

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った。

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・エステルについては、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、コラーゲンの有無、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・コラーゲン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%コラーゲンを添加した飼料を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、コラーゲン無添加、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 (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 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) 病理組織学的検索

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

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
投稿準備中
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，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°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。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 (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	$10^6/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 ^{a)}
白血球	$10^3/\mu\text{L}$	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×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	$10^3/\mu\text{L}$	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)

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 ^{2c)}
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, c)		
	回腸 ^{a)}	-	b, c)		
大腸	盲腸	-	-		
	結腸	-	-		
	直腸	-	-		
脾臓	-		-		
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)

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) ^{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) 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

c) 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

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) 2g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,メドミジン水溶液(ドミトール,Orion Corporation,1mg/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℃ 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℃）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℃）で一晩保存し，その後フリーザ（許容範囲：-15℃ 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℃）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℃ 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 1 cm 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℃ 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。

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 (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、食欲不振や運動不活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-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 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-Cho、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 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-Cho と同様の推移となっている。

LDL-Cho 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-Cho と同様の推移となっている。これらについても T-Cho 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-Cho 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-Cho、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が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、スタチンの影響が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 とともに高脂肪・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 カ月齢
 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℃
 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

- 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* (mg/kg/day)	動物数 (動物番号)
1	こたから 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	CA-7000 ^{b)}
プロトロンビン時間	s	凝固法	
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 ^{2c)}
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	-		-		
脾臓		-		-		
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) 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

r) 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

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,メドトミジン水溶液(ドミツール,Orion Corporation,1mg/mL,0.04mL/kg),塩酸ケタミン水溶液(Kamud Drugs Pvt. Ltd.,50mg/mL,0.1mL/kg)及びミダゾラム(10mg/2mL,0.04mL/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(64.8mg/mL,0.5mL/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 RNA later（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。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、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的な変化であるため、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^{22,3)}。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

活動量

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

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、光に反応して、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

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。

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

数値的なデータは、平均値±標準誤差にて表した。

C. 研究結果

【結果】

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。

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。

体重

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。

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 micromini pig 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 カ月齢
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

検疫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) と与えた。

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 M EDTA 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 M EDTA 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 ^{2c)}

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	-		-		
脾臓				-		
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	-	-	-	-	-
	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) ^{l)}	-	-	-	-	-
腸間膜脂肪 ^{m)}	-	-	-	-	-
大網	-	-	-	-	-
腰椎 ⁿ⁾	-	-	-	-	-
左右腋窩動脈 ⁿ⁾	-	-	-	-	-
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。

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,メトミジン水溶液(ドミツール,Orion Corporation,1mg/mL,0.04mL/kg)及びミダゾラム(10mg/2mL,0.04mL/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(64.8mg/mL,0.5mL/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 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。

2.8.11.2 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 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），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。左腋窩動脈（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た。）は 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 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る）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（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（許容範囲：-15°C 以下）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。

II 分担研究報告書

4. 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：宮本 篤

【研究要旨】

目的 マイクロミニピッグが、実験動物として有用かどうかを、アンジオテンシン の2週間静脈内持続投与による高血圧モデルが作成可能かどうか、アンジオテンシン 静脈内投与終了後に、内因性血管作動物質に対する脳底動脈の血管反応性に変化がみられるかどうか、変化が見られた際には、その物質の作用機序はどのようになっているか、を検討することにより明らかにする。

方法 アンジオテンシン の静脈内持続(14日間)投与を行い、前肢より血圧を測定した。投与終了後、脳底動脈を摘出し、内因性血管作動物質に対する血管反応をマイクロオルガンバスシステムで測定した。さらに、脳底動脈の血管内皮細胞を培養し、変化が見られた反応を引き起こした原因物質の特定およびその変化を生化学的に調べた。

