

マイクロミニピッグ動脈硬化モデルの開発

山田 知信

Development of Atherosclerosis Model in Microminipig

Tomonobu Yamada

(空白) 教務課で作成

目次

| | |
|---|----|
| 序論 | 1 |
| 表および付図 | 4 |
| | |
| 第 I 章 世界最小マイクロミニピッグの体重、血液学的検査 および血液生化学的検査の基準値の研究 | 6 |
| 緒言 | 6 |
| 材料方法 | 7 |
| 1. 使用動物 | 7 |
| 2. 動物の飼育環境 | 7 |
| 3. 体重 | 7 |
| 4. 血液学的検査、血液生化学的検査および 脂質代謝パラメータ | 8 |
| 5. 統計 | 9 |
| 結果 | 10 |
| 1. 体重 | 10 |
| 2. 血液学的検査 | 10 |
| 3. 血液生化学的検査 | 10 |
| 4. 脂質代謝パラメータ | 11 |
| 考察 | 12 |
| 表および付図 | 16 |
| | |
| 第 II 章 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動脈硬化モデルの開発 | 26 |
| 緒言 | 26 |
| 材料方法 | 28 |
| 1. 使用動物および動物の飼育環境 | 28 |
| 2. 群構成および給餌 | 28 |
| 3. 一般状態観察、体重および血圧 | 28 |
| 4. 血液学的検査および血液生化学的検査 | 29 |
| 5. コレステリルエステルトランスフェル蛋白 (CETP) および肝リパーゼ (HL) の活性 | 29 |
| 6. カイロミクロン分画と超低比重リポ蛋白コレステロール | |

| | |
|---|----|
| 分画における血清中 ApoB プロファイル | 31 |
| 7. 皮下脂肪の蓄積（背部脂肪の厚さ） | 31 |
| 8. 病理解剖（剖検） | 31 |
| 9. <i>En face</i> 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析 | 32 |
| 10. 病理組織学的検査 | 32 |
| 11. 免疫組織化学的染色 | 33 |
| 12. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）による 肝臓および小腸での mRNA 発現 | 33 |
| 13. 統計 | 35 |
| 結果 | 36 |
| 1. 一般状態観察、体重、内臓脂肪の重量、背部脂肪の厚さ および血圧 | 36 |
| 2. 血液学的検査および血液生化学的検査（資料未掲載） | 36 |
| 3. 血清中脂質代謝パラメータ | 36 |
| 4. 肝臓および小腸での遺伝子発現 | 37 |
| 5. カイロミクロン分画と超低比重リポ蛋白コレステロール 分画における血清中 ApoB プロファイル | 37 |
| 6. HL および CETP 活性 | 38 |
| 7. 病理解剖（剖検） | 38 |
| 8. <i>En face</i> 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析 | 39 |
| 9. 病理組織学的検査 | 39 |
| 10. 免疫組織化学的染色 | 40 |
| 考察 | 41 |
| 表および付図 | 48 |

第III章 マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いた

| | |
|---|----|
| HMGCR 阻害剤の効能評価 | 67 |
| 緒言 | 67 |
| 材料方法 | 69 |
| 1. 使用動物および動物の飼育環境 | 69 |
| 2. 群構成および給餌 | 69 |
| 3. 一般状態、体重 | 70 |
| 4. 血液学的検査および血液生化学的検査 | 70 |
| 5. 病理解剖（剖検） | 70 |
| 6. <i>En face</i> 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析 | 71 |

| | |
|--|-----|
| 7. 病理組織学的検査 | 71 |
| 8. 病理組織学的形態計測 | 72 |
| 9. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) による 肝臓および小腸での mRNA 発現 | 72 |
| 10. 血中酸化ストレスマーカー | 73 |
| 11. 統計 | 73 |
| 結果 | 75 |
| 1. 一般状態観察、体重増加、内臓脂肪の重量 | 75 |
| 2. 血液学的検査および血液生化学的検査 | 75 |
| 3. 肝臓および小腸での遺伝子発現 | 76 |
| 4. 病理解剖 (剖検) | 77 |
| 5. 病理組織学的検査 | 77 |
| 6. <i>En face</i> 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析 | 77 |
| 7. 病理組織学的形態計測 | 78 |
| 8. 血中酸化ストレスマーカー | 78 |
| 考察 | 79 |
| 表および付図 | 83 |
| | |
| 総括 | 95 |
| | |
| 参考文献 | 96 |
| | |
| 謝 辞 | 116 |

序論

循環器系疾患（心筋梗塞、脳梗塞）はヒトにおいて主要な死因の1つであり、日本人の死因の第2～3位である。動脈硬化は、これらの梗塞性疾患の主因として知られており、動脈硬化症は欧米では高い罹患率および死亡率を示している [1]。近年の日本における食生活の欧米化、特に脂肪分の多い食事によるカロリー摂取の増加は、日本人における心筋梗塞および脳梗塞の罹患率の増加の原因と考えられている [2]。動脈硬化には、細動脈硬化、中膜硬化、アテローム性動脈硬化症がある。特にアテローム性動脈硬化症は日本人で増加しており、比較的太めの動脈が動脈壁の中にコレステロールや脂肪等の沈着物（プラーク）が形成され、それにより血流が減少ないし遮断され、プラークが徐々に増大し、慢性的な炎症も続くと被膜が薄くなり、不安定プラークとなり、内膜の破裂が起きる病気である。アテローム性動脈硬化症の病態は遺伝的要因と環境的要因の両方が関連しているため、ヒトの生理と病態を再現する適切な動物モデルが必要である。

動脈硬化モデル動物は、マウスやウサギが主流であり、これらの動物種は脂質代謝やいくつかの環境因子（食事内容、摂食時間、行動期）がヒトとは異なっているが、ブタは脂質代謝や摂食習慣などヒトとの類似点が多いためマイクロミニピッグの特徴…受け継がれる。ブリーダーは、食事内容や摂食時間等の環境因子が動脈硬化病変に及ぼす影響を解析するには、ウサギやマウスよりもブタの方が適している [3～7]。各動物の環境因子の違いについて、Table 1 にまとめた。

ブタはヒトと生理学的・解剖学的に類似しているため [8]、生

命科学研究に広く使用され、ここ数十年で著しく使用数が増加し、ヨーロッパでは1年間に6万頭以上のブタが使用されている[9、10]。毒性病理用語・診断基準国際統一化事業 International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) Projectにおける INHAND・Minipig の毒性病理用語が2021年に発表され、ブタの研究利用を後押ししている[11]。家畜ブタは、血管が太いため、血管手術手技や動脈挿管などに関する医学的訓練や教育に頻繁に使用されてきた。家畜ブタおよびミニブタは冠状動脈の解剖学的構造がヒトと類似しており[12]、循環器の研究で家畜ブタより小型のミニブタの利用が増加している[13]。しかしながらミニブタは、体が大きいため、飼育や維持に支障があり、通常の実験室を使用しての実験には不向きである。市販されている実験用ミニブタは、Clawn、Göttingen、Chinese Bama、Yucatan ミニブタが主に使われており[14~16]、家畜ブタよりも小さいことが報告されている[10、17]。多くの研究により、高脂肪の餌が家畜ブタと同様に Göttingen、Chinese Bama、Yucatan のミニブタに動脈硬化を誘発することが報告されている[18~22]。これらのミニブタは定義上、体重が100 kg未満であり、生命科学研究に広く使用するにはまだ大きすぎる状況である。近年、国産超小型ミニブタとして、マイクロミニピッグ (Fuji Micra Inc、静岡、日本) が、開発され、非常に小型で取り扱いが容易であり[8、23、24]、実験動物として使用が期待されている[25~28]。マイクロミニピッグはポットベリーミニブタと別の種類のミニブタの交配によって生まれた新規のミニブタである[25]。このマイクロミニピッグを使用して、動脈硬化病変モデルを構築することは、食事内容

や摂食時間がヒトに類似している点、小型であり取り扱いが容易である点から、非常に有用な実験動物になると考えられる。また、動脈硬化の治療薬として使用されているヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素 [HMGCR] 阻害薬（スタチン）は、メバロン酸経路の律速酵素を介して HMGCR を阻害し、血中コレステロールの上昇を抑制することがヒト [29] やウサギ [30] で報告されている。治療薬の研究において、HMGCR 阻害薬が評価できるマイクロミニピッグ動脈硬化モデルを構築することが、今後のヒトにおける循環器疾患の克服につながると考えられる。

本論文では、上記の研究背景を元にマイクロミニピッグ動脈硬化モデルの開発として、3つの章で構成されている。第I章では、超小型マイクロミニピッグの実験動物としての有用性を確認する目的で、体重、成長曲線、血液学的大約び血液生化学的パラメータの基準値（背景値）を明らかにした。第II章では、マイクロミニピッグ動脈硬化モデルの構築を試みた。第III章では、第II章のモデルが薬効試験に応用できることを確認する目的で、そのモデルを用いて、HMGCR 阻害剤の効能評価を行った。

本研究は国立大学法人鹿児島大学および株式会社新日本科学（AAALAC International 認証施設）の動物実験委員会により承認（承認番号 IACUC703-019 及び 703-024）されており、動物実験規定に従って実施されている。

以下に各章の研究成績について記述する。

表および付図

Table 1. 各動物の環境因子のまとめ

| 動物種 | 環境因子 | | |
|-----|------|--------|-----|
| | 食事 | 摂食 | 行動期 |
| ヒト | 雑食 | 食事時間固定 | 昼 |
| ブタ | 雑食 | ヒトと同じ | 昼 |
| イヌ | 偏食 | ヒトと同じ | 昼 |
| サル | 偏食 | ヒトと同じ | 昼／夜 |
| ウサギ | 偏食 | 随時 | 夜 |
| マウス | 雑食 | 随時 | 夜 |

第 I 章 世界最小マイクロミニピッグの体重、血液学的検査 および血液生化学的検査の基準値の研究

緒言

ヒトと生理学的・解剖学的に類似していることが報告されているブタ [8] は、実験動物として毒性学および薬理的な研究に使用されている。特にミニブタは、循環器や皮膚の研究で使用が増えている [12、13]。しかしながら、ほとんどのミニブタは体が大きいため管理が難しく [10、17]、例えば成獣のハンフォード系統のミニブタは体重 70～90 kg であり [9]、動物実験で最も使用される Göttingen ミニブタの成獣は、制限食餌の条件下では体重が 30～40 kg になるため [10、17]、使用が限られる。マイクロミニピッグはポットベリーと別の種類のミニブタの交配によって生まれた新規のミニブタであり [25]、young adult マイクロミニピッグの体重は 10 kg 未満と小さく、おとなしく、取り扱いが容易であることが報告されている [8、23、24]。しかしながら、実験動物としての使用はまだ少ないのが現状である。そこで本章では、大型実験動物に分類されるにも関わらず体が小さく取扱いが容易なマイクロミニピッグの、実験動物としての有用性を確認することを目的とし、体重、成長曲線、血液学的検査、血液生化学的検査、および脂質代謝パラメータの基準値（背景値）を調べた。

[31、32]

材料方法

1. 使用動物

雌雄のマイクロミニピッグ（Fuji Micra Inc、静岡、日本）を使用した。マイクロミニピッグの特徴（体重が一般的なミニブタの約半分）は6回の交配を重ねることで確立した。ブリーダーは6系統のマイクロミニピッグを生産している。本研究で基準値を確認した動物は、この6系統の集団から年齢別に無作為に選択した。動物は臨床症状が認められない健康な動物を使用した。また、ワクチン接種以外の治療や投薬が行われていない動物を使用した。

2. 動物の飼育環境

全ての動物は同じ飼育施設で、同じ飼育環境で飼育した。温度 $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 20\%$ 、明暗サイクル 12 時間、1 頭あたり $0.5\sim 1.2\text{ m}^2$ の環境で飼育した。餌はブタ用飼料（マッシュ状飼料であることから 73、日清丸紅飼料株式会社、東京、日本）を 1 日 1 回与え、給餌量は、月齢に応じて、1～3 ヶ月齢の動物には体重の 4～8%、4～6 ヶ月齢の動物には体重の 2～4%、7 ヶ月齢以降の動物には体重の 1～3% とした。飼料の構成成分は、粗蛋白 13.0% 以上、粗脂肪 2.0% 以上、粗繊維 8.0% 未満、粗灰分 10.0% 未満、カルシウム 1.1% 以上、リン 0.9% 以上である。飲水は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。

3. 体重

動物の体重は 0～12 ヶ月齢の期間、毎月 1 回測定した。雄 27 匹、雌 41 匹を用いて、体重はそれぞれ雄 324 データ、雌 492 デー

タを収集した。成長曲線は KaleidaGraph (4.1J デモ版) を用いて Gompertz Function [33] で作成した。

4. 血液学的検査、血液生化学的検査および脂質代謝パラメータ 0～34 ヶ月齢の 125 匹 (雄 58 匹、雌 67 匹) について血液学的検査および血液生化学的検査を実施した。また、血液学的検査については、月齢ごとの値も調べた。各月齢の動物の匹数として、0～2 ヶ月齢は雄 9 匹および雌 11 匹、3～5 ヶ月齢は雄 6 匹および雌 8 匹、6～8 ヶ月齢は雄 9 匹および雌 17 匹、9～12 ヶ月齢は雄 14 匹および雌 13 匹、13～24 ヶ月齢は雄 14 匹および雌 10 匹、25～34 ヶ月齢は雄 6 匹および雌 8 匹であった。採血は無麻酔下で前大静脈洞から採血した。プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を除く血液学的検査

(ADVIA120 ; Siemens Healthcare Diagnostics Manufacturing Ltd.Ireland、を用いる 23 項目) は、約 1 mL を採血し抗凝固剤としてエチレンジアミン四酢酸二カリウム二水和物 (EDTA-2K) を用いた全血を使用して測定した。CA-7000 (; シスメックス株式会社、兵庫、日本) を用いる測定項目 (PT、APTT) については抗凝固剤として 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使用して測定した。血液学的検査の測定項目および方法の詳細は Table 2 に示した。血液生化学的検査は、約 2.5 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) して得られた血清を用いて測定した。血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細は

Table 3 に示した。脂質パラメータについては、5ヶ月齢の雄5匹および雌5匹の血清試料を電気泳動処理分析装置（Epalyzer 2；ヘレナラボラトリーズジャパン株式会社、埼玉、日本）で分析し、脂質プロファイル [高密度リポタンパク質-コレステロール（HDL コレステロール）、低密度リポタンパク質-コレステロール（LDL コレステロール）、超低密度リポタンパク質-コレステロール（VLDL コレステロール）およびカイロミクロンコレステロール] を調べた。また、コレステロール分画（HDL コレステロール、LDL コレステロール、VLDL コレステロールおよびカイロミクロンコレステロール、%）およびトリグリセリド分画（HDL トリグリセリド、LDL トリグリセリド、VLDL トリグリセリドおよびカイロミクロントリグリセリド、%）についても調べた。コレステロールエステル（CE）値は次の式で計算した： $CE = \text{総コレステロール} - \text{遊離コレステロール}$ 。

5. 統計

全てのデータは平均値±標準偏差で表した。データは雌雄差、F検定により等分散性の統計解析として、まずF検定の等分散性の検定を行い、Student's t検定およびWelchの検定を行った。これらの検定および計算にはMUSCOT統計解析ソフトウェア（ユックムス株式会社、神奈川、日本）を使用し、有意水準は5%とした。

結果

1. 体重

0～12ヶ月齢の動物の体重を Fig. 1 に示した。出生時の体重は雄で 336 ± 83 g、雌で 385 ± 65 g であり、有意な性差を示した ($P < 0.01$)。しかし、1ヶ月齢から12ヶ月齢までの雌雄の体重はほぼ等しく、性差は見られなかった。雌雄ともに、3ヶ月齢の体重は5kg未満であり、6ヶ月齢の体重は10kg未満であった。

Gompertz Function で作成した0～36ヶ月齢の動物の成長曲線を Fig. 2 に示した。成長曲線は生後18ヶ月でほぼプラトーに達している事 (約20kg) が判明した。

2. 血液学的検査

血液学的検査の結果を Table 4 に示した。赤血球数および白血球数を含む主要な血液学的パラメータは、好塩基球、リンパ球および好中球の割合を除いて性差はなかった。好塩基球およびリンパ球は雄と比較し雌で高値を示し、好中球は雌と比較し雄で高値を示した。マイクロミニピッグのAPTTは雌雄ともに、一般のミニブタの基準値 [14、15、34] と比較し、低値傾向を示したが、ごく軽度であった。

3. 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Table 5 に示した。肝系パラメータおよび腎系パラメータを含む主な血液生化学的パラメータに性差は見られなかった。しかしながら、いくつかの血液生化学検査パラメータは有意な性差を示した。具体的には、アラニンアミノ

トランスフェラーゼ (ALT)、グロブリン、総コレステロールの血清値は雄と比較し雌で高く、尿素窒素とナトリウムは雌と比較し雄で高かった。一般のミニブタの基準値 [14、15、34] と比較し、マイクロミニピッグの特徴として、アルカリホスファターゼ (ALP) とアルブミンが高値傾向を示し、総ビリルビンが低値傾向を示したが、軽微であった。血液生化学的検査の月齢ごとの値を Table 6 に示した。月齢による差においては、生後 0 ヶ月のアルカリホスファターゼ、総ビリルビン、総コレステロール、トリグリセリド、グルコース値は、雌雄ともに生後 1~34 ヶ月の値より高かった。一方、生後 0 ヶ月のアラニンアミノトランスフェラーゼ値 (ALT) は生後 1~34 ヶ月の値より低かった。

4. 脂質代謝パラメータ

脂質代謝パラメータの結果を Table 7 に示した。一般のミニブタの基準値 [14、34] と比較し、マイクロミニピッグの特徴として、総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、コレステロールエステル、LDL コレステロールの血清中濃度は雄と比較し雌で高値を示した。総コレステロールに対する LDL コレステロールの割合 (%) も雄と比較し雌では高値であったが、HDL コレステロールでは雄と比較し雌が低値であった。トリグリセリド分画には性差はみられなかった。

考察

本章では、大型実験動物に分類されるにも関わらず体が小さく取扱いが容易なマイクロミニピッグが実験動物として使用可能であることを確認するために、マイクロミニピッグの体重、成長曲線、血液学的検査、血液生化学的検査、および脂質代謝パラメータの基準値を調べた。

マイクロミニピッグの体重は、6ヶ月齢の体重で、雄雌ともに10 kg未満であり、成長曲線は生後18ヶ月で約20 kgであった。家畜ブタは6ヶ月齢の体重が約100 kgであり、成熟期で200～350 kgになる[35]。家畜ブタよりも小型であるミニブタは、世界で最も使用されている系統であるGöttingenミニブタで体重が30～40 kgであり[10、17]、本試験で確認したマイクロミニピッグの体重はミニブタよりも明らかに小さい世界最小のブタであることが判明した。小動物と比べ、大動物では採血量が多く採れる利点があるが、大動物の中でも非常に大型であることは、広い飼育室が必要になること、実験者の実験操作時の負荷が大きくなることから好ましくなく、より小型の大動物が取り扱いの点で有用である。マイクロミニピッグは家畜ブタや一般のミニブタよりも取り扱いの点で有用な小型の大動物であることを本章の研究により明らかにできた[31、32]。

血液学的検査および血液生化学的検査において、主要項目では明らかな性差はみられなかった。マイクロミニピッグの血液学的検査および血液生化学的検査における主要項目および多くの項目において、GöttingenおよびYucatanミニブタと同様であった[14、15、34]。一方で、一部の項目においては、Göttingenおよ

び Yucatan ミニブタの基準値 [14、15、34] と比較し、マイクロミニピッグの特徴がみられ、ALP とアルブミンが高い傾向を示し、APTT と総ビリルビンが低い傾向を示した。これらのマイクロミニピッグと他の一般のミニブタとの血液学のおよび生化学的な違いは、食餌などの環境要因や遺伝的要因に関連している可能性があると考えられ、実験動物の使用において問題ないと判断した。なお、上述したマイクロミニピッグの特徴的な変化は、一般のミニブタの基準値 [32~34] と比較して軽微であり、実験動物として使用に困るような、種特異的な明らかな逸脱値はみられていないと判断した。

