部に埋め込みを行った。特記すべきこととして、光にตอบสนองして、体温の上昇、下降が明確に認められ、本体温測定は、睡眠・覚醒リズム測定に極めて有用であることが確認された。

3) 動脈硬化指標の測定

① 生化学検査

2週に1回、頸静脈から前大静脈洞部より、採血した。脂質代謝関連物質を中心に、キットで測定した。

② 病理学検査

実験終了時、麻酔下放血後、病理解剖を行った。臓器重量測定後、血管・循環器系臓器の病理標本を記法に従い作成した。

4) 統計学的処理

数字的なデータは、平均値±標準誤差にて表した。

C. 研究結果

【結果】

① 活動量

実験開始時、明期活動量のピークがいずれの群においても2回あった。実験開始後4ヶ月では、明期活動量のピークは、1回であった。このピークは、給餌時刻に一致しており、活動量が、食事によって影響することが示唆された。暗期活動量は、実験開始時は、それぞれの群内の比較で、明期活動量よりも少なかった。3群間の比較では、3群(1200Lx)が最も活動量が少なかった(よく寝ていた)。実験開始後

4-6ヶ月では、暗期に一致せず、いずれの群も19時頃から活動量が低くなる傾向が認められた。1群では、明期の方が、暗期よりも活動量が低い傾向が認められた。2, 3群では、暗期に活動量が高くなる傾向が認められた。また、早朝において、2, 3群では、活動量の増加が抑制されることが観察された。

② 体温

1群と比べて、2, 3群において、暗期の体温下降が鈍く、早朝の照明点灯時での体温上昇反応が遅かった。

③ 生化学

剖検時(実験開始6ヶ月)体重(kg)は、1群:21.10±3.01、2群:22.66±1.69、3群:19.48±1.27。HDL-コレステロール値(mg/dl)は、1群:107.0±17.8、2群:147.8±22.9、3群:173.2±19.2。

④ 病理

動脈硬化病変は、すべての動物にみられたが、睡眠障害の影響があるかどうか、病変の定量的解析を実施中である。

D. 考察

光を操作することによって、睡眠障害は生じたが、睡眠障害群で、HDLコレステロールが高いことから、動脈硬化進展にはむしろ抑制的な影響を与えた可能性が考えられた。睡眠障害によって、体重減少が生じ、結果的に給餌量が少なくなったことが一つの理由として考えられた。本動脈硬化モデルは、摂取脂肪量に依存して動脈硬化を生じることから、摂取脂肪量の減少が、動脈硬化進展に抑制的に働いたと考えられた。暗期に、睡眠障害を生じたが、明期については、何ら干渉を行わなかったため、夜間の睡眠障害が昼間に代償された可能性が考えられた。

E. 結論

光環境操作によって睡眠障害は生じたが、動脈硬化進展への影響は、強くなかったと考えられた。

参考文献

1. Zimberg IZ, Fernandes Jr. SF, Crispim CA, et al. Metabolic impact of shift work. *Work*, 2012;41:4376-4383.
2. Miyoshi N, Horiuchi M, Inokuchi Y, Yamada T, et al. Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *in vivo*,

2010; 24: 671-680.

3. Kawaguchi H, Yamada T, Miura N, et al. Rapid development of Atherosclerosis in the world's smallest microminipig fed a high-fat/high -cholesterol diet. J Atheroscler Thromb, 2014; 21: 186-203.
4. Takeishi K, Horiuchi M, Kawaguchi H, et al. Acupuncture improves sleep conditions of minipigs representing diurnal animals through an anatomically similar point to the acupoint (GV20) effective for humans. Evid Based Complement Alternat Med, 2012; 2012:472982.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

作成中

2. 学会発表

武石 嘉一郎、川口 博明、有村 恵美、谷本 昭英、堀内 正久；ミニブタ睡眠モデルの解析。第84回日本衛生学会（岡山コンベンションセンター），2014年5月（岡山）。

3. 特許

申請準備中

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, 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:	2013年6月13日
馴化開始日:	2013年6月13日
点灯制限期間開始日:	2013年6月20日
馴化終了日:	2013年6月27日
給餌開始日:	2013年6月28日
給餌終了日:	2014年1月26日及び2014年1月27日
剖検日/点灯制限期間終了日:	2014年1月27日及び2014年1月28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):	6.9~7.5 kg
月齢(馴化開始時):	3~5ヵ月齢
入荷日:	2013年5月24日
入手日:	2013年6月13日
入手動物数:	雄18匹
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