結果 アンジオテンシン の静脈内持続投与は、マイクロミニピッグに持続的高血圧を引き起こした。投与終了後に摘出した脳底動脈では、セロトニンおよびブラジキニンに対する血管反応性に有意な変化が見られた。ブラジキニンにより引き起こされる弛緩に続く収縮の2相性反応は、収縮のみの1相性反応となった。ブラジキニンを内皮細胞へ処置すると、一酸化窒素およびPGF_{2α}が細胞より産生した。アンジオテンシン の内皮細胞への前処置は、ブラジキニンによる一酸化窒素の産生を減少させ、反対にPGF_{2α}の産生を増大させた。

考察 アンジオテンシン の静脈内持続投与により、血管平滑筋上のAT₁受容体を介した直接的な作用以外に、血管内皮細胞上のB₂受容体を介した一酸化窒素の産生減少およびPGF_{2α}の産生増大により、高血圧は引き起こ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

近年、霊長類およびイヌ等を実験動物として使用することは、主要 EU 加盟国やアメリカを中心に、動物福祉やコストの上昇などの点から難しくなりつつあり、研究者からは新たな実験動物の開発が望まれている。マイクロミニピッグはその中でも最も相応しい実験動物の候補の一つに挙げられている。私達は、これまで通常の食料として供給されている通常のブタの血管を、近くの食肉センター(屠場)から入手後、実験室まで搬入し、結合織や脂肪等を取り除き、張力測定実験やラジオリガンド実験、また内皮細胞を培養して生化学的実験を行ってきた。今回、マイクロミニピッグを使い アンジオテンシンの2週間静脈内持続投与が、高血圧症状を引き起こす高血圧モデルの動物として使用することが出来るのかどうか、脳血管の中でも心臓運動血管中

枢等の存在する延髄背面を走行している脳底動脈を摘出し、ノルアドレナリン、ブラジキニン、セロトニンやアンジオテンシン といった内因性血管作動物質に対する血管反応性に、アンジオテンシン 投与終了後、変化がみられるかどうか、もし変化が見られた際には、その作用機序はどのようになっているか、をin vivo, in vitro および培養細胞実験により明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1) in vivo 実験

メドミジン水溶液(ドミツール、Orion Corporation, 1 mg/ml, 0.02-0.08 ml/kg)および塩酸ケタミン水溶液(50 mg/ml, 0.08-0.2 ml/kg)の麻酔下でマイクロミニピッグの頸静脈よりカニューレシオンを行い前大静脈洞に留置する。アンジオテンシン 投与群には、0.2 mg/kg/day で2週間持続的に

投与した。対照群にはアンジオテンシン の代わりに生理食塩液を同様に投与した。

全身性の血圧は、前肢より血圧計を介して測定した。

2) in vitro 実験

アンジオテンシン の静脈内持続投与の最終日に安楽死を行い、脳底動脈を摘出し、直ちに氷冷した Krebs - Ringer 液 (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄ および 10 mM glucose) 中に保存して、実験室に搬入した。余分な結合組織や脂肪を取り除いた後、長さ 2 mm の血管リング標本を複数個作製した。

作製した血管リング標本に糸のついたステンレス製フックを 2 本装着し、一方をオルガンバス底部に固定し、他方を等尺性張力トランスデューサ (TB-611T, 日本光電) に接続し、リング標本をオルガンバス内に懸垂した。オルガンバス内は 37 (pH 7.4) に保たれた Krebs - Ringer 液で満たされ、95% O₂ および 5% CO₂ の混合ガスを通気した。等尺性張力トランスデューサで感知された血管張力の変化は、増幅アンプ (AP-621G, 日本光電) で増幅後、PowerLab システム (ADInstrument) にてチャートデータとして変換され、パーソナルコンピューターに保存された。

血管リング標本は、オルガンバス内に装着して約 30 分間静置させた後、静止張力を 0.5 g に調節した。この静止張力は、血管リング標本が 60 mM KCl により最大収縮反応を起こすことのできる張力である。