マイクロミニピッグの月齢における血液生化学的検査において、ALP、ALT などいくつかのパラメータは月齢によって変動したが、これらは Göttingen ミニブタの基準値 [14、17、34] と同様に、年齢によって変動した。脂質代謝パラメータにおいては、雄と比較し雌において血清中総コレステロール濃度が 0~34 ヶ月齢で一貫して高値を示したが、血清中トリグリセリド濃度は明らかな性差はなかった。これらの性差は Göttingen ミニブタの基準値と同様であった [14、34]。マイクロミニピッグの総コレステロール、総タンパク質、アルブミン、グルコースの血清レベルは報告されている Göttingen ミニブタの基準値 [14] よりも高値を示し、これらの差は栄養状態に関係している可能性があると考えられた。マイクロミニピッグには体重の 1~8% に相当する飼料が与えられていたのに対し、Göttingen ミニブタでは通常 2~3% が与えられている [17]。マイクロミニピッグの雌雄ともに 0 ヶ月齢の総コレステロール濃度が 1~34 ヶ月齢より高いのは、おそらく泌乳期

および離乳期の飼料に高脂肪含量（約 5～6%）の豚乳が含まれていたためであると考えられた [36]。

成熟し取り扱いが容易で生命科学研究で使用頻度が高いと考えられる 5 ヶ月齢のマイクロミニピッグについて、脂質プロファイルをより詳細に調査した結果、総コレステロール、遊離コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、LDL コレステロールの血清中濃度は雌で高値を示した。雌のマイクロミニピッグで脂質代謝マーカーが高い値を示す事は、ヒトと同様に、雌で脂肪分解感受性が高いことに関係している可能性が考えられた [37]。ヒトにおいて女性は女性ホルモンの影響で男性よりも HDL コレステロール値が高いが、マイクロミニピッグでは雌では HDL コレステロール値が低い傾向が明らかになった。ヒトの小児でも同様の傾向がみられたことから [38]、マイクロミニピッグの雌で HDL コレステロール値が低い傾向は、年齢が若い事に起因していると考えられた。これらは、マイクロミニピッグの雌で総コレステロールに占める LDL コレステロールの割合が高く、HDL コレステロールの割合が低かったこととも関連していると考えられる。このようなマイクロミニピッグの脂質プロファイルにおける性差は、これまでに報告されたことのない新しい知見である [31、32]。

本章の研究において、正常なマイクロミニピッグの体重、成長曲線、血液学的検査および血液生化学的検査の基準値の範囲を示すことができた。具体的なマイクロミニピッグの特性として、超小型であること、血液学的検査、血液生化学的検査および脂質代謝パラメータは主要項目がミニブタと類似した値であること、マ

マイクロミニピッグの種特異的な明らかな逸脱値がないことが確認できた。これらの結果から、マイクロミニピッグの実験動物としての有用性があると判断した。なお、現状としてブリーダーの継続的な努力にもかかわらず、ブタが大型実験動物の中で生命科学研究に広く利用されていない理由の一つとして、血液の影響を確認するための血液学的検査および血液生化学的検査の基準値の不足が考えられている [16]。本研究で得られた血液学的検査および血液生化学的検査の基準値（背景値）は血液への影響を確認する為に有用であり、マイクロミニピッグを実験動物で使用するための基本的な参考値となるものであり、生命科学研究におけるマイクロミニピッグの利用に貢献すると考えられる。

表および付図

Table 2. 血液学的検査の測定項目および方法の詳細

| 検査項目 | 単位 | 測定方法 | 機種 |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 赤血球 (RBC) | $10^6/\mu\text{L}$ | 2角度レーザーフローサイトメトリー法 | ADVIA 120 ^{a)} |
| 白血球 (WBC) | $10^3/\mu\text{L}$ | | |
| ヘマトクリット (Ht) | % | 計算式：(平均赤血球容積×赤血球) / 10 | |
| ヘモグロビン (HGB) | g/dL | シアンメトヘモグロビン変法 | |
| 血小板 (PLT) | $10^3/\mu\text{L}$ | 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 (MCV) | fL | | |
| 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) | 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 (MCHC) | g/dL | 計算式：[ヘモグロビン / (赤血球×平均赤血球容積)] × 1000 | |
| プロトロンビン時間 (PT) | s | 凝固法 | CA- 7000 ^{b)} |
| 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) | s | | |

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

b) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社、兵庫、日本)

Table 3. 血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細

| 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 (AST) | IU/L | JSCC 標準化対応 | JCA- BM 6070 ^{a)} |
| アラニンアミノトラン スフェラーゼ (ALT) | IU/L | | |
| アルカリホスファター ゼ (ALP) | IU/L | | |
| クレアチンキナーゼ (CK) | IU/L | | |
| 総ビリルビン (T-Bil) | mg/dL | バナジン酸酸化法 | |
| 総蛋白 (TP) | g/dL | ビウレット法 | |
| アルブミン (Alb) | g/dL | BCG 法 | |
| グロブリン (Glb) | g/dL | 計算式: TP-Alb | - |
| A/G 比 | - | 計算式: Alb/Glb | |
| 総コレステロール (T-cho) | mg/dL | COD・HMMPS 法 | JCA- BM 6070 ^{a)} |
| トリグリセリド (TG) | mg/dL | GPO・HMMPS 法、 グリセリン消去法 | |
| ブドウ糖 (GLU) | mg/dL | ヘキソキナーゼ・ G-6-PDH 法 | |
| 尿素窒素 (UN) | mg/dL | ウレアーゼ・ G1DH 法 | |
| クレアチニン (Cre) | mg/dL | クレアチニナーゼ ・ HMMPS 法 | |
| 無機リン (IP) | mg/dL | PNP・XDH 法 | |
| カルシウム (Ca) | mg/dL | MXB 法 | |
| ナトリウム (Na) | mEq/L | 電極法 | |
| カリウム (K) | mEq/L | | |
| 塩素 (Cl) | mEq/L | | |

a) 自動分析装置 (日本電子株式会社、東京、日本)

Fig. 1. 体重

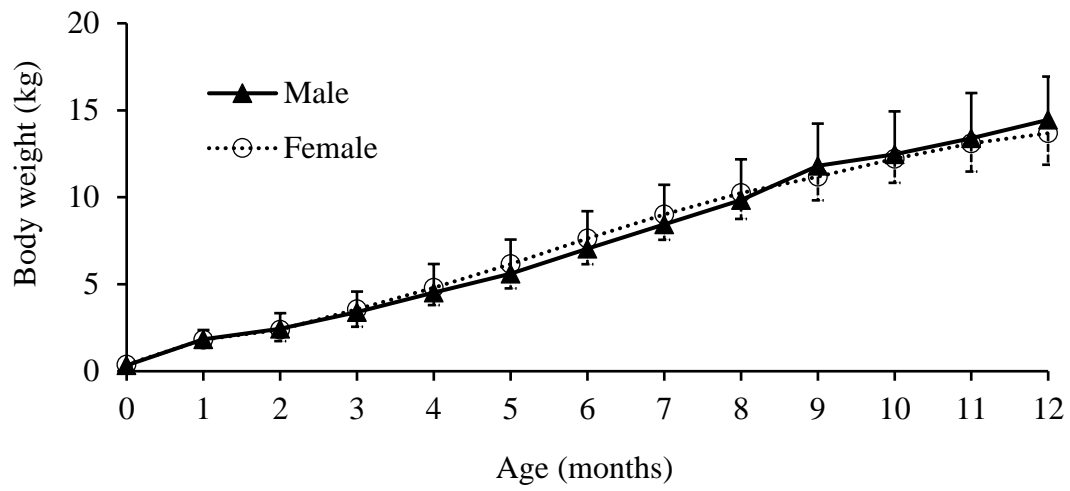


Fig. 2. Gompertz function で予測した体重曲線

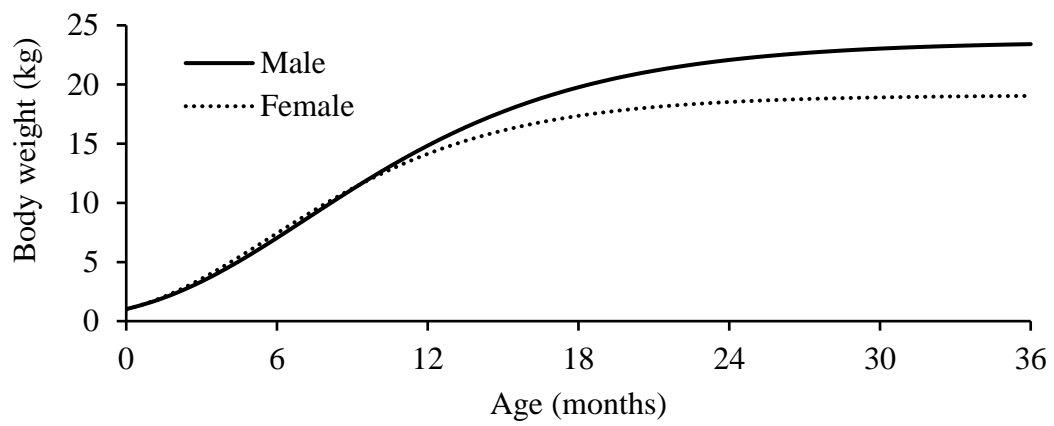


Table 4. 血液学的検査の結果

| Parameter | Unit | Male (n=58) | | Female (n=66) | | Whole (n=124) | |
|--|----------------------------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | | Mean \pm SD | (Range) | Mean \pm SD | (Range) | Mean \pm SD | (Range) |
| Erythrocyte count | 10 ⁶ /mm ³ | 7.85 \pm 0.75 | (5.08–9.46) | 7.66 \pm 0.89 | (4.28–9.39) | 7.75 \pm 0.83 | (4.28–9.46) |
| Leukocyte count | 10 ³ /mm ³ | 12.41 \pm 5.11 | (5.95–35.44) | 12.64 \pm 3.92 | (6.66–28.07) | 12.53 \pm 4.50 | (5.95–35.44) |
| Hematocrit | % | 45.60 \pm 5.48 | (23.20–57.40) | 44.72 \pm 5.60 | (21.60–55.90) | 45.13 \pm 5.54 | (21.60–57.40) |
| Hemoglobin | g/dl | 14.84 \pm 1.85 | (8.10–18.80) | 14.69 \pm 1.98 | (7.70–18.50) | 14.76 \pm 1.91 | (7.70–18.80) |
| Platelet | 10 ³ /mm ³ | 426.1 \pm 126.3 | (87.0–700.0) | 439.5 \pm 132.9 | (129.0–786.0) | 433.2 \pm 129.5 | (87.0–786.0) |
| Mean corpuscular volume | fL | 58.06 \pm 3.85 | (45.60–64.60) | 58.50 \pm 4.44 | (47.50–68.80) | 58.29 \pm 4.17 | (45.60–68.80) |
| Mean corpuscular hemoglobin | pg | 18.93 \pm 1.60 | (14.20–21.80) | 19.22 \pm 1.75 | (14.10–22.30) | 19.08 \pm 1.68 | (14.10–22.30) |
| Mean corpuscular hemoglobin concentration | g/dl | 32.58 \pm 1.39 | (28.30–34.90) | 32.84 \pm 1.27 | (28.90–36.70) | 32.72 \pm 1.33 | (28.30–36.70) |
| Reticulocytes | % | 1.85 \pm 3.91 | (0.20–25.20) | 1.44 \pm 3.00 | (0.20–22.60) | 1.63 \pm 3.45 | (0.20–25.20) |
| Eosinophils | % | 2.53 \pm 1.46 | (0.40–6.40) | 2.42 \pm 1.48 | (0.30–6.60) | 2.47 \pm 1.47 | (0.30–6.60) |
| Basophils | % | 0.91 \pm 0.32 | (0.40–2.10) | 1.02 \pm 0.30* | (0.40–1.90) | 0.97 \pm 0.31 | (0.40–2.10) |
| Monocytes | % | 5.20 \pm 1.36 | (1.90–7.80) | 5.18 \pm 1.50 | (2.70–10.50) | 5.19 \pm 1.43 | (1.90–10.50) |
| Lymphocytes | % | 56.57 \pm 13.01 | (23.80–82.50) | 60.88 \pm 9.91* | (28.80–82.20) | 58.86 \pm 11.62 | (23.80–82.50) |
| Neutrophils | % | 33.29 \pm 12.10 | (10.80–63.80) | 28.82 \pm 9.81* | (9.40–61.90) | 30.91 \pm 11.12 | (9.40–63.80) |
| Large unstained cells | % | 1.51 \pm 0.68 | (0.30–3.40) | 1.69 \pm 0.93 | (0.30–4.10) | 1.60 \pm 0.83 | (0.30–4.10) |
| Eosinophils | 10 ³ /mm ³ | 0.30 \pm 0.21 | (0.03–1.38) | 0.30 \pm 0.21 | (0.03–1.05) | 0.30 \pm 0.21 | (0.03–1.38) |
| Basophils | 10 ³ /mm ³ | 0.12 \pm 0.08 | (0.03–0.42) | 0.13 \pm 0.05 | (0.05–0.29) | 0.12 \pm 0.07 | (0.03–0.42) |
| Monocytes | 10 ³ /mm ³ | 0.63 \pm 0.26 | (0.12–1.79) | 0.66 \pm 0.33 | (0.24–2.46) | 0.65 \pm 0.30 | (0.12–2.46) |
| Lymphocytes | 10 ³ /mm ³ | 7.04 \pm 3.56 | (3.46–19.77) | 7.62 \pm 2.53 | (3.99–18.47) | 7.35 \pm 3.06 | (3.46–19.77) |
| Neutrophils | 10 ³ /mm ³ | 4.15 \pm 2.50 | (0.94–15.41) | 3.72 \pm 1.98 | (1.32–10.65) | 3.92 \pm 2.24 | (0.94–15.41) |
| Large unstained cells | 10 ³ /mm ³ | 0.18 \pm 0.11 | (0.02–0.59) | 0.21 \pm 0.13 | (0.04–0.63) | 0.20 \pm 0.12 | (0.02–0.63) |
| Prothrombin time [#] | s | 13.05 \pm 0.93 | (11.20–16.00) | 12.87 \pm 0.88 | (10.60–14.70) | 12.95 \pm 0.90 | (10.60–16.00) |
| Activated partial thromboplastin time [#] | s | 11.79 \pm 1.63 | (7.80–17.00) | 11.46 \pm 1.19 | (8.90–13.70) | 11.61 \pm 1.42 | (7.80–17.00) |

* $P < 0.05$; significantly different from male. [#]Male (n=55), Female (n=64), Whole (n=119).

Table 5. 血液生化学的検査の結果

| Parameter | Unit | Male (n=58) | | Female (n=67) | | Whole (n=125) | |
|--------------------------------|-------|---------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Mean ± SD | (Range) | Mean ± SD | (Range) | Mean ± SD | (Range) |
| Aspartate aminotransferase | IU/l | 39.72 ± 15.64 | (20.0–124.0) | 41.19 ± 27.54 | (19.0–225.0) | 40.51 ± 22.73 | (19.0–225.0) |
| Alanine aminotransferase | IU/l | 42.52 ± 12.46 | (21.0–74.0) | 47.96 ± 17.67* | (16.0–97.0) | 45.43 ± 15.65 | (16.0–97.0) |
| Alkaline phosphatase | IU/l | 725.0 ± 708.2 | (176.0–4246.0) | 560.9 ± 373.2 | (175.0–2087.0) | 637.0 ± 558.0 | (175.0–4246.0) |
| Creatinine kinase | IU/l | 724.6 ± 929.1 | (134.0–5102.0) | 761.3 ± 1220.8 | (158.0–8446.0) | 744.3 ± 1085.1 | (134.0–8446.0) |
| Total bilirubin | mg/dl | 0.031 ± 0.043 | (0.000–0.320) | 0.032 ± 0.040 | (0.000–0.270) | 0.032 ± 0.041 | (0.000–0.320) |
| Total protein | g/dl | 7.69 ± 0.97 | (5.50–10.40) | 7.67 ± 0.97 | (4.90–10.30) | 7.68 ± 0.97 | (4.90–10.40) |
| Albumin | g/dl | 4.48 ± 0.47 | (3.40–5.50) | 4.30 ± 0.52 | (2.40–5.20) | 4.38 ± 0.50 | (2.40–5.50) |
| Globulin | g/dl | 3.21 ± 0.92 | (1.30–5.30) | 3.37 ± 0.96* | (1.40–6.80) | 3.30 ± 0.94 | (1.30–6.80) |
| Albumin-globulin ratio | ratio | 1.53 ± 0.53 | (0.71–3.46) | 1.40 ± 0.47 | (0.51–3.00) | 1.46 ± 0.50 | (0.51–3.46) |
| Total cholesterol [#] | mg/dl | 74.36 ± 16.56 | (43.0–121.0) | 96.70 ± 61.20** | (57.0–533.0) | 86.30 ± 47.20 | (43.0–533.0) |
| Triglycerides | mg/dl | 41.71 ± 30.30 | (17.0–236.0) | 47.36 ± 21.84 | (19.0–117.0) | 44.74 ± 26.15 | (17.0–236.0) |
| Glucose | mg/dl | 91.02 ± 25.65 | (69.0–224.0) | 90.03 ± 15.66 | (66.0–146.0) | 90.49 ± 20.81 | (66.0–224.0) |
| Urea nitrogen | mg/dl | 14.55 ± 3.65 | (6.80–25.40) | 13.06 ± 2.94* | (7.80–24.20) | 13.75 ± 3.36 | (6.80–25.40) |
| Creatinine | mg/dl | 0.97 ± 0.34 | (0.49–1.94) | 0.87 ± 0.25 | (0.31–1.78) | 0.91 ± 0.30 | (0.31–1.94) |
| Phosphorus | mg/dl | 6.69 ± 1.57 | (4.77–13.21) | 6.92 ± 1.40 | (3.85–11.74) | 6.82 ± 1.48 | (3.85–13.21) |
| Calcium | mg/dl | 10.71 ± 0.59 | (9.80–12.30) | 10.63 ± 0.52 | (9.30–12.30) | 10.67 ± 0.56 | (9.30–12.30) |
| Sodium | mEq/l | 145.5 ± 3.0 | (136.0–153.0) | 144.1 ± 4.0* | (119.0–151.0) | 144.8 ± 3.6 | (119.0–153.0) |
| Potassium | mEq/l | 5.75 ± 0.65 | (4.00–7.50) | 5.73 ± 0.78 | (4.30–7.40) | 5.74 ± 0.72 | (4.00–7.50) |
| Chloride | mEq/l | 103.4 ± 3.2 | (93.0–111.0) | 103.3 ± 4.2 | (76.0–108.0) | 103.4 ± 3.8 | (76.0–111.0) |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; significantly different from male. [#]Female (n=66), Whole (n=124).