2.2 飼育条件

飼育室:	1028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

非点灯制限期間:	1日12時間(07:00~19:00点灯)の人工照明 下記の時間については, 検査のために点灯した. 2014年1月17日 19:00~19:36
点灯制限期間:	1群は通常の試験室の照明のまま1日12時間(07:00~19:00点灯)の人工照明. 2及び3群は, 各ケージに個別に別途照明を設置し自動点灯, 自動消灯させた. 2群は300ルクス(30W相当のLED電球1

個)を20時間点灯(07:00~翌03:00点灯),3群は1200ルクス(60W相当のLED電球2個)を20時間点灯させた。なお,2013年11月19日~2013年12月25日までの間は,通常の試験室の照明は1日中消灯させた。

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)を半分ずつ1日2回07:30~10:00,16:00~18:00に分けて与え,翌日の07:30~10:00に残った餌の回収を行った。また,馴化開始日は体重測定及び観察終了後に1日1回餌を与えた。なお,採血日,尿採取日,エコー測定日,体温ロガー及びアクティブグラフ設置・交換日は,採血,測定あるいは実施終了後に餌を与えた(終了時刻によっては1日1回とした)。

給餌期間中: 体重の約3%(2013年8月8日まで),2.5%(2013年8月9日~2013年9月19日まで),2.2%(2013年9月20日~2013年10月17日まで),2.0%(2013年10月18日~2013年11月28日まで)あるいは1.8%(2013年11月29日以降)の特殊配合飼料を,2013年7月11日までは半分ずつ1日2回07:30~10:00,16:00~

18:00に分けて与え,翌日の07:30~10:00に残った餌の回収を行った。2013年7月12日以降は全量を1日1回14:00~16:00に与え,翌日の11:00までに残った餌の回収を行った。なお,採血日,エコー測定日は,採血,測定終了後に餌を与えた(測定終了時間によっては1日1回とした)。

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左耳介内側に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。

2.4 馴化

検査済みのマイクロミニピッグ（雄 18 匹）を入手し、その後、15 日間の馴化期間を設けた。

2.5 動物の群分け

馴化期間中に、群間で体重（馴化開始時の体重）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。

2.6 試験群構成

特殊配合飼料群 3 群

群	飼料	照明条件		動物数 (動物番号)
		点灯時間	明るさ	
1	特殊配合飼料*	12 時間	通常の飼育室の照明のみ	5 (1~5)
2	特殊配合飼料*	20 時間	300 ルクス	5 (6~10)
3	特殊配合飼料*	20 時間	1200 ルクス	5 (11~15)

*特殊配合飼料 [脂質 (12%) + コレステロール (0.5%)] を体重の約 3%/日, 2.5%/日, 2.2%/日, 2.0%/日あるいは 1.8%/日 (2013 年 7 月 11 日までは体重の約 1.5%/回を 1 日 2 回, 2013 年 7 月 12 日以降は体重の約 3%, 2.5%, 2.2%, 2.0%あるいは 1.8%の全量を 1 日 1 回) 与えた。

2.7 飼料及び照明条件設定の根拠

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、特殊配合飼料 (脂肪食) により動脈硬化が誘発できる脂肪及びコレステロール量を設定し、給餌した。また、照明については、動脈硬化の増悪を確認できると予想される点灯時間、2 種の明るさを設定した。

4.8 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, HP-60K, あるいはGP-60K, 株式会社エー・アンド・デ
 イ）で測定した。

2.8.3 体温測定

例数： 全例
 検査頻度： 体温ロガー設置日（-11日目）から継続して測定した。
 測定方法： イソフルラン吸入麻酔下でキシロカイン 2%注射液を埋め込み近辺部位に皮
 下投与し，麻酔下で無線温度ロガー（サーモクロンSLタイプ）を後頸部耳
 根部皮下（左側）に埋め込み，縫合し，測定した。剖検時に温度ロガーを
 回収し，データを取り出した。
 温度ロガーの脱落がみられた動物（-1日目：ACN 4, 7及び11, 給餌0日
 目：Animal No. 14, 給餌10日目：Animal No. 5）については，再留置（右側）
 を実施した。

2.8.4 アクティブグラフによる運動量解析

例数： 全例
 検査時期： アクティブグラフ設置日（-8日目）から継続して測定した。
 測定方法： 端末機器をベルトで装着させ，測定した。3週間ごとにデータを取り出した。