全ての実験において、各処理を行う前に安定した再現性のある収縮が得られるまで血管リング標本に対して 3 回の KCl の適用を行った。これらの KCl 適用のたびに Krebs - Ringer 液にて洗浄し、静止張力を 0.5 g に再調節した。内因性血管作動物質の血管反応が収縮する場合、3 回目の KCl 反応で得られた最大収縮を 100% とした。また、血管反応が弛緩する場合は、実験の最後にニトロプルシド 10⁻⁴ M を適用し得られた最大弛緩反応を 100% とした。

3) 培養細胞実験

摘出マイクロミニピッグ脳底動脈にカニューレレーションを行い、0.05% トリプシン溶液をゆっくりと灌流することにより内皮細胞をチューブに集め、遠心後に上清を除去し、新しい培養液を加える洗浄を行った。0.1% ゼラチンコーティングした 90 mm ディッシュ

に播き、37 , 5% CO₂-95% air 下で初代培養を行った。培地として、45% DMEM と 45% Nutrient mixture 12 HAM それに 10% FBS (fetal bovine serum) を添加した混合培地を使用し、コンタミネーションを防ぐために抗菌剤 (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 250 ng/ml amphotericin B) を添加した。この細胞を 3 代目まで継代培養し、4 代目以降 6 代目までの細胞を実験に用いた。なお、培養中は細胞を 2 あるいは 3 日毎に Hank 's Balanced salt solution (Hanks 液) で洗浄し、培地の交換を行った。

4) 統計学的処理

得られた実験結果は、平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定には 2 群間での比較の場合は student paired *t*-test を、多群間での比較の場合は一元配置分散分析を行った後に Bonferroni 's multiple *t*-test を用いて検定を行った。危険率 5% 未満で有意差ありとした。

C. 研究結果

【結果および考察】

1) アンジオテンシン の 2 週間静脈内投与の全身血圧値へ及ぼす影響

アンジオテンシン を 2 週間静脈内投与した時のマイクロミニピッグの全身血圧を収縮期血圧 (systolic blood pressure) および拡張期血圧 (diastolic blood pressure) については、投与 1 日目からアンジオテンシン 群の収縮期血圧は有意に上昇した。拡張期血圧は対照群と比較すると高い値を示したが一部を除き有意ではなかった。

2) アンジオテンシン を 2 週間静脈内投与された摘出脳底動脈の内因性血管作動物質に対する血管反応性

内因作動物質として、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、セロトニン、ブラジキニン、L-ニトロアルギニン、インドメタシンを用い、得られた反応を下記に示した。

ノルアドレナリン：通常ブタ脳底動脈ではノルアドレナリンに対しては、受容体 ($\beta_1:\beta_2=7:3$) を介して弛緩するが (文献 1) マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に弛緩した。アンジオテンシン を持続投与した後の脳底動脈でも、この弛緩反応に有意な影響は認められなかった。

アンジオテンシン：通常ブタ脳底動脈ではアンジオテンシンに対して、AT₁受容体を介して収縮、AT₂受容体を介して一酸化窒素を遊離するが、AT₁受容体を介した収縮反応が優位である(文献2)。マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にアンジオテンシンに対して収縮した。アンジオテンシンを持続投与された後に摘出された脳底動脈でも、この収縮反応に有意な変化は認められなかった。

セロトニン：通常ブタ脳底動脈ではセロトニンに対して、5-HT₁受容体および5-HT₂受容体を介して収縮するが(文献3)、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にセロトニンに対して収縮した。アンジオテンシンを持続投与された後に摘出された脳底動脈では、セロトニンを適用して得られた収縮反応が有意に増強される結果となった。

L-ニトロアルギニン：通常ブタ脳底動脈では一酸化窒素合成酵素阻害剤であるL-ニトロアルギニンに対して、自発的に遊離している一酸化窒素の産生が阻害されるため収縮するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に収縮した。アンジオテンシンを持続投与された後のマイクロミニピッグ脳底動脈でも、この収縮反応に有意な影響は認められなかった。