Table 6. 月齢ごとの血液生化学的検査の結果

| Parameter | Unit | Sex | Age (months) | | | | | | |
|-------------------------------|-------|-----|-----------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | 0 (M=4, F=3) | 1-3 (M=5, F=12) | 4-6 (M=7, F=7) | 7-9 (M=15, F=22) | 10-12 (M=7, F=5) | 13-24 (M=14, F=10) | 25-34 (M=6, F=8) |
| Aspartate aminotransferase | IU/l | M+F | 43.3 ± 18.9 | 43.4 ± 11.4 | 37.9 ± 25.2 | 42.1 ± 33.3 | 37.0 ± 7.7 | 38.5 ± 13.7 | 40.5 ± 21.9 |
| | | M | 40.5 ± 14.8 | 43.6 ± 10.1 | 43.0 ± 36.1 | 33.7 ± 7.3 | 39.7 ± 6.5 | 42.8 ± 13.3 | 40.2 ± 13.6 |
| | | F | 47.0 ± 26.5 | 43.3 ± 12.3 | 32.7 ± 4.4 | 47.9 ± 42.1 | 33.2 ± 8.3 | 32.6 ± 12.4 | 40.8 ± 27.5 |
| Alanine aminotransferase | IU/l | M+F | 29.4 ± 5.0 | 40.9 ± 14.4 | 54.6 ± 17.8 | 47.8 ± 18.5 | 42.8 ± 11.7 | 45.2 ± 12.0 | 46.1 ± 12.5 |
| | | M | 28.8 ± 5.4 | 38.0 ± 12.7 | 45.0 ± 16.1 | 39.1 ± 10.9 | 44.6 ± 13.3 | 47.9 ± 9.8 | 46.2 ± 14.0 |
| | | F | 30.3 ± 5.5 | 42.2 ± 15.4 | 64.1 ± 14.6* | 53.7 ± 20.4** | 40.2 ± 9.8 | 41.5 ± 14.3 | 46.1 ± 12.3 |
| Alkaline phosphatase | IU/l | M+F | 2399.3 ± 1138.7 | 863.9 ± 228.3 | 584.6 ± 239.8 | 468.0 ± 191.1 | 600.7 ± 223.6 | 455.3 ± 232.1 | 322.4 ± 137.6 |
| | | M | 2797.8 ± 1440.6 | 897.4 ± 249.7 | 662.4 ± 186.4 | 546.9 ± 230.7 | 710.6 ± 228.8 | 488.9 ± 276.9 | 285.2 ± 114.2 |
| | | F | 1868.0 ± 189.7 | 849.9 ± 228.9 | 506.7 ± 275.2 | 414.2 ± 140.1 | 446.8 ± 90.4* | 408.3 ± 150.5 | 350.3 ± 154.2 |
| Creatinine kinase | IU/l | M+F | 1185.7 ± 1027.8 | 404.6 ± 237.3 | 677.5 ± 1280.6 | 863.4 ± 1431.3 | 827.6 ± 1081.0 | 557.2 ± 474.0 | 937.3 ± 1250.2 |
| | | M | 953.0 ± 412.3 | 329.2 ± 82.7 | 990.1 ± 1814.5 | 656.8 ± 806.6 | 1033.7 ± 1409.2 | 589.6 ± 478.2 | 716.2 ± 697.8 |
| | | F | 1496.0 ± 1631.5 | 436.0 ± 275.3 | 364.9 ± 180.9 | 1004.2 ± 1739.8 | 539.0 ± 236.8 | 511.9 ± 489.9 | 1103.1 ± 1575.2 |
| Total bilirubin | mg/dl | M+F | 0.097 ± 0.136 | 0.008 ± 0.011 | 0.021 ± 0.023 | 0.027 ± 0.023 | 0.039 ± 0.028 | 0.034 ± 0.022 | 0.039 ± 0.027 |
| | | M | 0.095 ± 0.150 | 0.012 ± 0.008 | 0.017 ± 0.017 | 0.025 ± 0.015 | 0.047 ± 0.029 | 0.026 ± 0.019 | 0.023 ± 0.012 |
| | | F | 0.100 ± 0.148 | 0.006 ± 0.012 | 0.024 ± 0.028 | 0.029 ± 0.027 | 0.028 ± 0.026 | 0.045 ± 0.022* | 0.051 ± 0.029* |
| Urea nitrogen | mg/dl | M+F | 10.3 ± 2.5 | 12.2 ± 2.2 | 12.6 ± 2.4 | 13.6 ± 2.9 | 14.8 ± 4.1 | 15.3 ± 3.6 | 15.4 ± 3.6 |
| | | M | 8.8 ± 2.0 | 13.0 ± 2.1 | 13.3 ± 2.5 | 14.5 ± 3.1 | 16.6 ± 4.3 | 16.4 ± 3.8 | 14.6 ± 2.0 |
| | | F | 12.4 ± 1.3* | 11.9 ± 2.3 | 11.8 ± 2.3 | 13.0 ± 2.6 | 12.1 ± 1.9 | 13.9 ± 2.8 | 16.0 ± 4.6 |
| Creatinine | mg/dl | M+F | 0.62 ± 0.04 | 0.88 ± 0.21 | 0.82 ± 0.25 | 0.80 ± 0.19 | 0.89 ± 0.18 | 1.17 ± 0.40 | 1.08 ± 0.28 |
| | | M | 0.61 ± 0.04 | 0.84 ± 0.10 | 0.74 ± 0.25 | 0.87 ± 0.19 | 0.99 ± 0.15 | 1.19 ± 0.45 | 1.27 ± 0.29 |
| | | F | 0.64 ± 0.04 | 0.90 ± 0.24 | 0.89 ± 0.25 | 0.76 ± 0.19 | 0.75 ± 0.11* | 1.14 ± 0.33 | 0.93 ± 0.17* |

Table 6. 月齢ごとの血液生化学的検査の結果（続き）

| Parameter | Unit | Sex | Age (months) | | | | | | |
|------------------------|-------|-----|-----------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | 0 (M=4, F=3) | 1-3 (M=5, F=12) | 4-6 (M=7, F=7) | 7-9 (M=15, F=22) | 10-12 (M=7, F=5) | 13-24 (M=14, F=10) | 25-34 (M=6, F=8) |
| Total cholesterol † | mg/dl | M+F | 202.4 ± 155.8 | 82.2 ± 8.9 | 85.9 ± 18.9 | 74.1 ± 14.6 | 83.3 ± 12.3 | 80.3 ± 14.6 | 77.6 ± 22.9 |
| | | M | 112.5 ± 8.4 | 73.8 ± 6.6 | 74.3 ± 6.4 | 66.0 ± 12.7 | 82.0 ± 10.7 | 74.9 ± 14.0 | 60.2 ± 14.2 |
| | | F | 322.3 ± 187.0 | 85.7 ± 7.3** | 97.4 ± 20.5* | 79.8 ± 13.3** | 85.2 ± 15.5 | 87.7 ± 12.5* | 90.8 ± 19.3** |
| Triglycerides | mg/dl | M+F | 102.6 ± 63.9 | 42.6 ± 12.9 | 41.9 ± 13.4 | 40.9 ± 19.5 | 41.3 ± 28.0 | 44.1 ± 14.8 | 35.4 ± 13.8 |
| | | M | 116.0 ± 85.2 | 41.4 ± 8.7 | 33.7 ± 6.2 | 33.5 ± 9.4 | 35.1 ± 14.9 | 41.6 ± 13.5 | 30.2 ± 9.8 |
| | | F | 84.7 ± 22.9 | 43.1 ± 14.7 | 50.0 ± 14.1* | 46.0 ± 23.0* | 49.8 ± 40.8 | 47.6 ± 16.4 | 39.4 ± 15.6 |
| Total protein | g/dl | M+F | 6.0 ± 0.7 | 6.3 ± 0.6 | 7.8 ± 0.6 | 8.0 ± 0.6 | 8.0 ± 0.5 | 8.1 ± 0.8 | 8.2 ± 0.8 |
| | | M | 6.0 ± 0.5 | 6.0 ± 0.3 | 7.7 ± 0.5 | 7.9 ± 0.6 | 8.1 ± 0.5 | 8.2 ± 0.9 | 8.0 ± 0.7 |
| | | F | 6.0 ± 1.0 | 6.5 ± 0.7 | 7.9 ± 0.7 | 8.0 ± 0.7 | 8.0 ± 0.5 | 8.0 ± 0.4 | 8.4 ± 1.0 |
| Albumin | g/dl | M+F | 3.9 ± 0.4 | 4.0 ± 0.6 | 4.4 ± 0.3 | 4.3 ± 0.4 | 4.9 ± 0.3 | 4.7 ± 0.4 | 4.5 ± 0.4 |
| | | M | 3.9 ± 0.4 | 4.4 ± 0.3 | 4.5 ± 0.3 | 4.3 ± 0.5 | 5.0 ± 0.3 | 4.6 ± 0.5 | 4.6 ± 0.4 |
| | | F | 3.9 ± 0.5 | 3.9 ± 0.6 | 4.4 ± 0.4 | 4.3 ± 0.5 | 4.7 ± 0.3 | 4.7 ± 0.3 | 4.3 ± 0.4 |
| Globulin | g/dl | M+F | 2.1 ± 0.3 | 2.3 ± 0.9 | 3.4 ± 0.8 | 3.7 ± 0.8 | 3.2 ± 0.5 | 3.4 ± 0.7 | 3.8 ± 1.0 |
| | | M | 2.100 ± 0.141 | 1.660 ± 0.207 | 3.257 ± 0.600 | 3.667 ± 0.899 | 3.086 ± 0.679 | 3.571 ± 0.796 | 3.383 ± 0.475 |
| | | F | 2.133 ± 0.503 | 2.617 ± 0.9** | 3.586 ± 0.895 | 3.700 ± 0.796 | 3.260 ± 0.336 | 3.220 ± 0.496 | 4.088 ± 1.271 |
| Albumin-globulin ratio | ratio | M+F | 1.854 ± 0.185 | 1.992 ± 0.804 | 1.351 ± 0.329 | 1.236 ± 0.377 | 1.604 ± 0.390 | 1.416 ± 0.299 | 1.249 ± 0.312 |
| | | M | 1.9 ± 0.2 | 2.7 ± 0.5 | 1.4 ± 0.3 | 1.3 ± 0.4 | 1.7 ± 0.5 | 1.3 ± 0.3 | 1.4 ± 0.2 |
| | | F | 1.9 ± 0.2 | 1.7 ± 0.7* | 1.3 ± 0.3 | 1.2 ± 0.4 | 1.5 ± 0.2 | 1.5 ± 0.3 | 1.2 ± 0.4 |

Table 6. 月齢ごとの血液生化学的検査の結果（続き）

| Parameter | Unit | Sex | Age (months) | | | | | | |
|------------|-------|-----|-----------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | 0 (M=4, F=3) | 1-3 (M=5, F=12) | 4-6 (M=7, F=7) | 7-9 (M=15, F=22) | 10-12 (M=7, F=5) | 13-24 (M=14, F=10) | 25-34 (M=6, F=8) |
| Glucose | mg/dl | M+F | 136.9 ± 38.9 | 98.1 ± 16.4 | 88.1 ± 12.5 | 82.5 ± 10.2 | 84.2 ± 7.2 | 88.9 ± 20.2 | 89.6 ± 20.8 |
| | | M | 148.8 ± 50.7 | 110.4 ± 18.4 | 86.7 ± 8.4 | 84.5 ± 11.2 | 82.0 ± 5.9 | 86.5 ± 25.0 | 78.8 ± 6.1 |
| | | F | 121.0 ± 5.3 | 93.0 ± 13.2* | 89.6 ± 16.2 | 81.2 ± 9.5 | 87.2 ± 8.3 | 92.2 ± 10.5 | 97.6 ± 24.6 |
| Phosphorus | mg/dl | M+F | 11.3 ± 1.0 | 8.1 ± 1.0 | 6.8 ± 0.7 | 6.5 ± 0.7 | 6.1 ± 0.6 | 6.3 ± 0.6 | 5.5 ± 0.6 |
| | | M | 11.2 ± 1.4 | 8.4 ± 0.6 | 6.7 ± 0.7 | 6.4 ± 0.5 | 6.0 ± 0.6 | 6.1 ± 0.7 | 5.2 ± 0.3 |
| | | F | 11.5 ± 0.5 | 8.0 ± 1.1 | 6.9 ± 0.7 | 6.5 ± 0.8 | 6.3 ± 0.5 | 6.4 ± 0.5 | 5.8 ± 0.7 |
| Calcium | mg/dl | M+F | 11.8 ± 0.4 | 10.8 ± 0.5 | 10.7 ± 0.4 | 10.5 ± 0.4 | 11.0 ± 0.4 | 10.6 ± 0.5 | 10.3 ± 0.3 |
| | | M | 11.6 ± 0.3 | 11.1 ± 0.4 | 10.8 ± 0.3 | 10.4 ± 0.4 | 11.1 ± 0.4 | 10.6 ± 0.7 | 10.3 ± 0.4 |
| | | F | 12.0 ± 0.4 | 10.6 ± 0.5 | 10.6 ± 0.4 | 10.5 ± 0.5 | 10.9 ± 0.4 | 10.7 ± 0.3 | 10.2 ± 0.2 |
| Sodium | mEq/l | M+F | 144.6 ± 3.4 | 143.5 ± 2.3 | 144.6 ± 2.3 | 144.3 ± 5.2 | 146.2 ± 2.4 | 145.6 ± 2.7 | 145.1 ± 2.7 |
| | | M | 144.3 ± 3.0 | 144.4 ± 1.7 | 145.7 ± 2.4 | 144.7 ± 3.3 | 146.9 ± 2.9 | 145.9 ± 3.2 | 146.7 ± 3.4 |
| | | F | 145.0 ± 4.6 | 143.2 ± 2.6 | 143.6 ± 1.9 | 144.0 ± 6.2 | 145.2 ± 1.1 | 145.1 ± 1.8 | 143.9 ± 1.2 |
| Potassium | mEq/l | M+F | 6.1 ± 1.1 | 5.8 ± 1.1 | 5.6 ± 0.7 | 5.7 ± 0.6 | 5.9 ± 0.5 | 5.8 ± 0.7 | 5.4 ± 0.6 |
| | | M | 6.0 ± 1.3 | 6.0 ± 1.1 | 5.9 ± 0.4 | 5.6 ± 0.4 | 5.9 ± 0.5 | 5.8 ± 0.7 | 5.5 ± 0.6 |
| | | F | 6.3 ± 1.1 | 5.8 ± 1.1 | 5.4 ± 0.8 | 5.8 ± 0.7 | 5.9 ± 0.7 | 5.7 ± 0.7 | 5.3 ± 0.6 |
| Chloride | mEq/l | M+F | 106.6 ± 2.1 | 106.2 ± 1.8 | 103.4 ± 3.1 | 102.3 ± 5.0 | 102.9 ± 2.9 | 102.8 ± 2.9 | 102.3 ± 2.3 |
| | | M | 107.5 ± 1.7 | 106.0 ± 2.2 | 103.9 ± 3.3 | 102.2 ± 3.2 | 103.3 ± 3.3 | 102.4 ± 3.1 | 103.7 ± 2.2 |
| | | F | 105.3 ± 2.3 | 106.3 ± 1.7 | 103.0 ± 3.0 | 102.4 ± 6.1 | 102.4 ± 2.5 | 103.3 ± 2.7 | 101.3 ± 2.0 |

M, Males; F, Females. † 7-9 months of age (M=15, F=21). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significantly different from males.

Table 7. 脂質代謝パラメータ

| Parameter | Unit | Age 5 months of age | |
|------------------------|-------|---------------------|---------------|
| | | Males (n=5) | Females (n=5) |
| T-Cho | mg/dl | 77.8 ± 11.3 | 94.8 ± 3.7* |
| Free-Cho | mg/dl | 16.4 ± 2.5 | 20.8 ± 1.1** |
| CE | mg/dl | 61.4 ± 8.9 | 74.0 ± 3.1* |
| Triglycerides | mg/dl | 35.4 ± 6.6 | 54.4 ± 8.2** |
| HDL-C | mg/dl | 40.8 ± 10.1 | 39.4 ± 7.5 |
| LDL-C | mg/dl | 31.2 ± 5.7 | 49.2 ± 6.4** |
| VLDL-C | mg/dl | 4.0 ± 1.2 | 4.0 ± 1.0 |
| CM-C | mg/dl | 1.6 ± 0.5 | 2.2 ± 0.4 |
| Cholesterol fraction | | | |
| HDL-C | % | 52.2 ± 6.8 | 41.6 ± 7.3* |
| LDL-C | % | 40.6 ± 6.8 | 52.2 ± 7.3* |
| VLDL-C | % | 5.2 ± 1.6 | 4.0 ± 1.0 |
| CM-C | % | 2.0 ± 0.0 | 2.2 ± 0.4 |
| Triglycerides fraction | | | |
| HDL Triglyceride | % | 13.8 ± 4.1 | 12.6 ± 2.5 |
| LDL Triglyceride | % | 38.8 ± 5.1 | 40.4 ± 5.3 |
| VLDL Triglyceride | % | 30.8 ± 5.0 | 29.2 ± 5.0 |
| CM Triglyceride | % | 16.6 ± 4.7 | 17.8 ± 8.0 |

T-Cho: Total cholesterol, Free-Cho: free cholesterol, CE: cholesterol ester, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol, CM-C: chylomicron cholesterol.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significantly different from males.

第II章 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動脈硬化モデルの開発

緒言

動脈硬化症は、脂肪分の多い食事による影響で欧米では患者数の増加が問題となっている [1、2]。動脈硬化症の克服・病態解明のため、動脈硬化モデル動物を開発することは、社会的に重要である。特にアテローム性動脈硬化症は日本人で増加しているが、アテローム性動脈硬化症の病態は遺伝的要因と環境的要因の両方が関連しているため、ヒトの生理と病態を再現する適切な実験動物モデルを用いて両要因を調べる必要がある。

従来 of 動脈硬化モデル動物は、主にウサギやマウスが使用されてきた。しかしながら、マウスの脂質代謝は、ヒトで確認されている脂質代謝と大きく異なっている。マウスは高脂肪・高コレステロール食 (high fat and cholesterol diet、以下 HcD) が誘発する動脈硬化症に抵抗性があるため、動脈硬化になりにくい動物である。そのため、マウスでは、アポリポ蛋白 E (apoE) 遺伝子や低比重リポ蛋白コレステロール受容体 (LDLr) 遺伝子を欠損させることにより、高脂質血症や動脈硬化を発症させ、これらの遺伝子欠損によるモデル動物が動脈硬化の研究に多く用いられている [39、40]。apoE 欠損マウスや LDLr 欠損マウスに追加で遺伝子導入を実施することや、遺伝子をノックアウトさせて利用することは、アテローム性動脈硬化症における特定の遺伝子の影響を調べるためのマウスを利用する方法として報告されている [3~5、41]。一方で、ヒトと類似した脂質代謝を有し、アテローム性動脈硬化の誘発のための HcD に対して感受性が高いウサギは、マウスの次

によく使用される動物である。*LDLr* 遺伝子変異の Watanabe 遺伝性高脂質血症 (WHHL) ウサギはヒト家族性高コレステロール血症のモデル動物として報告されている [6、7、42]。最近のトランスジェニックウサギの開発により、アテローム性動脈硬化症の発症に対する様々な特異的遺伝子の影響が明らかになり、報告されている [43、44]。前述した通り、マウスやウサギが動脈硬化病変モデルとして一般的に使用されているが、マウスやウサギは脂質代謝やいくつかの環境因子の点でヒトとは異なっている。一方で、ブタは生理学的・解剖学的にヒトと類似し [8]、特に冠状動脈の解剖学的構造がヒトと類似しており [11]、食事および睡眠等の生活習慣、脂質代謝、日内変動もヒトと類似しているため、環境因子起因の動脈硬化病変の解析には、ウサギおよびマウスよりもブタの方が適していることが報告されている [3~7]。しかしながら、ブタはミニブタであっても体が大きいため [10、16]、管理が難しく、実験動物としては取り扱いに難がある。本論文の第 I 章の研究において、マイクロミニピッグが、他のブタに比べ超小型、取り扱いが容易であり、血液データからも実験動物として使用可能であることが判明できたため、病態モデルマイクロミニピッグは有用と考えた。

そこで本章では、マイクロミニピッグ動脈硬化モデルの構築を試みた。また病態モデル構築にあたり、再現性、簡便な手順で作出できることが重要と考え、食餌制御のみによる方法および短期間で動脈硬化モデルを構築することも目的とした [45]。

材料方法

1. 使用動物および動物の飼育環境

3ヶ月齢の雄マイクロミニピッグ（Fuji Micra Inc、静岡、日本）を22匹使用した。全ての動物は同じ飼育施設で、同じ飼育環境で飼育した。温度 $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 20\%$ 、明暗サイクル12時間、飼育スペースは1頭あたり $0.5\sim 1.2\text{ m}^2$ の環境で飼育した。なお、HLの活性においては5および25ヶ月齢のマイクロミニピッグを使用した。

2. 群構成および給餌

7匹の動物を普通食群に割り付け、普通食（マッシュ状ブタ用飼料であることから73、日清丸紅飼料株式会社、東京、日本、normal chow diet、以下 NcD）を給餌した。

各群5匹の動物を3つの高脂肪食群に割り付け、普通食に12%の脂肪と、各群0.2、0.5および1.5%の配分でコレステロールを混合した高脂肪食（high-fat/high-cholesterol diet、以下 HcD）を動物に給餌した。NcDおよびHcDは、8週間給餌した。群構成および給餌の詳細はTable 8示した。

3. 一般状態観察、体重および血圧

一般状態観察は生死の確認と合わせて、動物の状態を毎日確認した。動物の体重は毎週1回電子天秤（HP-40K、HP-60KおよびGP-60K、株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本）で測定した。血圧（拡張期血圧および収縮期血圧）は、実験期間終了週（8週目）に無麻酔下で生体情報モニタ（BX-10およびBX-10AD、オム