2.8.5 エコー検査

採取時期

馴化期間中： -11日目に1回
 給餌期間中： 給餌203日目に1回（30週目，給餌前）
 測定方法： 麻酔下で超音波診断装置（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，
 心エコーの検査を実施し，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，エコー測定時は生体モニターを使用し心電図も確認した。
 評価項目： 左室壁厚（心室中隔壁厚および後壁厚），左室内腔径（拡張末期径及び収縮
 末期径），左室短絡率，左室駆出率，左室流入波形，左室流出波形

2.8.6 身体測定

採取時期

馴化期間中： -11日目に1回（エコー検査時）
 給餌期間中： 給餌203日に1回（30週目，給餌前，エコー検査時）
 測定方法： 紐及び定規あるいはメジャーで，身長，胴回り，首回りの長さを測定し記録
 した。

評価項目： 身長・胴回り・首回りの計測, BMI 及びBSA の算出
 算出式： $BMI = \text{体重 (kg)} / [\text{身長 (m)}]^2$
 $BSA (m^2) = 0.007184 \times [\text{体重 (kg)}]^{0.425} \times [\text{身長 (cm)}]^{0.725}$
 (The Dubois & Dubois formula)

2.8.7 尿採取

例数： 全例

測定時期

馴化期間中： -3 日目に 1 回

投与期間中： 給餌 83 及び 209 日目 (12 及び 30 週) に 1 回

剖検時： 剖検の放血及び開腹後に 1 回

採取方法

馴化及び投与期間中： 午前中にケージにステンレス製尿受けをセットし, 約 1 日の尿を採取した。全尿を混ぜた後, 容器に 10 mL の尿を採取して容器に入れ, 0.1 MEDTA 1 ml を入れた。

剖検時： 麻酔下で, 剖検の放血及び開腹後に膀胱から注射筒及び注射針を用いて強制採取した。容器に 10 mL の尿を採取して容器に入れ, 0.1 MEDTA 1 ml を入れた。

尿の処理： 冷凍庫 (許容範囲: -30~-15°C) で凍結保存した。

2.8.8 血液採取

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -14 日目に 1 回

給餌期間中： 給餌 14, 28, 56, 84, 111, 143, 168 及び 213 日目 (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 及び 30 週経過時) に 1 回 (給餌前)

採血量

-14 日目, 給餌 28, 56, 84, 111, 143, 168 及び 213 日目：
約 16 mL

給餌 14 日目： 約 13 mL

採血方法： 前大静脈洞から採血した。

血液の処理：

-14 日目, 給餌 28, 56, 84, 111, 143, 168 及び 213 日目：

血清： 約 15 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。得られた血清を血中ストレスマーカー用 (鹿大・堀内正久) 約 0.5 mL×3 本, その他用として, 約 1 mL×3~4 本に分注し (最後の 4 本目は取れた分のみ, 1 mL 未満でもよい), 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。

給餌 14 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。得られた血清をその他用として、約 1 mL×3~4 本に分注し（最後の 4 本目は取れた分のみ、1 mL 未満でもよい）、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 7.8.9 血液学的検査に使用した。

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。

2.8.9 血液学的検査

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -14 日目に 1 回

給餌期間中： 給餌 14, 28, 56, 84, 111, 143, 168 及び 213 日目（2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 及び 30 週経過時）に 1 回（給餌前）

採血方法： ADVIA120 を用いる測定項目には、血液採取にて得られた EDTA-2K 全血を使用した。

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	

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

2.8.10 血液生化学的検査

例数： 全例

検査時期

馴化期間中： -14 日目に 1 回

給餌期間中： 給餌 14, 28, 56, 84, 111, 143, 168 及び 213 日目（2, 4, 8, 12, 16, 20,

24 及び 30 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	JCA-BM6070 ^{a)}
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	クレアチニナーゼ・HMMPS 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⁾

j) 自動分析装置 (日本電子株式会社)

k) 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.

l) 全自動電気泳動分析装置 (株式会社ヘレナ研究所)

4.8.11 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)}		-	○	○	○	-
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		○	-	○	-
脊髓	胸部	-	○	-	○	○
坐骨神経	左	-	-	-	-	-
	右	-	○	-	○	○
胸骨／胸骨骨髓		-	○	-	○	○
大腿骨／大腿骨骨髓	左	-	-	-	-	-
	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	○	○	-	○	○

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
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⁾		-	○	-	○	-
左右腋窩動脈 ^{p)}		-	-	○	-	-
肉眼的異常部位		-	○	-	○	○