インドメタシン：通常ブタ脳底動脈ではシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤であるインドメタシンに対して、自発的に遊離しているトロンボキサンA₂の産生が阻害されて弛緩するが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様に弛緩した。アンジオテンシンを持続投与した後の脳底動脈でも、この弛緩反応に有意な影響は認められなかった。

ブラジキニン：ブタ脳底動脈ではブラジキニンに対して、内皮細胞上のB₂受容体を介して弛緩および収縮する2双性反応を示すが、マイクロミニピッグでも通常ブタ同様にブラジキニンに対して2双性の血管反応を示した。アンジオテンシンを持続投与した後に摘出された脳底動脈では、弛緩反応は消失し、収縮反応は逆に大きく増強された。ブラジキニンに対する血管反応が、アンジオテンシンの持続投与により大きく変化したため、さらにマイクロミニピッグの脳底動脈内皮細胞を培養し、産生される弛緩因子である一酸化窒素および収縮因子のプロスタノイドを測定することとした。既にプロ

スタノイドはプロスタグランジン(PG)H₂の代謝物であるPGE₂、PGD₂、PGF_{2α}でありトロンボキサンA₂ではないことは以前報告している(文献1)。そのため、PGE₂、PGD₂、PGF_{2α}のいずれが、ブラジキニンにより、産生が増強されるかを先に検討した。3)ブラジキニン処置による一酸化窒素産生量への影響

一酸化窒素産生量は用量依存性および時間依存性に増大した。また、増大した一酸化窒素産生量は、B₁拮抗薬であるdes-Arg⁹, [Leu⁸]-BKでは有意な影響を受けなかったが、B₂拮抗薬であるHOE140および一酸化窒素合成阻害剤であるL-ニトロアルギニンでは完全に消失した。この結果は、ブラジキニン処置により血管内皮細胞上に存在するB₂受容体を介して一酸化窒素が産生され、血管を弛緩していることを示唆している。

4)ブラジキニン処置によるプロスタグランジン産生量への影響

10⁻⁷ M ブラジキニンの脳底動脈内皮細胞への処置によるPGD₂、PGE₂、PGF_{2α}の産生量への影響を示した。その結果、PGD₂およびPGE₂の産生量には有意な変化は認められなかったが、PGF_{2α}の産生量は有意に増強された。この結果は、マイクロミニピッグ脳底動脈にブラジキニン処置をすると、内皮細胞上のB₂受容体を介してPGF_{2α}が産生されることにより、収縮反応を引き起こすことを示唆している。

5)アンジオテンシンの48時間脳底動脈内皮細胞への処置が、ブラジキニン処置により産生される一酸化窒素およびPGF_{2α}産生量へ及ぼす影響

ブラジキニン処置により一酸化窒素およびPGF_{2α}が産生されることが内皮細胞を用いて証明されたが、これらの産生量に、アンジオテンシンの48時間前処置がどのような影響を示すかを、次の実験で明らかにしようと試みた。

10⁻⁷ M ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量が、10⁻⁷ M アンジオテンシンの前処置(48 hr)によりどのように影響を受けるかを6, 12, 24 hrで検討したところ、アンジオテンシンの前処置は、10⁻⁷ M ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量を時間依存性に増大させた。一方、10⁻⁷ M ブラジキニンによるPGF_{2α}の産生量が、10⁻⁷ M アンジオテンシンの前

処置 (48 hr) によりどのように影響を受けるかを 6, 12, 24 hr で検討すると、アンジオテンシン の前処置は、 10^{-7} M ブラジキニンによる $\text{PGF}_{2\alpha}$ の産生量を時間依存性に増大させた。この 2 つの結果は、アンジオテンシン 処置により、ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量が減少すると同時に $\text{PGF}_{2\alpha}$ の産生量が増大することを示しており、先の *in vivo* の実験でアンジオテンシン を 2 週間静脈内投与した後に摘出した脳底動脈で、ブラジキニンによる弛緩の後、収縮反応が起きるといふ 2 双性の血管反応の弛緩部分が消失し、収縮部分が増強され 1 相の収縮反応になったことを細胞レベルで証明したことになる。