ロンコーリン株式会社、東京、日本) を用いて、前肢から測定した。

4. 血液学的検査および血液生化学的検査

採血は2週に1回、無麻酔下で前大静脈洞から採血した。血液学的検査においては、約1 mLを採血し、抗凝固剤としてEDTA-2Kを用いた全血を使用して測定した。血液学的検査の測定項目および方法の詳細はTable 9に示した。血液生化学的検査においては、約1.0 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)して得られた血清を用いて測定した。血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細はTable 10に示した。

5. コレステリルエステルトランスフェル蛋白 (CETP) および肝リパーゼ (HL) の活性

HLの活性については、NcDを摂取した生後5ヶ月と25ヶ月のマイクロミニピッグからヘパリンナトリウム (50 unit/kg BW) の静脈内注射前と注射10分後に血液を採取し、血清サンプルを用いて測定した。測定はHL活性測定キット (Progen Biotechnik GmbH、Heidelberg、Germany) を用いて分析した。

CETPアッセイはNcDを摂取した6匹のマイクロミニピッグから等量プールした血漿サンプルを使用した。ウサギおよびC57BL/6マウスの血清は購入したものを使用した (コスモバイオ、東京、日本)。Superose 6 10/300 GL FPLCカラム (Amersham Biosciences、Piscataway、NJ) を用いた高速蛋白液体クロマトグラフィー (FPLC) を用いて、リポ蛋白を分画した。希釈した血漿と

FPLC分画のアリコートにSDS-PAGEに供し、PVDF膜に転写し、イムノブロットを行った。コレステリルエステル（CE）転移蛋白（CETP）に対する抗体（マウスモノクローナル抗体：MABS1219およびウサギポリクローナル抗体：ab19012、5倍希釈）は、それぞれEMD Millipore社およびAbcam社：から購入した。蛋白は化学発光法（ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare Piscataway, NJ）を用いて可視化した。CETP欠損症の診断とCETP量の測定は、防衛医科大学校から提供された血清（高HDLコレステロール値がそれぞれ172 mg/dLと191 mg/dLであることから選抜した59歳男性と54歳女性の血清）を使用した。ゲノムDNAは市販のキット（Qiagen、Frederick、USA）を用いて調製した。CETP量は、JHC1とJHC2（日本たばこ産業、東京、日本）という2つのモノクローナル抗体とサンドイッチELISAを用いて測定した。ELISAとして捕捉抗体にはJHC1、検出抗体にはビオチン化したJHC2を用いてSECTOR（Meso Scale Diagnostics, LLC、USA）で測定した。ヒトCETPに特異的なクローン抗体については、一般的なCETP変異（イントロン14のスプライシング欠損、Int14 +1 G>A；アスパラギン酸からグリシンへのアミノ酸置換位置442、D442G）をInvader assay（Cleavase® enzyme、Technologies、USA）を使用して同定した。CE転移活性は、ポリエチレングリコールによる沈殿によって、干渉リポ蛋白を除去し、[14C]コレステリルエステル標識LDLを用いて、HDLをコレステリルエステルのアクセプターとして混合し、インキュベートした後、デキストラン硫酸で沈殿させてLDLとHDLを分離し、HDLを含む上清中を測定した。

6. カイロミクロン分画と超低比重リポ蛋白コレステロール分画 における血清中 ApoB プロファイル

血漿中のアポリポ蛋白 A1、B48、B100 を検出するために、生物種を超えて適用できる HPLC/MS/MS ベースの方法を利用した。apoA1 と apoB48/100 について、多重反応モニタリング (MRM) 法 [4] で測定した。カイロミクロン (CM) およ超低比重リポ蛋白コレステロール (VLDL) を、Himac 遠心機 (CP70MX、EppendorfHimac Technologies Co., Ltd.、茨木、日本)を用いて、ヒトの血清およびマイクロミニピッグの血漿から分離した。トラップカラムは EASY カラム、C18、0.1×2cm、5µm (ThermoScientific、USA)、分析カラムは Tip カラム、ODS、0.075×120mm (日京テクノス株式会社、東京、日本)。流速は 0.3 mL/min で測定した。

7. 皮下脂肪の蓄積 (背部脂肪の厚さ)

試験開始前および 8 週終了時に、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、栃木、日本) を用いて皮下脂肪の蓄積 (背部脂肪の厚さ) を測定した。背部脂肪の厚さは、両肩甲骨の下角の間の高さの中央部で測定し、厚さの増加率を算出した。

8. 病理解剖 (剖検)

8 週終了時に、各動物にメドトミジン水溶液 (ドミトール : Orion Corporation、Finland、1 mg/mL、0.04 mL/kg)、塩酸ケタミン水溶液 (Kamud Drugs Pvt. Ltd.、India、50 mg/mL、0.1 mL/kg) および、ミダゾラム (丸石製薬株式会社、大阪、日本、5 mg/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、東京、日本) 水溶液 (64.8 mg/mL、0.5 mL/kg) の静脈内投与により麻酔を行い、放血安楽死させ、外表、内部器官および組織を肉眼的に観察した。器官重量については、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および内臓脂肪組織 (大網および腸間膜脂肪) の重量を電子天秤 (HR-200、FX-3000N および GF-3000、株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本) を用いて測定した。さらに剖検時の体重から体重比相対重量を算出した。

9. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析

大動脈は、動脈硬化病変を確認するために、ホルマリン固定後に Oil-red O 染色液を用いて、大動脈の動脈硬化病変を染色した。動脈硬化病変について、*En face* 解析を行った。表面全体に対する Oil-red O 染色面積は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health、USA) を用いて算出した。その後、切り出し、パラフィン包埋後、下記の病理組織学的検査に供した。

10. 病理組織学的検査

各動物から採取した全身の動脈 (ウィリス動脈輪、脳底動脈、頸動脈、胸部・腹部大動脈、外・内腸骨動脈、冠状動脈等)、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および小腸を中心に、その他の全身の臓器 (気管、肺、舌、顎下腺、食道、胃、大腸、胆嚢、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、脳、脊髄、坐骨神経、胸骨、大腿骨、顎下リンパ節、膵臓、胸腺、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、眼球、視神経、涙腺、大腿四頭筋、腹部皮膚) も含め、

10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、常法により薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色後、病理組織学的検査を実施した。

大動脈については、動脈病変を確認するために *Elastica Masson* 染色も行った。染色は、脱パラフィン後に、レゾルシン・フクシン液、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液、スカーレット・フクシン液、リントングステン酸・リンモリブデン酸混合液、ライトグリーン液をそれぞれ用いて、定法により実施した。

11. 免疫組織化学的染色

動脈硬化性病変の免疫組織化学的染色として、キシレンによる脱パラフィン、加熱処理による賦活化、過酸化水素水によるペルオキシダーゼブロッキング、*Protein Block Serum-Free Ready-To-Use* による非特異反応のブロッキングを行い、一次抗体として、平滑筋アクチンに対応する抗体（*anti- α -SMA* クローン 1A4、 $\times 100$ 、*Dako Cytomation*、京都、日本）、およびマクロファージに対応する抗体（抗リゾチームウサギポリクローナル抗体、 $\times 2,000$ 、*Dako Cytomation*、京都、日本）を用い、二次抗体として HRP でラベルした *Envision* (*Dako Cytomation*、京都、日本)を用い、DAB で発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。

12. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）による肝臓

および小腸での mRNA 発現

肝臓と小腸は、剖検時サンプル採取後すぐに *RNA later* に保存し、*mirVana miRNA isolation kit* (*Invitrogen*、*Carlsbad*、USA)

を用いて全RNAを抽出した。mRNA発現は、TaqMan定量PCR分析（Applied Biosystems、Oyster Bay、USA）を用いてqRT-PCRで定量した。qRT-PCR（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）はハイブリダイゼーション法（PrimeTime Gene Expression Master Mix : Integrated DNA Technologies, Inc.）を使用した（逆転写反応：25°C /10分、42°C /60分、85°C /5分、熱変性：95°C /30秒、アニーリング及び伸張：60°C /30秒、45サイクルで実施）。qRT-PCRは、発現量を確認した遺伝子は、低比重リポ蛋白コレステロール受容体（*LDLr*、動脈硬化を促進するLDLに結合し細胞内に取り込むタンパク質）、スカベンジャー受容体クラスBI型（*SRBI*、HDLからコレステロールを受け取る主要な受容体である膜タンパク質）、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素（*HMGCR*、コレステロール合成経路の律速酵素）、ステロール調節エレメント結合蛋白-2（*SREBP-2*、コレステロール量により*HMGCR*等のコレステロール合成経路に関わる酵素遺伝子の転写因子）、NPC1L1 Niemann-Pick C1様1蛋白（*NPC1L1*、コレステロールの吸収を行うトランスポーター）、アポリポ蛋白B mRNA編集酵素触媒ポリペプチド.1（*APOBEC-1*、脂質代謝および脂質輸送を調節する遺伝子編集酵素）であり、遺伝子とPCRに使用したプライマー/プローブの詳細はTable 11に示した。プライマーおよびプローブは、あらかじめ設計された遺伝子発現アッセイから入手するか、ブタの配列情報（Applied Biosystems）に基づいて設計した（プライマーのアニーリング温度：60°C）。内部コントロールとしてGAPDH mRNAの発現量を用いた。

13. 統計

全てのデータは平均値±標準誤差で表した。データは群間差（NcD 群対 0.2%Cho-HcD 群、NcD 群対 0.5%Cho-HcD 群、NcD 群対 1.5%Cho-HcD 群）について、JMP ソフトウェア（JMP Pro 17、JMP Statistical Discovery LLC.、USA）を用いて、Dunnett 検定を行い、有意水準は 5%とした。

結果

1. 一般状態観察、体重、内臓脂肪の重量、背部脂肪の厚さ および血圧

5ヵ月齢の雄（体重約7kg）のNcDを摂取したマイクロミニピッグの外観をFig. 3に示した。一般状態観察において、実験期間の8週間、異常は何もみられなかった。体重は8週間に渡り、すべての群で増加した。NcD群と比較してHcD群では、より急激に体重が増加し、顕著な体重増加がみられた（Fig. 4）。内臓脂肪の器官重量においては、NcD群と比較してHcD群では大網、腸間膜脂肪の重量の高値がみられた（Table 12）。CT検査による背部脂肪の厚さにおいては、NcD群と比較しHcD群では脂肪厚の増加がみられた（Table 12）。血圧は収縮期および拡張期ともに、NcD群とHcD群で同程度であった。

2. 血液学的検査および血液生化学的検査（資料未掲載）

マイクロミニピッグの基準値[31、32]を参考に、NcDまたはHcDを8週間摂取させた後、血液学的検査において、白血球減少、白血球増加、および貧血を示した動物はいなかった。血液生化学的検査において、AST、ALT、ALP、LDH、 γ -GTP、総ビリルビン濃度、および血糖値において各群で差はみられなかった。

3. 血清中脂質代謝パラメータ

血清中脂質代謝パラメータの結果をFig. 5に示した。NcD群と比較して、HcD群では血清中の各脂質代謝パラメータの高値がみられた。HcD群において、HcD中のコレステロールの摂取量に依

存し、血清中総コレステロール濃度が増加し、2週目でピークを示したが、その後は停滞した。HcD群では、血中LDLコレステロール濃度およびHDLコレステロール濃度の増加がみられたが、プロファイルではLDLコレステロール比率は増加し、HDLコレステロール比率は減少した。一方で、血清中トリグリセリド濃度は全群において全ての検査ポイントで同程度であった。

4. 肝臓および小腸での遺伝子発現

qRT-PCRで確認した肝臓の*LDLr*、*HMGCR*、*SREBP-2*の遺伝子発現結果をFig. 6に示した。NcD群と比較し、HcD群では肝臓の*LDLr*、*HMGCR*遺伝子のダウンレギュレーションがみられ、HcD中のコレステロール濃度が高い程、遺伝子発現が低下した（Fig. 6AおよびB）。餌の種類（NcDやHcD）に依存せず、肝臓の*LDLr*、*HMGCR*遺伝子の発現レベルは、肝臓の*SREBP-2*遺伝子の発現レベルと高い相関を示した（Fig. 6CおよびD）。

qRT-PCRで確認した肝臓の*SRBI*、*NPC1L1*の遺伝子発現、肝臓および小腸の*APOBEC-1*の遺伝子発現結果をFig. 7に示した。肝臓における*SRBI*の発現レベルは、HcD摂取により変化はなかった（Fig. 7A）。肝臓の*NPC1L1*の発現は、HcDを摂取した動物で著しく低下した（Fig. 7B）。*APOBEC-1*の遺伝子発現は空腸および回腸だけで検出され、肝臓では検出されなかった（Fig. 7C）。

5. カイロミクロン分画と超低比重リポ蛋白コレステロール分画

における血清中 ApoB プロファイル

ApoA1 (AKPALEDLR) と ApoB48/100 (GFEP TLEALFGK 、 YENYELTLK) の MRM クロマトグラムにおいて、ヒトとブタの VLDL 分画と CM 分画の両方で apoA1 と apoB48/100 ペプチドが検出できた (Fig. 8)。

6. HL および CETP 活性

HL 活性は、NcD を摂取した動物では、HL 活性放出の作用を持つヘパリンの投与前の分画に対して、ヘパリン投与後の分画の分画ではるかに高く、ヘパリンナトリウム投与後の循環において 90% 以上の活性を示した (Table 13)。

CETP については、Fig. 9 に結果を示した。マイクロミニピッグとウサギの両方から得られた HDL 分画中に類似した分子サイズのバンドを可視化でき、ヒト CETP に対する抗体を用いた Western ブロッキングにより、NcD を摂取したマイクロミニピッグの血清中の HDL 分画に活性が検出された。なお、CETP 活性測定法の信頼性の確認のため、CE 転移活性を調べたところ、マイクロミニピッグの CE 転移活性は CETP 欠損症のヒトよりも高値であり、ウサギよりも低値であり、マイクロミニピッグ CETP の発現が考えられた。

7. 病理解剖 (剖検)

剖検時の肉眼所見において、HcD を摂取した動物では、心臓 (右冠状動脈) の白色線条、大動脈の白色線条がみられた。他臓器には異常はみられなかった。

8. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析

Oil-red-O 赤染領域がアテローム性動脈硬化病変に相当する (Fig. 10)。 *En face* 解析において、HcD を摂取した動物で、HcD 中コレステロール含量の増加に伴い、赤染面積が増加した (Fig. 11)。

9. 病理組織学的検査

病理組織学的検査は、INHAND・Minipig の毒性病理用語に基づいて実施した [11]。動脈硬化病変は、HcD 摂取により発現し、HcD 中のコレステロール含量が増加するにつれて、動脈全体を侵すように進行した。動脈硬化病変は主に内膜における泡沫細胞の浸潤を主体とするアテローム性プラークであり、その表面を覆う線維性被膜 (fibrous cap) の形成もみられた。また、内弾性板の二重化や断裂も認められた (Fig. 11A~D)。腹部大動脈は進行した病変が多くみられ、近位部が顕著であった。頸動脈、冠状動脈、外・内腸骨動脈の動脈硬化病変は腹部大動脈と同質であった (Fig. 11E~F)。コレステロール濃度 0.5% および 1.5% の HcD を摂取した動物では、肝臓に軽度の脂肪変性が検出された。その他、心臓、肺、脾臓、腎臓では、組織学的に顕著な変化は観察されなかった。アテローム性病変が存在したものの、HcD 摂取群の動物で血栓症、心筋梗塞、脳梗塞の自然発症は認められなかった。

10. 免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色において、浸潤泡沫細胞はリゾチーム陽性であった (Fig. 11G)。Fibrous cap 領域では、 α -SMA 陽性細胞 (平滑筋細胞) が少数みられた (Fig. 11H)。

考察

本章では、超小型マイクロミニピッグ動脈硬化モデルの構築を試み、8週間のHcD摂取により、高コレステロール血症、中程度の内臓脂肪および皮下脂肪を伴う体重増加（メタボリックシンドローム）、そしてヒト型アテローム性動脈硬化症の誘発に成功した。1.5%のコレステロールを含むHcDの8週間摂取により、血清中総コレステロール濃度は約600 mg/dLに達し、大動脈の約50%のアテローム性動脈硬化領域が認められた。比較的低い0.2%のコレステロールを含むHcDは、7.5%のアテローム性動脈硬化領域がみとめられ、血清中総コレステロール濃度は約200 mg/dLであった。アテローム性動脈硬化症を誘発するためにマウスにしばしば投与されるコール酸ナトリウムの投与[46]は、マイクロミニピッグには必要なかった。他のミニブタではアテローム性動脈硬化症の発症に3ヶ月以上を要している[18~22]ことに対し、本章で研究したマイクロミニピッグではわずか8週間の短期間で十分であったことは、注目すべき良好な結果であった[45]。

血清中LDLコレステロール濃度およびHDLコレステロール濃度はともにHcD摂取後に明らかな増加がみられ、特にLDLコレステロール濃度でより顕著な増加がみられた。HcD摂取後にHDLコレステロール比率は有意に減少し、動脈硬化を促進する脂質プロフィールを示した。食餌性脂肪によるこの逆説なHDLコレステロール濃度の変動は、ヒトとウサギで報告されている[47、48]。また、ヒト代謝研究により、HcDの摂取が異化率を低下させる一方で、apoA-Iの輸送率を増加させ、その結果HDLコレステロール濃度が上昇することが示されている[49]。同様の事象がヒト

apoA-Iトランスジェニックマウスでもなされており、HcDの摂取はHDLコレステロール濃度を上昇させ、代謝研究においては、HDL-コレステリルエステルとapoA-Iの異化率の低下と輸送率の増加が示されている[50]。HcDによりHDLコレステロール濃度が上昇したのは、HDL経路を介した逆コレステロール輸送を促進するための適応であると考えられるが、その正確なメカニズムは不明である。CETPの酵素活性がマイクロミニピッグのHDL分画に検出されたことは、この適応機序の存在の可能性を示すと考えられる。

マイクロミニピッグはヒトやウサギと同様に肝APOBEC-1を発現していなかった。従ってVLDLコレステロール分画にはapoB100のみが含まれ、apoB48は含まれなかった。対照的に、マウスは肝APOBEC-1を発現してapoB48を含むVLDLコレステロールを生成し、その後、血中LDLコレステロール濃度を低下させることが報告されている[51]。New Zealand白ウサギやWatanabe遺伝性高脂質血症ウサギの肝臓にAPOBEC-1遺伝子を導入すると、apoB48を含むVLDLコレステロールが産生され、血中LDLコレステロール濃度が低下することが報告されている[52]。ヒトの低βリポ蛋白血症では、VLDLコレステロールがLDLコレステロールに変換されず、これはapoB遺伝子の未成熟終止遺伝子が存在しないためにapoB50が切断されているためである[53]。従って、肝のapoB mRNA編集によるapoBサイズの調節は、アテローム性apoB100含有リポ蛋白の生成を制限する基本的なメカニズムである。肝APOBEC-1を発現しない哺乳類では、各動物の[VLDLコレステロール+LDLコレステロール]のHDLコレステロールに対

する比は、ヒト（1.92）、サル（0.91）、ブタ（1.4）であるが、ウサギ（0.32）は例外である [50]。本章の研究において、NcDを摂取したマイクロミニピッグの比率は1.31であり、この脂質プロファイルは動脈硬化を促進することを示していると考えられた。

ヒトと動物の脂質代謝に関する遺伝子発現の相違について、Table 14および15にまとめた。これらから、ヒトとマイクロミニピッグの脂質代謝に関する遺伝子発現が類似していることが明らかである。遺伝子発現について詳細を記載する。血中コレステロール濃度は、LDLrを介したLDLコレステロールの除去と、肝臓でのHMGCR活性を介したコレステロール合成によってほぼ決定される [54、55]。LDLrとHMGCRの肝発現は、SREBP-2シグナル伝達経路によって制御され、SREBP-2の転写活性は、細胞内コレステロールが不足すると通常阻害される事が報告されている [56～58]。本研究では、HcD摂取によりLDLrおよびHMGCRが顕著に低下し、それに相関してSREBP-2も低下を示した。マイクロミニピッグにおけるこれらの遺伝子とLDLコレステロールが豊富な脂質プロファイルの制御は、ヒトと非常に類似しており、ダウンレギュレーション遺伝子応答が最小であるマウスとは対照的である [56]。