○:実施した

-:実施しなかった

dd) パイエル板を含む部分及び含まない部分の2カ所

ee) 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

ff) 5mm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

gg) 胆嚢を含む

hh) 2分割/例、外側右葉:肝薬物代謝酵素測定用とした

ii) 大動脈弓から外・内腸胃動脈の全域、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。

jj) 脳底動脈から大脳動脈輪を含む

kk) 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

ll) 頭頂葉、側頭葉、間脳

mm) 骨幹部

nn) 腰部、皮下脂肪を含む

oo) 腸間膜リンパ節を含む

pp) L4:ホルマリン固定, L5:70%エタノール固定

qq) 腋窩動脈はそれぞれ1サンプル(左右それぞれ)を凍結

2.811.1 剖検

例数: 全例

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)及びミダゾラム(10 mg/2 mL, 0.04 mL/kg)を筋肉内投与し、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。

1. 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。

2.811.2 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
 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。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。

2.8.11.3 肝臓外側左葉、左腎臓、心臓、脾臓、空腸、回腸、左腋窩動脈の凍結組織の採取

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、左腋窩動脈
 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）、それを5mm程度に細断して、数個（6個程度）の組織片を得た。左腋窩動脈（分岐部の近位側：切断面のリングを厚さ10mm程度でスライスし、ドーナツ状の組織片を得た。）は5mm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。

2.8.11.4 遺伝子解析用の組織の採取

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、左腎臓、心臓、脾臓、空腸、回腸、大動脈弓部、右腋窩動脈
 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。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、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、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。それを 5 mm 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、半分ずつをまとめて 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。腋窩動脈（分岐部の近位側：切断面のリングを厚さ 10 mm 程度でスライスし、ドーナツ状の組織片を得る。それを 5 mm 程度に細断して、数個（6 個程度）の組織片を得た。）を採取し、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）で一晩保存し、その後フリーザー（許容範囲：-15°C 以下）で保存した。

2.8.11.5 髄液の採取

例数： 全例
 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。

2.8.11.6 便採取

例数： 全例
 採取時期
 馴化期間中： -11 日目に 1 回
 給餌期間中： 給餌 84 及び 213 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委託者から入手した 1.8 mL エッペンチューブ 2 本に適量の便を採取し、超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で保存した。

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「2 群及び 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 検定を行った。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、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

一般状態： 実験期間中に死亡例及び瀕死屠殺例はみられなかった。

特殊配合飼料及び照明・ストレス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、3群（点灯20時間、1200ルクス群）の1例で給餌132日目に眼の異常及び出血、横臥位、食欲低下がみられ、結膜炎による影響が考えられた。抗生剤の点眼により状態は翌日には回復し、眼の異常も6日後には回復したため、試験への影響はないと判断した。

体重： 統計学的な有意差はみられなかったものの、3群（点灯20時間、1200ルクス群）は、他の群と比較して、体重の増加率が低かった。

なお、3群（点灯20時間、1200ルクス群）の1例で給餌132日目に眼の異常及び出血、横臥位、食欲低下がみられ、結膜炎による影響が考えられた。抗生剤の点眼により状態は翌日には回復し、眼の異常も6日後には回復したため、試験への影響はないと判断した。

身体測定： 特殊配合飼料及び照明・ストレスによる影響はいずれの動物においてもみられなかった。

血液学的検査： 特殊配合飼料及び照明・ストレス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。

生化学的検査： 特殊配合飼料に起因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、VLDL-コレステロール、カイロミクロン-コレステロールの増加が、各群でみられた。3群（点灯20時間、1200ルクス群）では総コレステロール、遊離コレステロールが他の群よりも高値であったが、HDL-コレステロールが他の群よりも高値であり、LDL-コレステロールは対照群（点灯12時間、通常照明）と変わらない値であった。

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。

剖検所見： 特殊配合飼料に起因した大動脈及び心臓の白色線条が各群の全例でみられた。

その他、心臓及び肺の癒着が対照群（点灯12時間、通常照明）の2例（No.3, 4）でみられ、肺の赤色化が3群（点灯20時間、1200ルクス群）の1例（No.13）でみられ、顎下腺（右）の小型及び硬化が3群（点灯20時間、1200ルクス群）の1例（No.13）でみられたが、特殊配合飼料及び照明・ストレスによる影響との関連性は不明であった。

器官重量（絶対及び相対重量）： 特殊配合飼料に起因した大網、腸間膜脂肪の絶対及び相対重量が、全動物で高値傾向を示した。これらの値は3群（点灯20時間、1200ルクス群）では他の群よりも低値であった。

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

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) が各群でみられた。点灯時間が長く、照度の強かった群では、他の群と比較して総コレステロール・遊離コレステロールが高かったが、HDL-コレステロールが高く、体重増加率は低く、大網、腸間膜脂肪重量は低値であった。