D. 考察

マイクロミニピッグにアンジオテンシン を 2 週間静脈内持続投与すると、高血圧状態を保つことの出来る、いわゆる高血圧モデルを作成することが出来た。このことは、マイクロミニピッグが、高血圧用の実験動物に適していることを示している。

以下、高血圧を引き起こした理由について *in vitro* および培養細胞実験の結果を基に考察した。

マイクロミニピッグの脳底動脈リング標本の血管反応は、今回内因性血管作動物質とした使用した、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、セロトニン、L-ニトロアルギニンおよびインドメタシンに対し、通常ブタと同様の血管反応を示した。これにより、基本的に通常ブタでこれまでに得られた実験結果を基に、各種実験を行うことが出来ることを示唆している。アンジオテンシン の 2 週間静脈内持続投与後に摘出された脳底動脈リング標本の血管反応では、セロトニンとブラジキニンで有意な変化が見られた。セロトニンの反応がアンジオテンシン の静脈内持続投与後に増強されることは、既にラットで報告されているが、ブラジキニン反応の変化はこれまでに報告されていないため、ブラジキニンに焦点を当てて、その機序の解明を試みた。

ブラジキニン適用により元々見られた弛緩反応に続く収縮反応は、アンジオテンシン の持続的静脈内投与により、弛緩反応の消失と収縮反応の増強が引き起こされた。培養内皮細胞を用いた実験より、ブラジキニン適用により脳底動脈内皮細胞に存在する B_2 受容体を介して、一酸化窒素と $\text{PGF}_{2\alpha}$ が産生

されることが示唆された。さらに、この内皮細胞を予めアンジオテンシン で処置しておく、一酸化窒素の産生量は有意に抑制され、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の産生量は有意に増大した。この結果は、アンジオテンシンの持続的静脈内投与により、弛緩反応が消失し収縮反応が増強されたかを示したものである。

ブタの内皮細胞の培養は、ウシ内皮細胞と同様、比較的安価な基本の培養液で培養が可能である。このことは実験を行うに当たって大きなアドバンテージと成り得る。*In vivo* から *in vitro*、細胞培養実験、生化学的実験、分子学的実験に至るまで完成できるのがマイクロブタを使った実験の大きな特徴と言える。

E. 結論

今回の実験結果を統括すると、下記ようになる。

マイクロミニピッグは、動物の大きさ、扱い易さ、コスト、動物倫理および福祉の面は勿論、実際にアンジオテンシンにより高血圧モデルを作成することが出来、また摘出血管実験や内皮細胞培養実験等を行い、実験結果を導くことが可能な動物である。

摘出した脳底動脈の血管反応は、これまで実験で得られた普通のブタの血管反応とほぼ同一であった。

アンジオテンシン の 2 週間持続投与は、摘出した脳底動脈の血管反応の中で、セロトニンとブラジキニンの反応に有意な変化をもたらした。セロトニン反応は有意に増強され、またブラジキニンの 2 双性反応は、弛緩反応は消失し、収縮反応は有意に増強された。

上記以外に適用した、ノルアドレナリンおよびアンジオテンシン の反応は有意な影響を受けなかった。

脳底動脈は、トロンボキサン A_2 および一酸化窒素の産生量が他の血管と比べ 4 倍ほど多いため、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンを適用するとトロンボキサン A_2 の産生が抑制されるため弛緩し、一酸化窒素阻害薬である L-ニトロアルギニンを適用すると収縮するが、この反応にアンジオテンシン の 2 週間静脈内投与は影響を及ぼさなかった。

マイクロミニピッグ脳底動脈内皮細胞にブラジキニンを適用すると、 B_2 受容体を介して一酸化窒素および $\text{PGF}_{2\alpha}$ の産生量が有意に増大した。しかし、