腸管吸収と胆汁排泄は、コレステロールのホメオスタシスのさらに密接に制御されたメカニズムである [59、60]。腸管コレステロール吸収を制御するとして最近同定されたNPC1L1蛋白は、ヒト、ウサギ、マウスを含む様々な種の小腸で高発現している [61]。NPC1L1蛋白はヒト肝臓でも発現しており、胆汁性コレステロール排泄を部分的に制御しているが、マウス肝臓では発現し

ていない [59]。本章の研究では、*NPC1L1* 遺伝子はマイクロミニピッグの小腸と肝臓の両方で発現していることが確認でき、これらの結果から、*NPC1L1* 発現の制御遺伝子機構には *SREBP-2* 経路が含まれており、高レベルのコレステロールが *LDLr*、*HMGCR*、*NPC1L1* などの *SREBP-2* 制御遺伝子を抑制していることが示唆された [62、63]。マイクロミニピッグにおいて肝臓と腸の両方で *NPC1L1* の発現が検出されたことから、コレステロール恒常性に関連する遺伝子発現プロファイルは、ヒトに類似していると考えられる。

CETP は HDL から apoB 含有リポ蛋白への CE の移行を触媒し、逆コレステロール輸送の重要な蛋白と考えられている [64、65]。動脈硬化が発症しやすい動物（ヒト、ウサギおよびニワトリ等）においては、動脈硬化が発症しにくい動物（ネコ、イヌ、ラットおよびマウス等）よりも CETP 活性が高いことが報告されている [66]。元々 CETP が欠損しているマウスに CETP を遺伝的に導入すると、動脈硬化発症が食餌によって促進されることも報告されている [67、68]。さらに、CETP と apoB100 の二重トランスジェニックマウスもまた、アテローム性動脈硬化症の発症頻度が増えることが報告されている [69]。一方で、apoC-III またはレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼのトランスジェニックマウスは高脂質血症から動脈硬化を発症するが、脂質受渡しに作用する CETP を過剰発現させると動脈硬化を抑制することが報告されている [70、71]。CETP 活性が低いマウスのリポ蛋白代謝は、CETP 活性が高いヒトでみられる代謝とは著しく異なるため、CETP が動脈硬化に及ぼす影響の評価には限界があると考えられ、CETP 活性

とアテローム性動脈硬化症の発症との関係はマウスでの実験では解明が難しい。また、ヒトのアテローム性動脈硬化症についても、現時点では議論の余地がある。冠状動脈性心疾患患者では、大粒子HDLが多く、小粒子高密度LDLが少ないことが報告されている [72~74]。一方、CETP阻害剤は、大粒子HDLを有意に増加させ、小粒子高密度LDLを減少させるため、アテローム性硬化性心血管病の発症を抑制するのに有効であると考えられている [75]。ヒトでは、CETP活性が欠損すると血漿HDLコレステロール濃度が上昇し、CEが豊富な大粒子HDLが生成されることから、CETP活性とアテローム性動脈硬化症の発症に関連があるとする考えは正しいと支持されている [76]。さらに、CETP活性の低下によって特徴づけられるCETP多型または遺伝的変異の症例は、HDLコレステロールの増加、冠状動脈性心疾患の発症率低下、および長寿と関連している [77,78]。しかしながら、他の研究では、CETP欠損ヒト被験者におけるアテローム性動脈硬化性心血管および脳血管疾患の発症率の増加が報告されている [79~81]。さらに、最近の臨床研究では、急性冠症候群の既往のある患者にCETP阻害剤（ダルセトラピブ）を投与しても、HDLコレステロール値は上昇するものの、心血管イベントの再発リスクは減少しなかったことが報告されている [82]。これらの事から、CETP阻害薬が心血管系疾患の予防に有効であるかどうかは、まだ議論の余地がある。ブタはアテローム性動脈硬化症を発症しやすいが、CETP活性を発現しない、あるいは非常に低いレベルである [66]。本章の研究では、ヒトおよびウサギのCETP cDNA配列からデザインしたプライマーを用いたRT-PCR法を用いたが、マイクロミニピッグで

はCETP遺伝子の発現は検出されなかった。しかしながら、マイクロミニピッグはCETP様蛋白とCE転移活性の発現が確認できた。類似のCETP遺伝子の存在についてはまだ議論の余地があるが、マイクロミニピッグはCETP活性とアテローム形成との関係性を評価するのに有用なモデルであると推測される。

HLはHDL中のトリアシルグリセリドの加水分解を触媒するリパーゼの一種であり、HDL2をHDL3に変換し、IDL（中間密度リポタンパク質）コレステロールをLDLコレステロールに変換する。本章の研究では、マイクロミニピッグのHL活性は、ヒトやウサギと同様に、ヘパリン後の血漿中に多く検出された。このことは、ほとんどのHL活性が肝類洞内皮細胞の表面に局在していることを示唆している。対照的に、マウスでは活性のほとんどが循環系で検出されている事が報告されている [83]。HLおよびapoEの二重欠損マウスは、apoE欠損マウスよりもアテローム性動脈硬化の程度が低いことから、マウスHLのアテローム性動脈硬化促進作用が示されている [84]。肝類洞内皮細胞表面に結合できるヒトHLをトランスジェニックで過剰発現させた*LDLr*およびマウス内因性HL欠損マウスでは、VLDL、IDLおよびLDLコレステロールのレベルが低下し、その後動脈硬化が抑制されることが報告されている [85]。さらにヒトHLを過剰発現させると、ウサギのHDLおよびIDLコレステロールが減少する [86]。これらから、HLの機能は、主に局在する場所（肝臓または循環）によって影響を受けると推測される。

本章の研究において、ヒトと非常に類似したコレステロール代謝を持つ世界最小のマイクロミニピッグを用いて、高コレステロ

ール血症誘発性ヒト型アテローム性動脈硬化症の新しい病態モデルを確立した。この病態モデルは8週間の短期間、HcDを摂取させるだけで構築できた。さらにメタボリックシンドロームの研究に適した動物モデルの可能性も示唆された。

表および付図

Table 8. 群構成および給餌の詳細

| 群 | 飼料名 | 脂肪 (w/w%) | コレステロール (w/w%) | 動物数 (匹) |
|-------------|-----------------------------|--------------|-------------------|------------|
| NcD | 普通食 (NcD) ^{a)} | 0 | 0 | 7 |
| 0.2%Cho-HcD | 高脂肪食 (HcD) ^{b)} | 12 | 0.2 | 5 |
| 0.5%Cho-HcD | | 12 | 0.5 | 5 |
| 1.2%Cho-HcD | | 12 | 1.5 | 5 |

a) 普通食（マッシュ状ブタ用飼料であることから 73）を 8 週間給餌した。

b) 普通食に 12 w/w%脂肪および 0.2、0.5、1.5%コレステロールを混合した高脂肪食を 8 週間給餌した。

Table 9. 血液学的検査の測定項目および方法の詳細

| 検査項目 | 単位 | 測定方法 | 機種 |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 赤血球 (RBC) | $10^6/\text{mm}^3$ | 2角度レーザーフローサイトメトリー法 | ADVIA120 ^{a)} |
| 白血球 (WBC) | $10^3/\text{mm}^3$ | 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 (Ht) | % | 計算式：(平均赤血球容積×赤血球) / 10 | |
| ヘモグロビン (HGB) | g/dL | シアンメトヘモグロビン変法 | |
| 血小板 (PLT) | $10^3/\text{mm}^3$ | 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 (MCV) | 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 (MCH) | 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 (MCHC) | g/dL | 計算式：[ヘモグロビン / (赤血球×平均赤血球容積)] × 1000 | |

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

Table 10.

| 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 (AST) | IU/L | JSCC 標準化対応 | JCA- BM8 ^{a)} |
| アラニンアミノトラン スフェラーゼ (ALT) | IU/L | | |
| アルカリホスファター ゼ (ALP) | IU/L | | |
| 乳酸脱水素酵素 (LDH) | IU/L | | |
| γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ (γ-GT) | IU/L | | |
| クレアチンキナーゼ (CK) | IU/L | | |
| アミラーゼ (Amy) | IU/L | BG5P 基質法 | |
| 総ビリルビン (T-Bil) | mg/dL | バナジン酸酸化法 | |
| 直接ビリルビン (D-Bil) | mg/dL | | |
| 総蛋白 (TP) | g/dL | ビウレット法 | |
| アルブミン (Alb) | g/dL | BCG 法 | |
| グロブリン (Glb) | g/dL | 計算式 : TP-Alb | - |
| A/G 比 | - | 計算式 : Alb / Glb | |
| 総コレステロール (TP) | mg/dL | COD・HDAOS 法 | JCA- BM8 ^{a)} |
| 遊離コレステロール (F-cho) | mg/dL | コレステロールオキ シダーゼ・DAOS 法 | |
| トリグリセリド (TG) | mg/dL | GPO・HDAOS 法、グ リセリン消去法 | |
| ブドウ糖 (GLU) | mg/dL | ヘキソキナーゼ G- 6-PDH 法 | |

Table 10. 血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細

(続き)

| 検査項目 | 単位 | 測定方法 | 機種 |
|-------------------------|-------------|------------------|--------------------------|
| 尿素窒素 (UN) | mg/dL | ウレアーゼ・G1DH 法 | JCA-BM8 ^{a)} |
| クレアチニン (Cre) | mg/dL | クレアチナーゼ・F-DAOS 法 | |
| 無機リン (IP) | mg/dL | PNP・XDH 法 | |
| カルシウム (Ca) | mg/dL | MXB 法 | |
| ナトリウム (Na) | mEq/L | 電極法 | |
| カリウム (K) | mEq/L | 電極法 | |
| 塩素 (Cl) | mEq/L | 電極法 | |
| コレステロール分画 ^{b)} | %、 mg/dL | 電気泳動法 | エパラ イザ ^{2c)} |

a) 自動分析装置 (日本電子株式会社、東京、日本)

b) 検査項目: 高比重リポ蛋白 (HDL)、低比重リポ蛋白 (LDL)、超低比重リポ蛋白 (VLDL)、カイロミクロン (CM)

c) 全自動電気泳動分析装置 (株式会社ヘレナ研究所、埼玉、日本)

Table 11. 遺伝子と PCR 測定に使用したプライマーの詳細

| Gene | Assay ID | Custom made primers | RefSeq | GenBank |
|----------|---------------|--|----------------|------------|
| LDLr | Ss03374441_u1 | | NM_001206354.1 | AF065990.1 |
| SR-BI | Ss03391104_m1 | | NM_213967.1 | AF467889.2 |
| HMGCR | Ss03390147_m1 | | NM_001122988.1 | DQ432054.1 |
| SREBP-2 | Ss03376492_u1 | | | AY493571.1 |
| APOBEC-1 | | Forward: CCATGGTGTGACCATCCAGAT Reverse: AGTTGACAAAATTCCTCCAGCAGTA Probe: TGGGAGCCCCAGAGTA | XM_003126519.1 | |
| NPC1L1 | | Forward: CCTGTTTCGGAGCGAGTCTCTA Reverse: GAAAGAGGAAATAGTCGAGCAGGTA Probe: CTGCCCAAGGACTC | XM_003134893.1 | |
| GAPDH | Ss03375435_u1 | | NM_001206359.1 | AY307771.1 |

- ・ Assay ID は、事前に設計された遺伝子発現アッセイ（ABI）に基づいている。
- ・ APOBEC-1 および NPC1L1 解析用のプライマーとプローブは、ブタの配列に基づいて作成した。

Fig. 3. 5ヵ月齢の雄（体重 7 kg）の NcD を摂取したマイクロミニピッグの外観

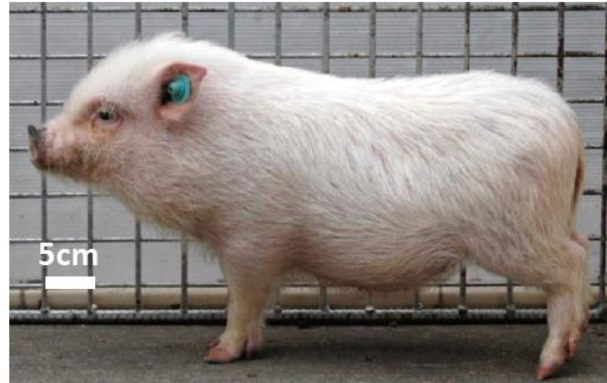


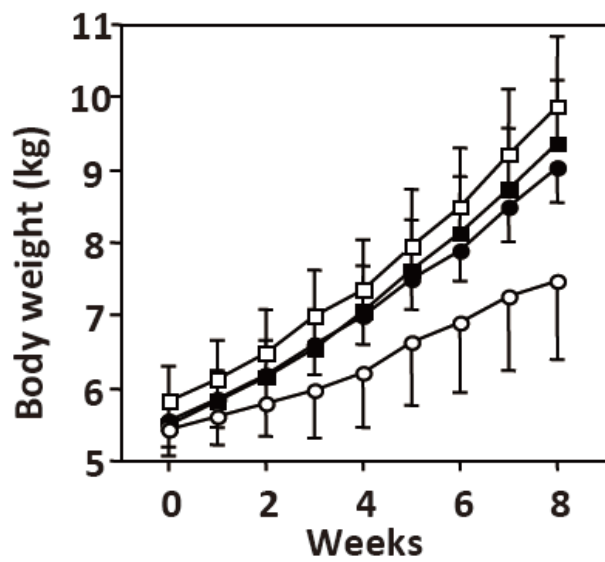
Table 12. 内臓脂肪の重量および皮下脂肪の厚さの増加率

| % cho in diet | 0 | 0.2 | 0.5 | 1.5 |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Relative weight (g/kg) | | | | |
| Omentum | 0.80 ± 0.25 | 1.78 ± 0.30 | 1.96 ± 0.19* | 1.78 ± 0.36 |
| Mesenterium | 3.05 ± 0.47 | 4.30 ± 0.64 | 4.40 ± 0.35 | 4.22 ± 0.88 |
| % increase of BFT | 147.7 ± 38.8 | 214.0 ± 18.8 | 211.2 ± 26.4 | 234.8 ± 21.8* |

値は平均値±SE で示した。Cho:コレステロール、BFT:背脂肪厚

* $p < 0.05$ vs. Control.