PGD₂ および PGE₂ の産生量は有意な影響を受けなかった。

アンジオテンシン の前処置は、ブラジキニンによる一酸化窒素の産生量を有意に抑制し、PGF_{2α} の産生量を有意に増強した。

以上の結果は、アンジオテンシン の血中濃度が高いと、AT₁ 受容体を介して血管平滑筋を収縮させ、血圧を上昇させる直接作用の他、ブラジキニン B₂ 受容体に作用して、一酸化窒素の産生量の減少および PGF_{2α} の産生量を増大させる 2 次的作用により、高血圧を引き起こす可能性を示唆するものである。

高血圧の代表的治療薬に AT₁ 受容体ブロック剤とアンジオテンシン変換酵素阻害剤があるが、今回の結果は、後者の薬が何故高血圧に有効であるか、理由の一つを示したものであると思われる。

今回、マイクロミニピッグが霊長類およびイヌ等の実験動物に代わる候補の実験動物になる可能性を実験結果と共に示すことが出来た。

参考文献

1. Atsushi Miyamoto, Ken Ito and Akira Nishio, Characterization of alpha-adrenoceptors in pig basilar artery from functional and radioligand binding studies. *Japan Journal of Pharmacology*, 61(2), 93-99 (1993).
2. Atsushi Miyamoto, Ryoko Wada, Aya Inoue, Shigeru Ishiguro, James K. Liao and Akira Nishio: Role of angiotensin II receptor subtypes in porcine basilar artery: Functional, radioligand binding, and cell culture studies. *Life Sciences*, 78(9), 943-949 (2006).
3. Atsushi Miyamoto, Toyoaki Sakota and Akira Nishio, Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors on the isolated pig basilar artery by functional and radioligand binding studies. *Japan Journal of Pharmacology*, 65(3), 265-273 (1994).
4. Atsushi Miyamoto, Shigeru Ishiguro and Akira Nishio: Stimulation of bradykinin B₂-receptors on endothelial cells induces relaxation and contraction in porcine basilar artery in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 128(1), 241-247 (1999).
5. Atsushi Miyamoto, Shin Murata and Akira Nishio: Role of ACE and NEP in bradykinin-induced relaxation and contraction response of isolated porcine basilar artery. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, 365(5), 365-370 (2002).

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

宮本篤, イスラム・モハメド・ザホルル, 川口博明, 三浦直樹, 山崎-姫野絵美, 白石光也, 三好宣彰, 谷本昭英: アンジオテンシン II 静脈内持続投与のマイクロミニピッグ脳底動脈反応性へ及ぼす影響. 第 86 回日本薬理学会年会 (福岡国際会議場), 2013 年 3 月 (福岡).

Md. Zahorul Islam, Miharuru Nishimura, Hiroaki Kawaguchi, Naoki Miura, Tomoko Iwanaga, Emi Yamazaki-Himeno, Mitsuya Shiraishi, Noriaki Miyoshi, Akihide Tanimoto, Atsushi Miyamoto: Treatment of angiotensin II decreased NO and increased prostaglandin PGF_{2α} production by bradykinin in cultured porcine basilar arterial endothelial cells. 第 156 回日本獣医学会学術集会 (岐阜大学), 2013 年 9 月 (岐阜).

Md. Zahorul Islam, Emi Yamazaki-Himeno, Mitsuya Shiraishi, Atsushi Miyamoto, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Naoki Miura, Akihide Tanimoto: Angiotensin II decreases bradykinin-induced NO and increases prostaglandin PGF_{2α} release from cultured Microminipig basilar arterial endothelial cells. 第 87 回日本薬理学会年会 (仙台国際センター), 2014 年 3 月 (宮城).

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

III 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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: A Useful Animal Model Because of its Size and Similarity to Human Pathophysiology.	J Atheroscler Thromb.	21	186-203	2014
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	81-90	2014
Kawaguchi H Yamada T Miura N Noguchi M Izumi H Miyoshi N Tanimoto A	Sex Differences in Serum Lipid Profile in Novel Microminipigs.	In Vivo	27	617-621	2013

IV 研究成果の刊行物・別刷

V 參考資料