Fig. 4. 体重



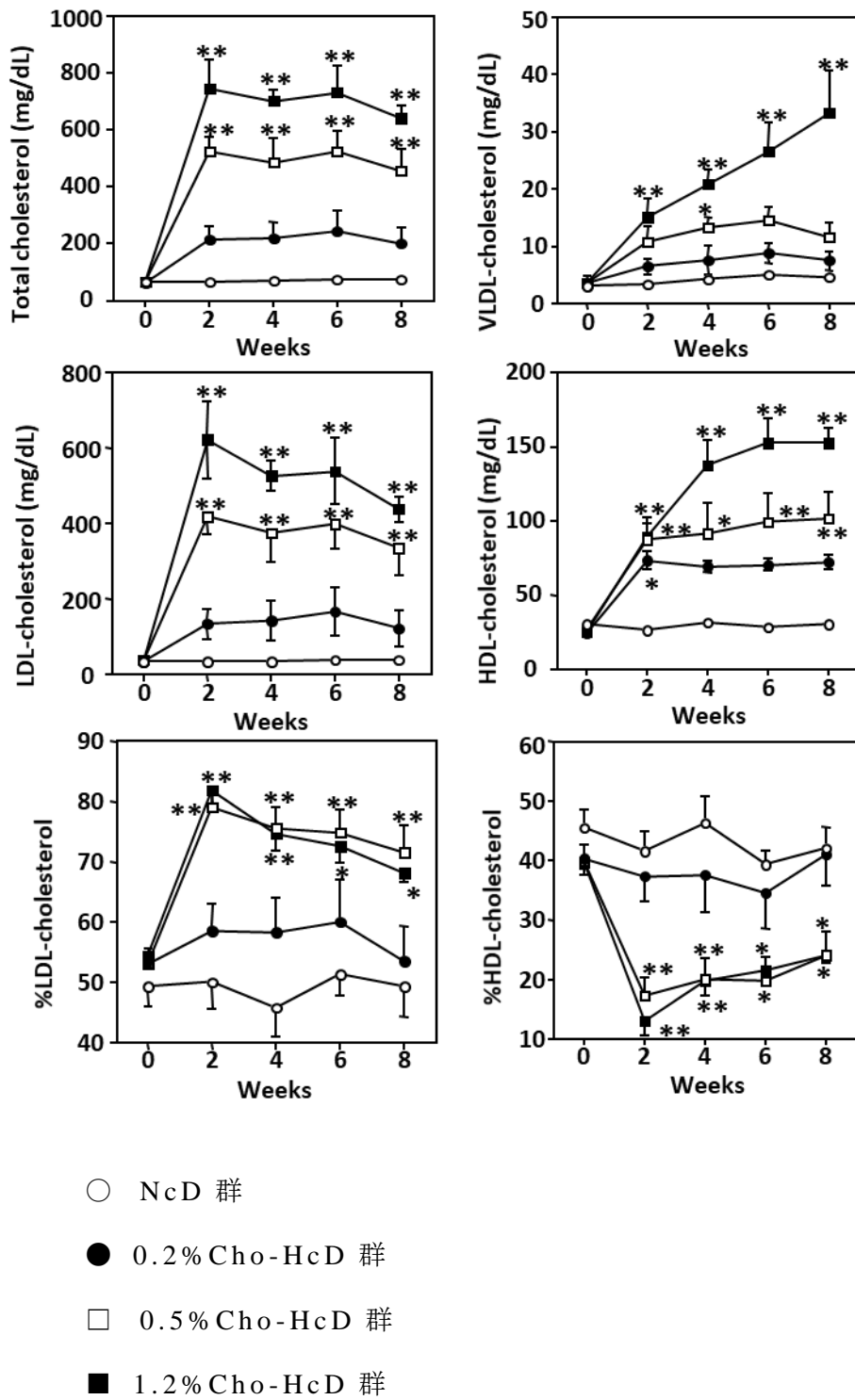
○ NcD 群

● 0.2% Cho-HcD 群

□ 0.5% Cho-HcD 群

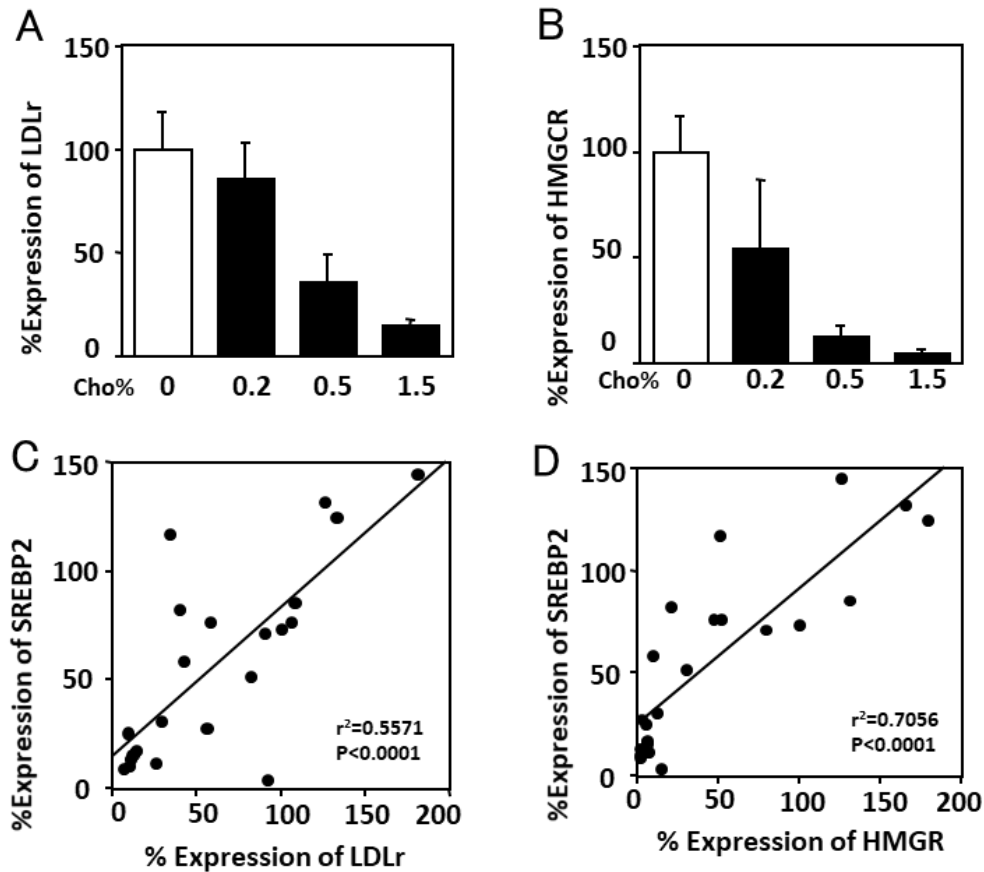
■ 1.2% Cho-HcD 群

Fig. 5. 血清中脂質代謝パラメータ



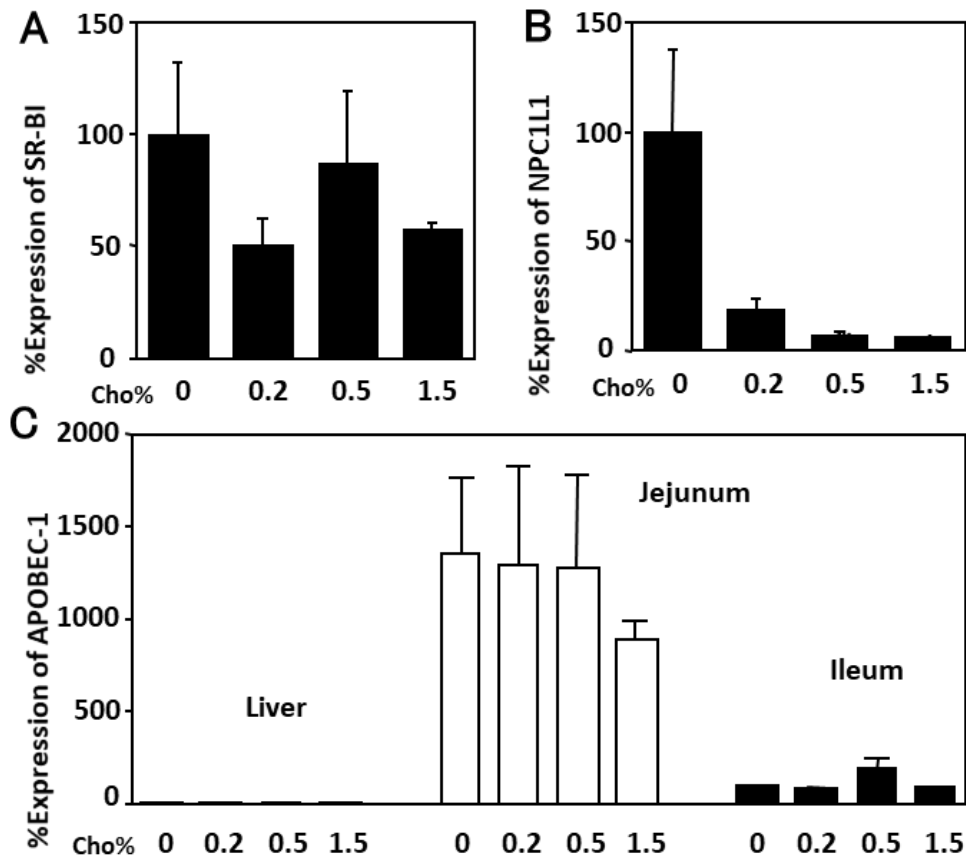
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

Fig. 6. qRT-PCR による肝臓の *LDLr*、*HMGCR*、*SREBP-2* の
遺伝子発現結果



LDLr、*HMG-CoA*還元酵素および *SREBP-2* の肝発現を、8週間の実験終了時にリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。(A) (B) の発現は、0.5%および 1.5% のコレステロールを含む HcD によって有意に減少した。(C) (D) *SREBP-2* 遺伝子の発現レベルは、*LDLr* および *HMGCR* の発現と高い相関があった。遺伝子発現レベルは、コントロールの NcD 投与群で観察されたレベルに対する発現のパーセントとして計算した。

Fig. 7. qRT-PCR による肝臓の SRBI、NPC1L1 の遺伝子発現、
肝臓、空腸および回腸の APOBEC-1 の遺伝子発現結果



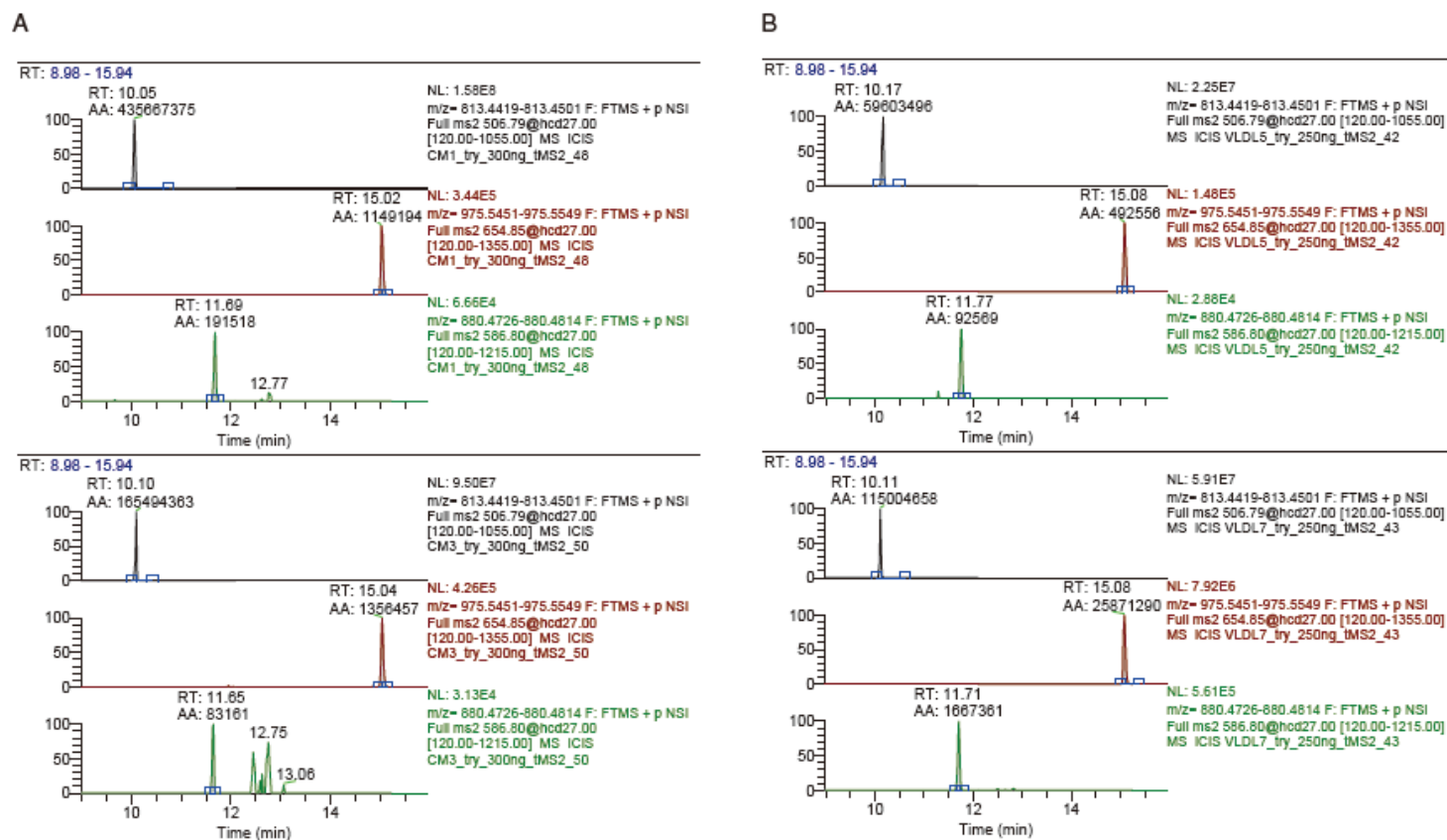
(A) HcD 食群における SR-BI の肝発現は、NcD 食対照で観察されたものと同様であった。

(B) 肝 NPC1L1 発現は HcD 摂食によって著しく減少した。

(C) APOBEC-1 の発現は空腸と回腸で検出されたが、肝臓では検出されなかった。

遺伝子発現レベルは、対照 NcD 摂食群で観察されたレベルに対する発現パーセントとして計算した。

Fig. 8. ApoA1 (AKPALEDLR) と ApoB48/100 (GFPTLEALFGK、YENYELTLK) の MRM クロマトグラムにおけるヒトとブタの VLDL 分画と CM 分画

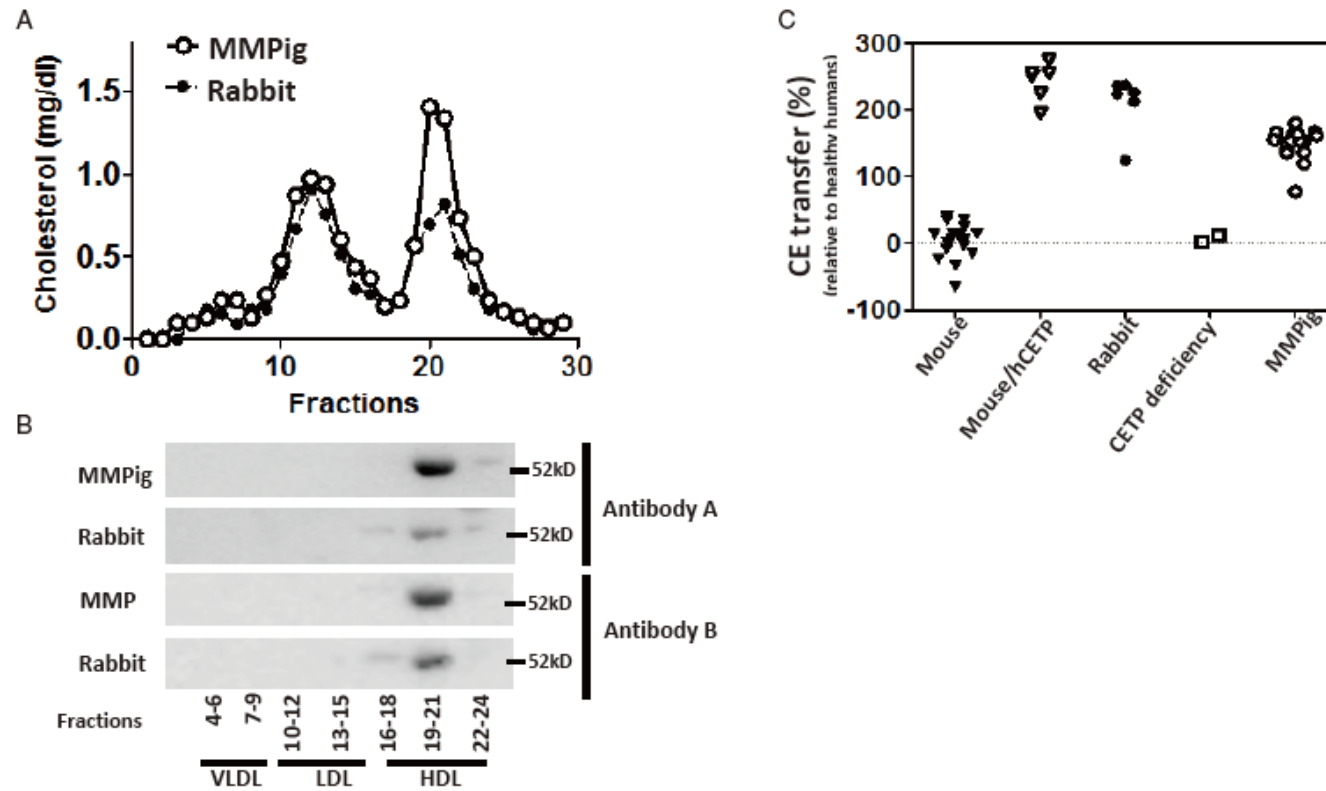


A: ヒト B: マイクロミニピッグ

Table.13. NcD 摂取マイクロミニピッグの血漿 HL 活性

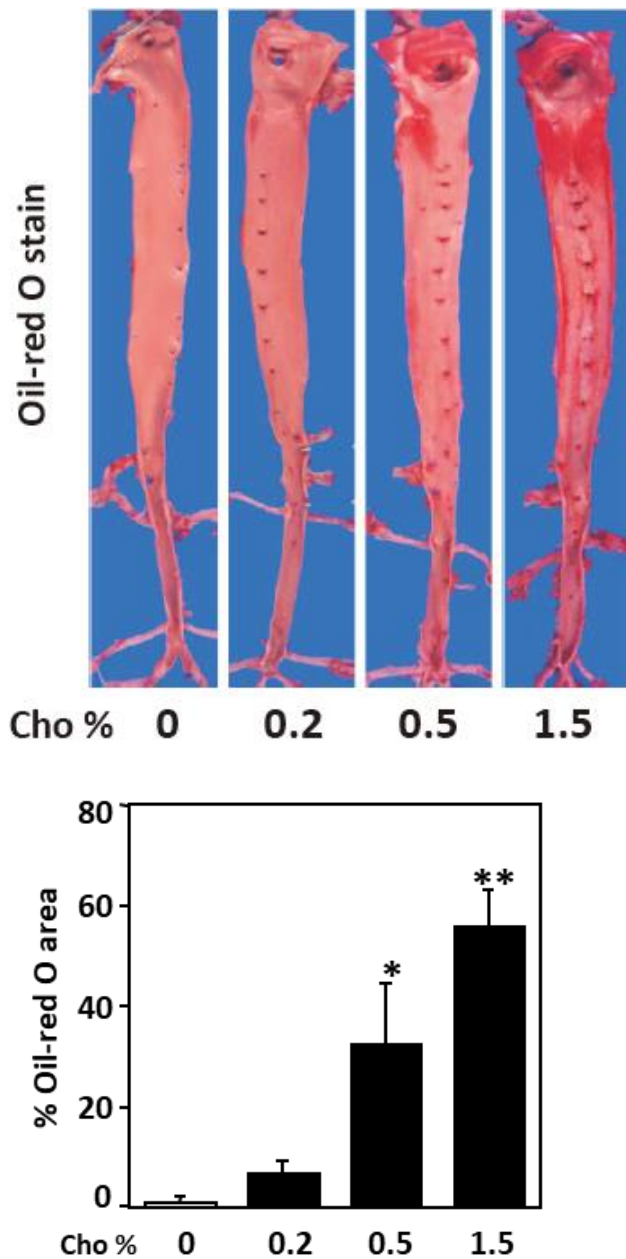
| age (month) | 25 | | | | | 5 | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|-------------|------|------|------|-------------|
| animal No. | 1 | 2 | 3 | 4 | mean ± SE | 5 | 6 | 7 | mean ± SE |
| B.W. (kg) | 24.0 | 24.0 | 28.0 | 25.0 | 25.3 ± 1.6 | 5.7 | 5.8 | 5.7 | 5.73 ± 0.05 |
| HL activity (pmol/ml/min) | | | | | | | | | |
| pre-heparin | 0.07 | 0.24 | 0.08 | 0.09 | 0.12 ± 0.07 | 0.11 | 0.15 | 0.14 | 0.13 ± 0.02 |
| post-heparin | 2.47 | 2.37 | 2.66 | 3.42 | 2.73 ± 0.41 | 2.89 | 1.98 | 2.93 | 2.60 ± 0.44 |
| liver-bound | 2.40 | 2.13 | 2.58 | 3.33 | 2.61 ± 0.46 | 2.78 | 1.83 | 2.79 | 2.47 ± 0.45 |
| % in liver | 97.2 | 89.9 | 97.0 | 97.4 | 95.4 ± 2.8 | 96.2 | 92.4 | 95.2 | 94.6 ± 1.6 |

Fig. 9. マイクロミニピッグの CETP 活性



(A) Microminipig とウサギのリポ蛋白画分中のコレステロールレベル (B) ウェストアーンブロット分析 (C) C57BL/6 マウス、Ad-hCETP を注射した C57BL/6 マウス、ウサギ)、CETP 欠損症患者、Microminipig から得た血清中のコレステリルエステル (CE) 転移活性

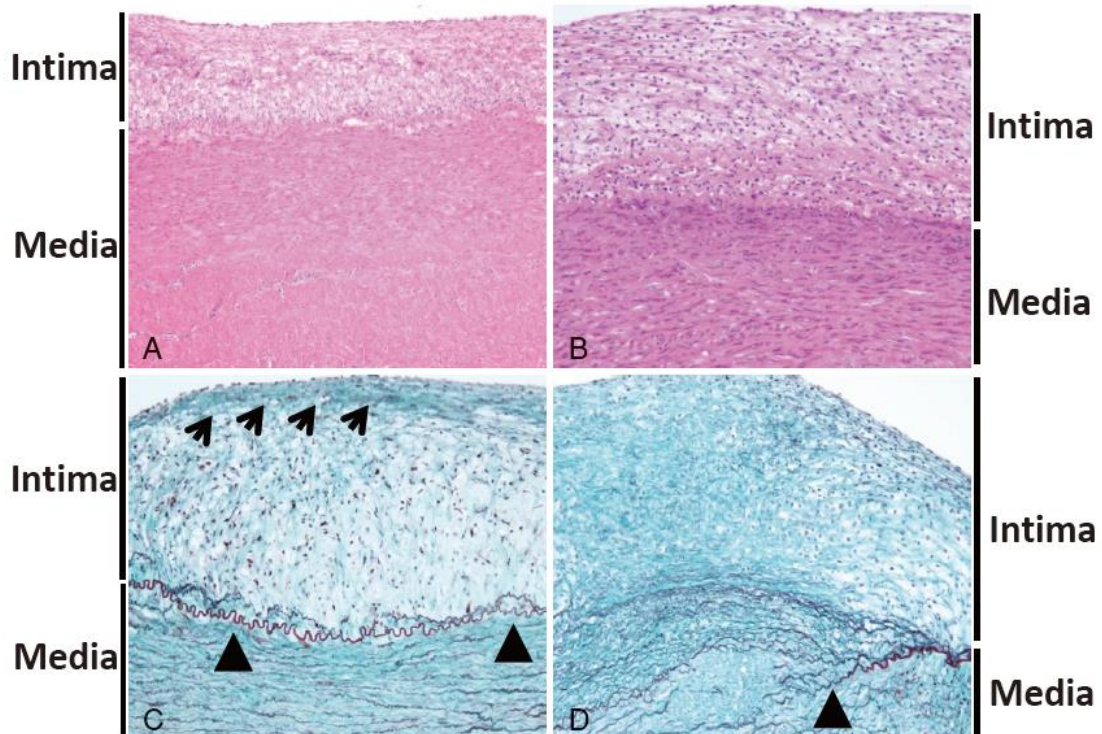
Fig. 10. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析



NcD 飼育および HcD 飼育マイクロミニピッグにおける 8 週間後のオイルレッド O 染色アテローム性動脈硬化病変。Oil-red-O 染色で染色されたアテローム性動脈硬化病変の数は HcD 飼育 Microminipig で増加した。値は平均値±SE で示した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

Fig. 11. 動脈硬化病変の病理組織検査



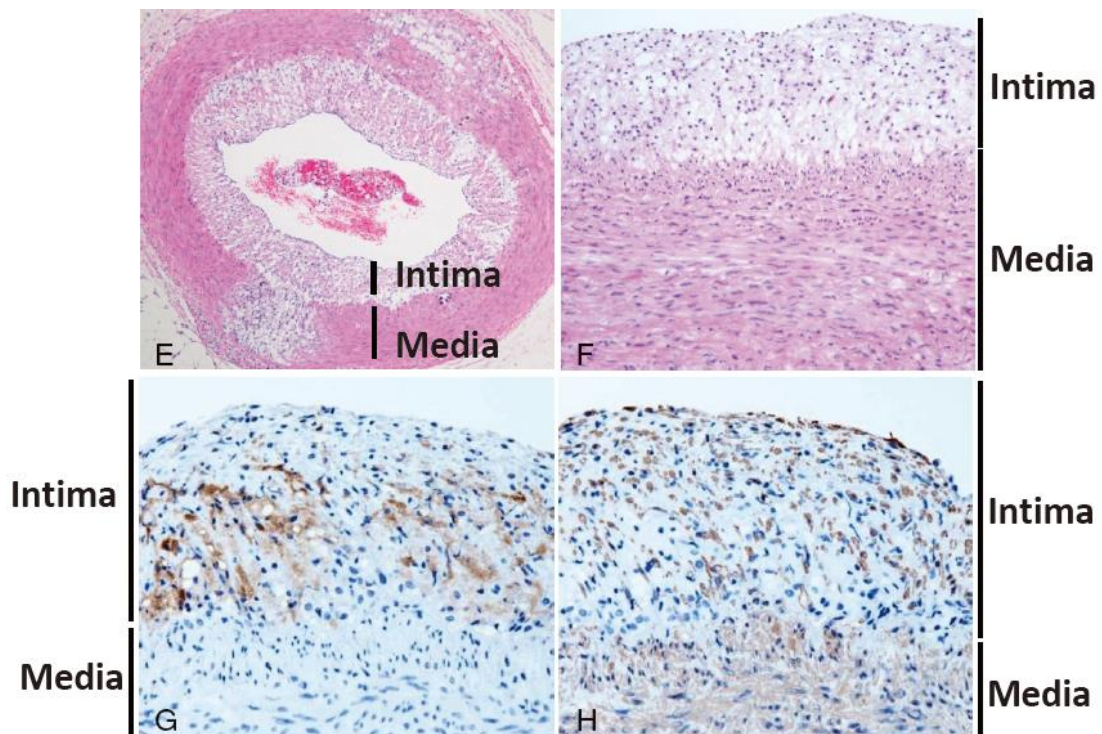
HcD を 8 週間摂取させた Microminipig の大動脈アテローム性動脈硬化病変

(A) (B) 泡沫細胞の浸潤を伴う腹部大動脈のアテローム性プラーク (HE 染色)

(C) 内弾性板の二重化 (矢頭)、プラークであり、表面を覆う線維性被膜 (fibrous cap) の形成もみられた (矢印; Elastica Masson 染色)。

(D) 進行した病変では、内弾性板の断裂と新しく形成された内弾性板がみられた (矢頭; Elastica Masson 染色)。

Fig. 11. 動脈硬化病変の病理組織検査（続き）



(E) HcD を 8 週間摂取させたマイクロミニピッグの冠動脈におけるアテローム性動脈硬化病変

(F) 左主幹部におけるアテローム性動脈硬化病変の低倍率および高倍率での顕微鏡写真（HE 染色）

(G) プラーク病変はマクロファージマーカーである RC3 陽性の泡沫細胞の集積であった。

(H) 少数の内皮細胞が α -SMA 陽性であった。

Table.14. マウス、ヒト、ウサギおよびマイクロミニピッグにおけるリポ蛋白質代謝の比較

| | mice | rabbits | humans | MMPigs |
|------------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Lipoprotein | HDL-rich | LDL-rich | LDL-rich | LDL-rich |
| CETP | no | yes | yes | yes |
| HL | 70% in circulation | liver-bound | liver-bound | liver-bound |
| Hepatic apoB editing | yes | no | no | no |
| Hepatic LDLr | high | down-regulated | down-regulated | down-regulated |
| Hepatic NPC1L1 | no | yes | yes | yes |
| Diet-induced atherosclerosis | resistant | sensitive | sensitive | sensitive |

CETP : コレステリルエステル転移蛋白、HL : 肝リパーゼ、LDLr : LDL 受容体、

NPC1L1 : Niemann-Pick C1 様 1 蛋白

Table.15. ヒトと各動物の脂質代謝に関する遺伝子発現の相違

| | マウス | ウサギ | ヒト | マイクロミニピッグ |
|-------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Lipoprotein | HDL-rich | LDL-rich | LDL-rich | LDL-rich |
| CETP | No | Yes | Yes | Yes |
| Hepatic apoB editing | Yes | No | No | No |
| Hepatic LDL-R | High | Down-regulated | Down-regulated | Down-regulated |
| Hepatic lipase | 70% in circulation | Liver-bound | Liver-bound | Liver-bound |
| Hepatic NPC1L1 | No | Yes | Yes | Yes |
| apoB48の局在 | CM, VLDL | CM | CM | CM |
| Small intestinal NPC1L1 | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Dietary cholesteros | Resistant | Sensitive | Sensitive | Sensitive |

本表は参考文献[42]を元に作成した。

第Ⅲ章 マイクロミニピッグ動脈硬化モデルを用いた

HMGCR 阻害剤の効能評価

緒言

心血管疾患の主要な危険因子である高コレステロール血症や動脈硬化症の治療薬として、一般的にスタチン（ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素 [HMGCR] 阻害薬）が使用されている。コレステロール合成はアセチル CoA を出発基質として、約 30 段階の酵素反応を介するが、その中でスタチンは、メバロン酸経路の律速酵素を介して HMGCR を阻害し（参考図として Fig. 12）、ヒトにおいて血中コレステロールの上昇を抑制することが報告されている [29]。スタチンとして、アトルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチン、およびロスバスタチン等がヒトの治療薬として開発されており、これらのスタチンは一般に同様の作用を有することが報告されている [87~89]。スタチンは、ヒトと同様にウサギにおいて血中コレステロールの上昇を抑制することが報告されている [30]。しかしながら、前述した通り、マウスやウサギは脂質代謝やいくつかの環境因子がヒトとは異なっており、ブタは摂食習慣、脂質代謝、日内変動がヒトと類似している [3~7] ため、ウサギやマウスよりもブタの方が動脈硬化の病態モデルとして適しているが、ブタを用いたスタチンの研究は少ない [90~93]。また、ミニブタよりも小型で扱いやすいマイクロミニピッグにおいては、スタチン研究に関連する報告はない。

本論文の第 II 章の高コレステロール血症誘発性ヒト型アテローム性動脈硬化モデルが、治療薬の薬効試験に応用できることを

確認する目的で、本章では本病態モデルを用いた HMGCR 阻害剤・スタチンの効能評価を行った。特に、HMGCR 阻害剤の影響を評価できる病態モデルを構築するために、最適な食餌中のコレステロール投与量と実験期間を検討した。

材料方法

1. 使用動物および動物の飼育環境

3～4ヶ月齢の雄マイクロミニピッグ（Fuji Micra Inc、静岡、日本）を18匹（平均体重は 8.3 ± 0.7 kg）を使用した。全ての動物は同じ飼育施設で、同じ飼育環境で飼育した。温度 $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、明暗サイクル12時間、飼育スペースは1頭あたり $0.5 \sim 1.2$ m²の環境で飼育した。

2. 群構成および給餌

6匹の動物を普通食群に割り付け、NcD（マッシュ状ブタ用飼料であることから73、日清丸紅飼料株式会社、東京、日本）を給餌した。6匹の動物は高脂肪食（High fat and low cholesterol diet、以下HFLCD）群に割り付け、高脂肪（12% w/w、精製ラード；三好油脂株式会社、東京、日本）および低コレステロール（0.1% w/w、和光純薬工業株式会社、大阪、日本）食を給餌した。6匹の動物は高脂肪食+スタチン（HFLCD+Statin）群に割り付け、高脂肪（12% w/w、精製ラード；三好油脂株式会社、東京、日本）および低コレステロール（0.1% w/w、和光純薬工業株式会社、大阪、日本）食にスタチン（アトルバスタチン、ファイザー社、USA）を添加し、給餌した。スタチンの添加量は、ヒトおよび豚に関する過去の報告[90、94]に基づき、1日あたり3 mg/kg BWとした。NcD、HFLCDおよびHFLCD+Statinは、12週間給餌した。群構成および給餌の詳細はTable 16に示した。

3. 一般状態、体重

一般状態観察は生死の確認と合わせて、動物の状態を毎日確認した。動物の体重は毎週1回、電子天秤（HP-40K、HP-60KおよびGP-60K、株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本）を使用して測定した。12週終了時の体重値を用いて、実験開始前の体重からの増加率（%）を算出した。

4. 血液学的検査および血液生化学的検査

採血は2週に1回、無麻酔下で前大静脈洞から採血した。血液学的検査は、約1 mLを採血し抗凝固剤としてEDTA-2Kを用いた全血を使用して測定した。血液学的検査の測定項目および方法の詳細はTable 17に示した。血液生化学的検査は、約1.0 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）して得られた血清を用いて測定した。血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細はTable 18に示した。

5. 病理解剖（剖検）

12週終了時に、各動物にメデトミジン水溶液（ドミトール：Orion Corporation、Finland、1 mg/mL、0.04 mL/kg）、塩酸ケタミン水溶液（Kamud Drugs Pvt. Ltd.、India、50 mg/mL、0.1 mL/kg）および、ミダゾラム（丸石製薬株式会社、大阪、日本、5 mg/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、東京、日本）水溶液（64.8 mg/mL、0.5 mL/kg）の静脈内投与により麻酔を行い、放血安楽死させ、外表、内部器官および組織を肉眼的に観察した。器官重量について

は、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および内臓脂肪組織（大網および腸間膜脂肪）の重量を電子天秤（HR-200、FX-3000N および GF-3000、株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本）を用いて測定した。さらに剖検時の体重から体重比相対重量を算出した。

6. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析

大動脈は、動脈硬化病変を確認するために、ホルマリン固定後に Oil-red O 染色液を用いて、大動脈の動脈硬化病変を染色した。動脈硬化病変について、*En face* 解析を行った。表面全体に対する Oil-red O 染色面積は、Image J ソフトウェア（National Institutes of Health、USA）を用いて算出した。その後、切り出し、パラフィン包埋後、下記の病理組織学的検査に供した。

7. 病理組織学的検査

各動物から採取した全身の動脈（ウィリス動脈輪、脳底動脈、頸動脈、胸部・腹部大動脈、外・内腸骨動脈、冠状動脈等）、心臓、肝臓、腎臓、脾臓および小腸を中心に、その他の全身の臓器（気管、肺、舌、顎下腺、食道、胃、大腸、胆嚢、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、脳、脊髄、坐骨神経、胸骨、大腿骨、顎下リンパ節、膵臓、胸腺、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、眼球、視神経、涙腺、大腿四頭筋、腹部皮膚）も含め、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、常法により薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色後、病理組織学的検査を実施した。

8. 病理組織学的形態計測

ホルマリン固定後に腹部大動脈は3-4 mm間隔で水平に切断し、18~24片をパラフィンに包埋し、5 μmで病理組織切片を作成し、HE染色した。Image Jソフトウェア（組織形態分析、National Institutes of Health、USA）を用いて、内膜と血管壁の面積を測定し、[内膜面積] / [血管面積] の比（%）を算出した。

9. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）による肝臓

および小腸での mRNA 発現

肝臓と小腸は、剖検時にサンプルを採取し、直ちにRNAlaterで保存し、mirVana miRNA isolation kit（Invitrogen、Carlsbad、USA）を用いて全RNAを抽出した。mRNA発現は、TaqMan定量PCR分析（Applied Biosystems、Oyster Bay、USA）を用いてqRT-PCRで定量した。qRT-PCR（Bio-Rad Laboratories, Inc., USA）はハイブリダイゼーション法（PrimeTime Gene Expression Master Mix：Integrated DNA Technologies, Inc.）を使用した（逆転写反応：25℃/10分、42℃/60分、85℃/5分、熱変性：95℃/30秒、アニーリング及び伸張：60℃/30秒、45サイクルで実施）。発現量を確認した遺伝子は、肝臓における低比重リポ蛋白コレステロール受容体（*LDLr*）、スカベンジャー受容体クラスBI型（*SRBI*）、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA還元酵素（*HMGCR*）、ステロール調節エレメント結合転写因子1（*SREBF1*）、ステロール調節エレメント結合転写因子2（*SREBF 2*）、Niemann-Pick C1様1蛋白（*NPC1L1*）、リパーゼC（*LIPC*）、小腸のアポリポ蛋白B mRNA編集酵素触媒ポリペプチド.1（*APOBEC-1*）および*NPC1L1*である。

遺伝子とPCRに使用したプライマー/プローブは第II章 (Table 11) に記載した詳細に従って実施した。プライマーおよびプローブは、あらかじめ設計された遺伝子発現アッセイから入手するか、ブタの配列情報 (Applied Biosystems) に基づいて設計した (プライマーのアニーリング温度: 60°C)。内部コントロールとして GAPDH mRNA の発現量を用いた。

10. 血中酸化ストレスマーカー

2週に1回、無麻酔下で前大静脈洞から採血した。約1.0 mL採血し、20~60分間静置後、遠心分離 (室温、1710×g、3000 rpm、10分間) して得られた血清を用いて測定した。血中酸化ストレスマーカーは、生体の酸化ストレス度 (derivatives of reactive oxygen metabolites、以下d-ROMs) および抗酸化力 (biological antioxidant potential、以下BAP) を測定した。これら2つのマーカーの血清中濃度は、光度計と恒温恒湿ミニ遠心機を備えたFree Carrio Duo Redox Analyzerシステム (Wismerll、東京、日本) を用いて測定し、d-ROMsとBAPの両検査は製造元の説明書に従って実施した。BAP/d-ROMs比についても算出した。

11. 統計

全てのデータは平均値±標準偏差で表した。データは、群間差 (対照群対HFLCD群および、対照群対HFLCD+Statin群、HFLCD群対HFLCD+Statin群) の統計解析として、初めに一元配置分散分析 (ANOVA) を実施し、Tukey-Kramer多重比較検定およびMann-Whitney U検定 (Bonferroni調整) を適応した。これらの検定

および計算にはIBM SPSS Statistics 25ソフトウェア（IBM、東京、日本）を用いて行った。有意水準は5%とした。

結果

1. 一般状態観察、体重増加、内臓脂肪の重量

一般状態観察において、12週間の実験期間中に異常は何もみられなかった。12週間の体重増加について、Fig. 13に示した。体重増加はControl群（NcD群）と比較して、HFLCD群およびHFLCD+Statin群で高値を示したが、HFLCD群およびHFLCD+Statin群の間には明らかな差はみられなかった。内臓脂肪の器官重量においては、Control群と比較して、HFLCD群およびHFLCD+Statin群で、大網および腸間膜脂肪組織の絶対重量および相対重量の高値を示したが、HFLCD群およびHFLCD+Statin群の間には明らかな差はみられなかった（Table 19）。これらの結果から、スタチン摂取による体重増加および内臓脂肪増加に対する抑制はみられなかった。

2. 血液学的検査および血液生化学的検査

マイクロミニピッグの通常時の基準データ[31、32]を考慮し、血液学的検査では、いずれの群においても白血球減少、白血球増加、貧血を示した動物はいなかった。

血液生化学的検査において、血清中脂質代謝パラメータの結果をFig. 14に示した。Control群と比較して、HFLCD群およびHFLCD+Statin群で、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、およびHDLコレステロール濃度は急速に上昇し、2～4週時点ではほぼピークに達した。これらの血清中脂質代謝パラメータは、HFLCD群と比較して、HFLCD+Statin群で低値を示し、HFLCDによる血清中脂質代謝パラメータの増加は、スタチ

ン摂取により抑制されることが判明した。トリグリセリドは各群で明らかな差はみられず、各群とも通常時の基準データ[31、32]の正常範囲内であった。上記の脂質代謝パラメータを除き、肝系パラメータ、腎系パラメータ、グルコースを含む各血液生化学的パラメータに異常は認められず、Control群および参考データ[30、31]のマイクロミニピッグの正常範囲と比較した結果、HFLCD群およびHFLCD+Statin群のいずれの動物において、進行性肝障害、腎障害、高血糖がないと判断した（資料未掲載）。

3. 肝臓および小腸での遺伝子発現

剖検時に採取した肝臓および小腸における各遺伝子発現について、Fig. 15に示した。肝臓の *LDLr*、*HMGCR*、*NPC1L1*、*SREBF1*、*SREBF2*、*SRBI*、*LIPC* および小腸における *APOBEC1*、*NPC1L1* の各 mRNA の発現は、各群で有意な差はみられなかった。HMGCR mRNA の肝発現において、HFLCD+Statin群では、Control群およびHFLCD群と比較し、高値傾向を示し、HFLCD+Statin群の平均値は、Control群の平均値の約1.5倍、HFLCD群の平均値の約2倍と高値であり、スタチンの影響がみられた。その他、肝臓の *LDLr* 発現は各群で差はみられず、HFLCDによる影響もスタチンによる影響もみられなかった。肝臓の *SREBF1* および *SREBF2* 発現は *LDLr* と関連し、同様に HFLCD による影響もスタチンによる影響もみられなかった。肝臓の *SRBI* の発現は、HFLCD により差はみられず、これは第 II 章で HcD 摂取時に変化がみられなかった結果と同様であった。肝臓の *NPC1L1* 発現は、Control群と比較し HFLCD群で低値傾向がみられ、これは第 II 章で HcD 摂取

時にみられた結果と同様であったが、スタチン投与による改善（高値）傾向が示唆された。肝臓の *LIPC* および小腸の *APOBEC1* 発現は Control 群と比較し HFLCD 群で低値傾向がみられたが、スタチン投与による影響はみられなかった。小腸の *NPC1L1* 発現は、Control 群と比較し HFLCD 群で高値傾向がみられたが、スタチン投与による影響はみられなかった。

4. 病理解剖（剖検）

剖検時の肉眼所見においては、次の項で示す大動脈以外には特筆すべき異常はみられなかった。

5. 病理組織学的検査

病理組織学的検査は、INHAND・Minipig の毒性病理用語を参考に実施した [11]。病理組織学的検査においては、動脈の内膜に位置するアテローム性プラークが観察された。その他の臓器の病理組織学的検査において、心臓、腎臓、脾臓、脳、大網、腸間膜脂肪組織には目立った病理組織学的変化は観察されなかった。HFLCD 群では肝臓に軽度の脂肪変性が認められたが、HFLCD+Statin 群では認められなかった。アテローム性動脈硬化病変が存在したにもかかわらず、HFLCD を摂取した動物では血栓症や自然発症の心筋梗塞や脳梗塞は認められなかった。

6. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析

Oil-red-O 赤染領域がアテローム性動脈硬化病変に相当する (Fig. 16)。*En face* 解析において、HFLCD 群で赤染色積は、Control

群および HFLCD+Statin 群に比べて増加した (Fig. 16)。

7. 病理組織学的形態計測

腹部大動脈の [内膜面積] / [血管面積] の比 (%) は、Control 群および HFLCD+Statin 群と比較して、HFLCD 群で増加した (Fig. 17)。

8. 血中酸化ストレスマーカー

血中酸化ストレスマーカーの結果を Fig. 18 に示した。d-ROMs は活性酸素およびフリーラジカルによる酸化的傷害の度合いを示し、BAP は活性酸素およびフリーラジカル除去能力の度合いを示すマーカーである。12 週終了時の血中酸化ストレスマーカーにおいて、Control 群と比較して、HFLCD 群および HFLCD+Statin 群では d-ROMs が増加し、BAP および BAP/d-ROMs 比が減少した。

考察

本章では、病態モデルを用いた HMGCR 阻害剤の効能評価について検討し、HMGCR 阻害剤であるスタチンの影響を適切に評価できる病態モデルを構築するために、最適なコレステロール投与量と実験期間を検討した。

本論文の第 II 章の研究において、マイクロミニピッグでは、12% w/w 脂肪および 0.2~1.5% w/w コレステロール食を 8 週間摂取させると HMGCR mRNA の肝発現がダウンレギュレーションし、12% w/w 脂肪および 0.5~1.5% w/w コレステロール食を 8 週間摂取させると *LDLr* mRNA の肝発現がダウンレギュレーションすることが判明している [45、95]。これらの遺伝子発現がダウンレギュレーションされた環境下では、HMGCR 阻害剤は効果がないことが知られており、本章の研究では、*HMGCR* および *LDLr* mRNA の肝発現のダウンレギュレーションが起こらないよう、コレステロール含量を下げ、12% w/w 脂肪および 0.1% w/w コレステロール食 (HFLCD) を 12 週間動物に与えた。その結果、*HMGCR* および *LDLr* mRNA の肝発現のダウンレギュレーションは認められなかったことから、HMGCR 阻害剤の効能評価に適したコレステロール投与量を見出すことができた。また、本病態モデルでのスタチンの投与量は、ヒトでの治療量 [90、94] に近い量に設定された。本章の研究において、HFLCD の摂取により、高コレステロール血症を誘発し、腹部大動脈の動脈硬化の発現が確認できた。さらに、メタボリックシンドロームの症状である内臓脂肪組織 (大網および腸間膜脂肪) の重量の増加についても、HFLCD 摂取により誘発できた。スタチンは、ラッ

トやマウスは血中コレステロールを低下させず、高脂質血症モデル動物としては不適當であると報告されている [96]。しかしながら、ウサギとマイクロミニピッグはモデル動物として適していると判断される。ウサギでは、スタチンが *HMGCR* および *LDLR* mRNA の肝発現をアップレギュレートすることが報告されている [30]。本章の研究において、スタチン投与により、血清中総コレステロールおよび LDL コレステロールの上昇が抑制され、HFLCD+Statin を摂取したマイクロミニピッグでは *HMGCR* mRNA の肝発現の増加傾向があることを確認できたことから、*HMGCR* のアップレギュレーションが起きていると考えられた。高コレステロール血症の誘発を抑制することで、マイクロミニピッグの腹部大動脈の動脈硬化病変は、ウサギで報告されている事象 [44] と同様に減少した。一方、HFLCD+Statin を摂取したマイクロミニピッグにおける *LDLr* mRNA の肝発現の上昇は、認められなかった。これはアトルバスタチンが HMG-CoA 還元酵素を阻害する一方で、ミニブタでは LDL 受容体のアップレギュレーションが認められないという報告 [97] と一致している。さらに、*LDLr*^{-/-} 家畜ブタではスタチンによる高コレステロール血症の抑制が認められなかったが、*LDLr*^{+/-} ミニブタでは、スタチンによる高コレステロール血症の抑制が報告されている [92、93]。ブタにおける高コレステロール血症と *LDLr* 遺伝子の関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

スタチンはヒトの血清中 HDL コレステロール濃度を上昇させるが、その作用の強さはスタチンによって異なっている。本研究では、HFLCD+Statin 群のマイクロミニピッグは HFLCD 群

と比較して血清中 HDL コレステロール濃度の低下がみられた。この結果は、アトルバスタチンの効力あるいは種差によって引き起こされた可能性が考えられる [87、98~101]。これらの問題の解明にはさらなる研究が必要である。

酸化ストレスがヒトの生活習慣病における多様な障害や病態に関与すると報告されている [102~104]。血清中 d-ROMs と BAP を用いた活性酸素種の検出における最近の進歩は、バイオマーカー研究としての可能性が広がっている。循環中の d-ROMs 産生は冠状動脈疾患の発症と関連することが報告されており [104]、血中 BAP 濃度と頸動脈内膜中膜厚の間には負の相関があることが報告されている [105]。さらに、肥満やメタボリックシンドロームでは、血中 BAP/d-ROMs 比が低いことが報告されている [106]。これらの血中酸化ストレスマーカーは、スタチン摂取による効果は観察されなかったものの、本研究における HFLCD 摂取に起因した d-ROMs および BAP の変化は、ヒトの動脈硬化症における変化と類似していたことから、マイクロミニピッグ動脈硬化モデルに有用なパラメータとなり得ると考えられる。

2021 年にミニブタ毒性病理用語集が発表され [11]、ブタの研究利用普及を促進されることが予想され、ブタでの病態モデルが今後より必要になると考えられ、本章の試みは大変有用であると考えられる。

本章の研究において、マイクロミニピッグのヒト型アテローム性動脈硬化症モデルを使用してスタチンによる薬効を確認する際、HFLCD 中のコレステロールの最適含量は 0.1% w/w で

あることが判明し、12週間の実験期間で薬効を適切に確認することに成功した。結論として、HFLCDによって誘導されるこのモデルは、高コレステロール血症およびアテローム性動脈硬化症に対する HMGCR 阻害剤の評価および今後の治療薬開発の薬効試験に貢献すると考えられる。

表および付図

Fig. 12. スタチンの作用機序の概略図

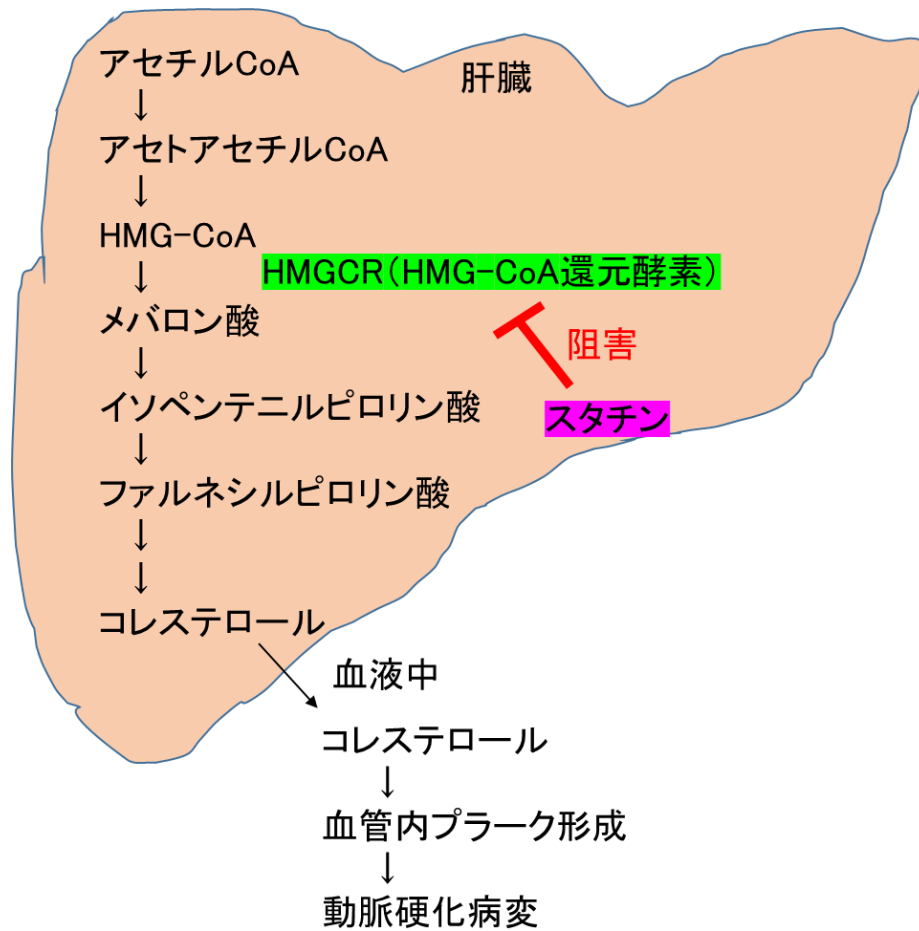


Table 16. 群構成、給餌およびスタチン摂取量の詳細

| 群 | 飼料名 | 脂肪 (w/w%) | コレステ ロール (w/w%) | スタチン (mg/kg/day) | 動物数 (匹) |
|------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|------------|
| Control | 普通食 (NcD) ^{a)} | 0 | 0 | 0 | 6 |
| HFLCD | 高脂肪食 (HcD) ^{b)} | 12 | 0.1 | 0 | 6 |
| HFLCD+ Statin | 高脂肪食 (HcD) ^{c)} | 12 | 0.1 | 3 ^{c)} | 6 |

a) 普通食（マッシュ状ブタ用飼料であることから 73）を 12 週間与えた。

b) 普通食に 12 w/w%脂肪および 0.1%コレステロールを混合した高脂肪食を 12 週間与えた。

c) 高脂肪食に、スタチン 3 mg/kg/day を混合し、12 週間与えた。

Table 17. 血液学的検査の測定項目および方法の詳細

| 検査項目 | 単位 | 測定方法 | 機種 |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 赤血球 (RBC) | $10^6/\text{mm}^3$ | 2角度レーザーフローサイトメトリー法 | ADVIA1 20 ^{a)} |
| 白血球 (WBC) | $10^3/\text{mm}^3$ | 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 (Ht) | % | 計算式：(平均赤血球容積×赤血球) / 10 | |
| ヘモグロビン (HGB) | g/dL | シアンメトヘモグロビン変法 | |
| 血小板 (PLT) | $10^3/\text{mm}^3$ | 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 (MCV) | 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 (MCH) | 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 (MCHC) | g/dL | 計算式：[ヘモグロビン / (赤血球×平均赤血球容積)] × 1000 | |

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

Table 18. 血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細

| 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 (AST) | IU/L | JSCC 標準化対応 | JCA- BM8 ^{a)} |
| アラニンアミノトラン スフェラーゼ (ALT) | IU/L | | |
| アルカリホスファター ゼ (ALP) | IU/L | | |
| 乳酸脱水素酵素 (LDH) | IU/L | | |
| γ-グルタミルトランス ペプチダーゼ (γ-GT) | IU/L | | |
| クレアチンキナーゼ (CK) | IU/L | | |
| アミラーゼ (Amy) | IU/L | BG5P 基質法 | |
| 総ビリルビン (T-Bil) | mg/dL | バナジン酸酸化法 | |
| 直接ビリルビン (D-Bil) | mg/dL | | |
| 総蛋白 (TP) | g/dL | ビウレット法 | |
| アルブミン (Alb) | g/dL | BCG 法 | |
| グロブリン (Glb) | g/dL | 計算式 : TP - Alb | - |
| A/G 比 | - | 計算式 : Alb / Glb | |
| 総コレステロール (TP) | mg/dL | COD・HDAOS 法 | JCA- BM8 ^{a)} |
| 遊離コレステロール (F-cho) | mg/dL | コレステロールオキ シダーゼ・DAOS 法 | |
| トリグリセリド (TG) | mg/dL | GPO・HDAOS 法、グ リセリン消去法 | |
| ブドウ糖 (GLU) | mg/dL | ヘキソキナーゼ G- 6-PDH 法 | |

Table 18. 血液生化学的検査の測定項目および方法の詳細

(続き)

| 検査項目 | 単位 | 測定方法 | 機種 |
|-------------------------|-------------|------------------|-----------------------|
| 尿素窒素 (UN) | mg/dL | ウレアーゼ・G1DH 法 | JCA-BM8 ^{a)} |
| クレアチニン (Cre) | mg/dL | クレアチナーゼ・F-DAOS 法 | |
| 無機リン (IP) | mg/dL | PNP・XDH 法 | |
| カルシウム (Ca) | mg/dL | MXB 法 | |
| ナトリウム (Na) | mEq/L | 電極法 | |
| カリウム (K) | mEq/L | 電極法 | |
| 塩素 (Cl) | mEq/L | 電極法 | |
| コレステロール分画 ^{b)} | %、 mg/dL | 電気泳動法 | エパライザ ^{2c)} |

a) 自動分析装置 (日本電子株式会社、東京、日本)

b) 検査項目: 高比重リポ蛋白 (HDL)、低比重リポ蛋白 (LDL)、超低比重リポ蛋白 (VLDL)、カイロミクロン (CM)

c) 全自動電気泳動分析装置 (株式会社ヘレナ研究所、埼玉、日本)

Fig. 13. 体重増加（HLFCDあるいはスタチン摂取12週間の増加率）

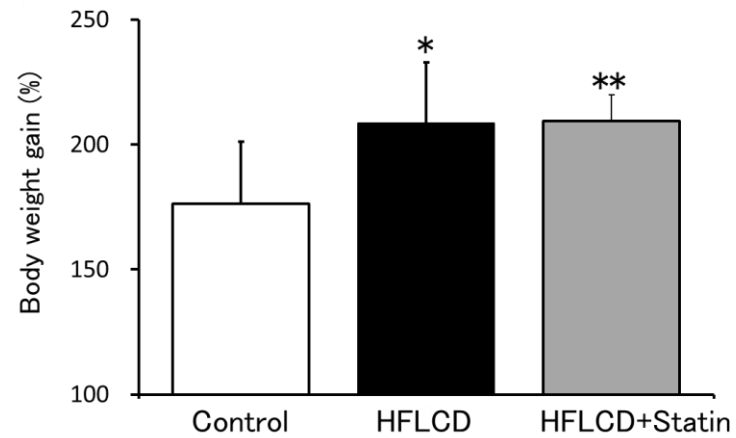


Table 19. 内臓脂肪重量

| Organs | | Control | HFLCD | HFLCD+Statin |
|---------------------------|--------------|-----------|-------------|--------------|
| Omentum | AW (g) | 19.8±9.3 | 36.8±24.1 | 36.7±15.8* |
| | RW (g/kg BW) | 1.3±0.4 | 2.0±1.0 | 2.1±0.8* |
| Mesenteric adipose tissue | AW (g) | 60.5±29.4 | 108.6±56.7* | 110.6±46.3* |
| | RW (g/kg BW) | 3.9±1.2 | 5.9±2.4* | 6.1±2.1* |

HFLCD: High fat and low cholesterol diet; AW: absolute weight; RW: relative weight; AW (g)/body weight (BW, kg). * $p < 0.05$ vs. Control.

Fig. 14. 血清中脂質代謝パラメータ

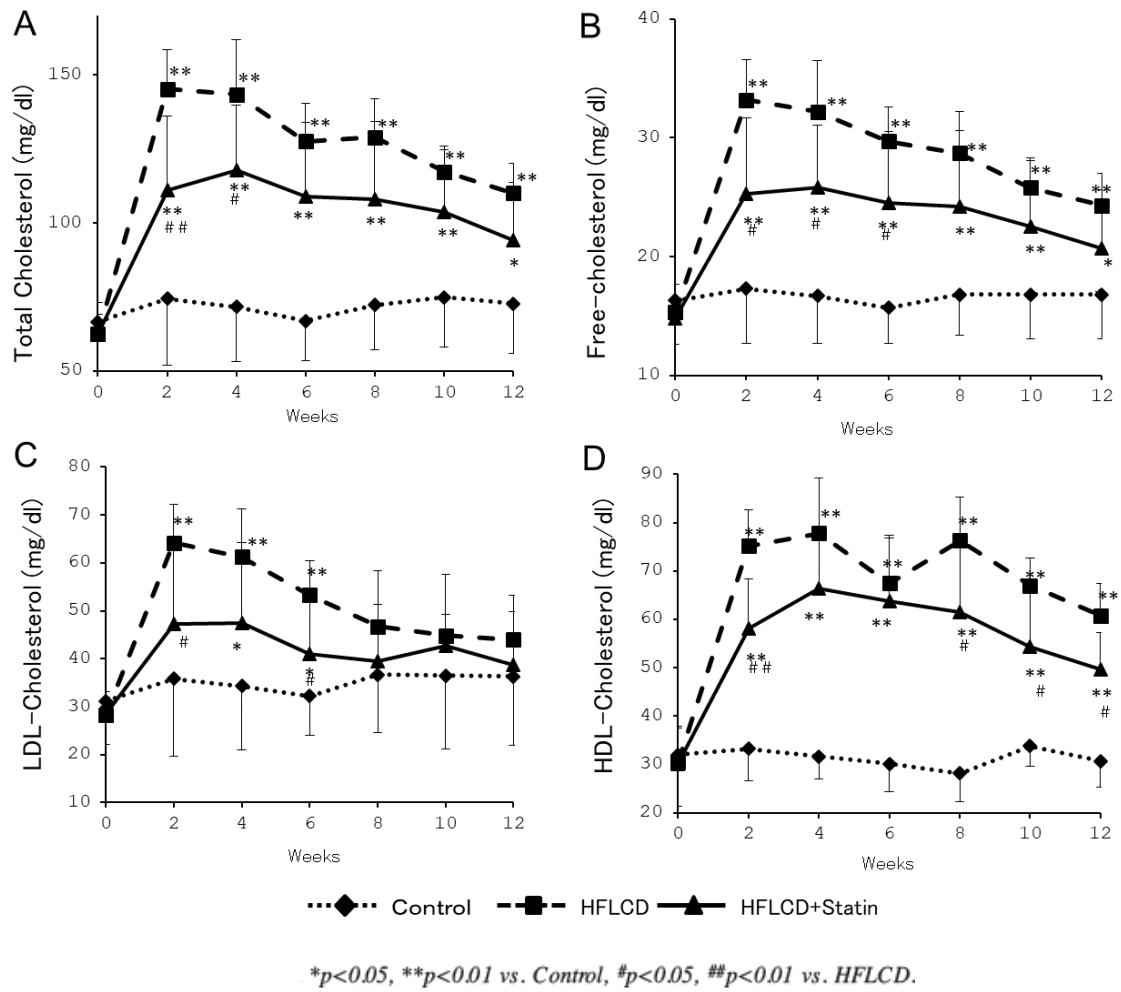
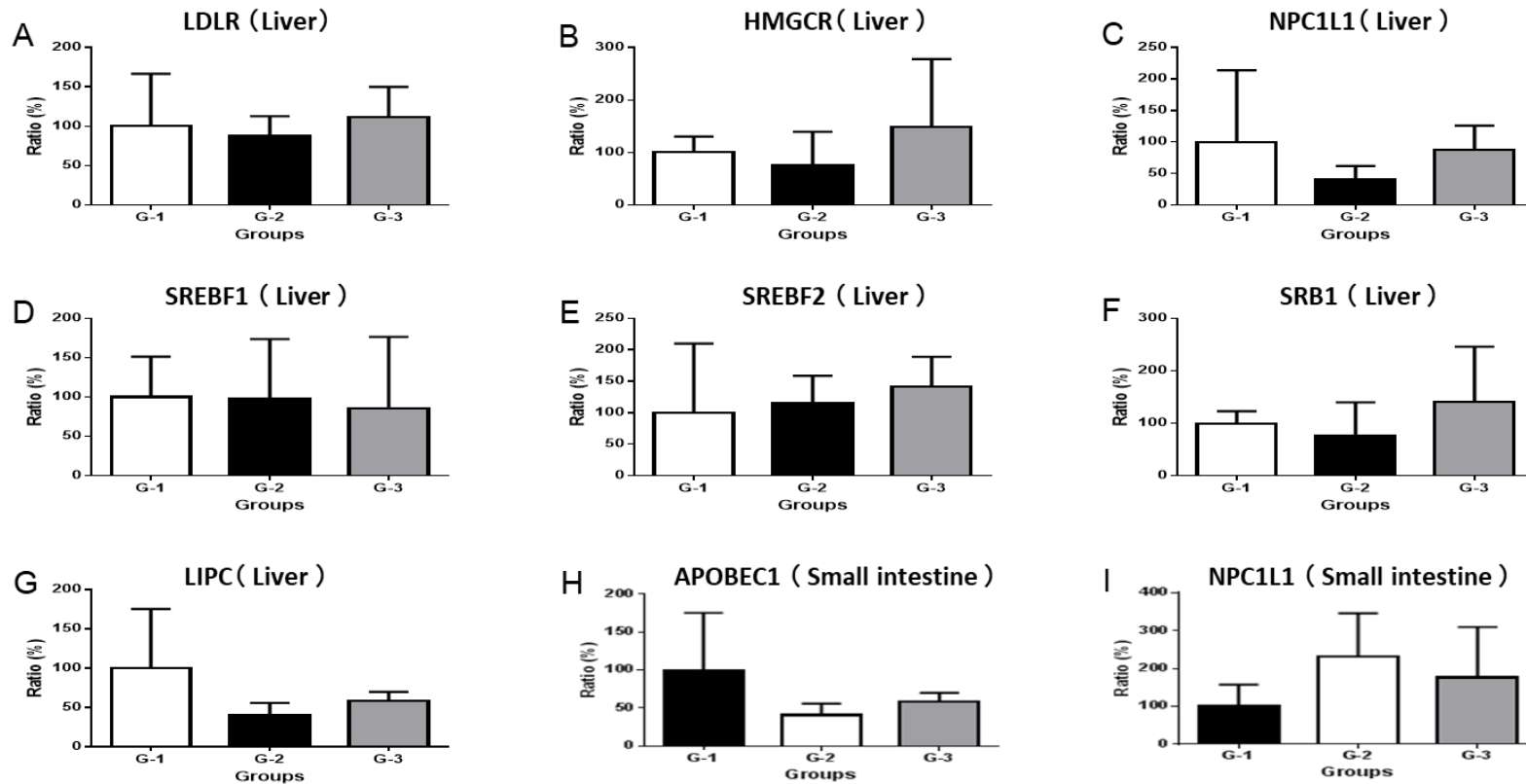


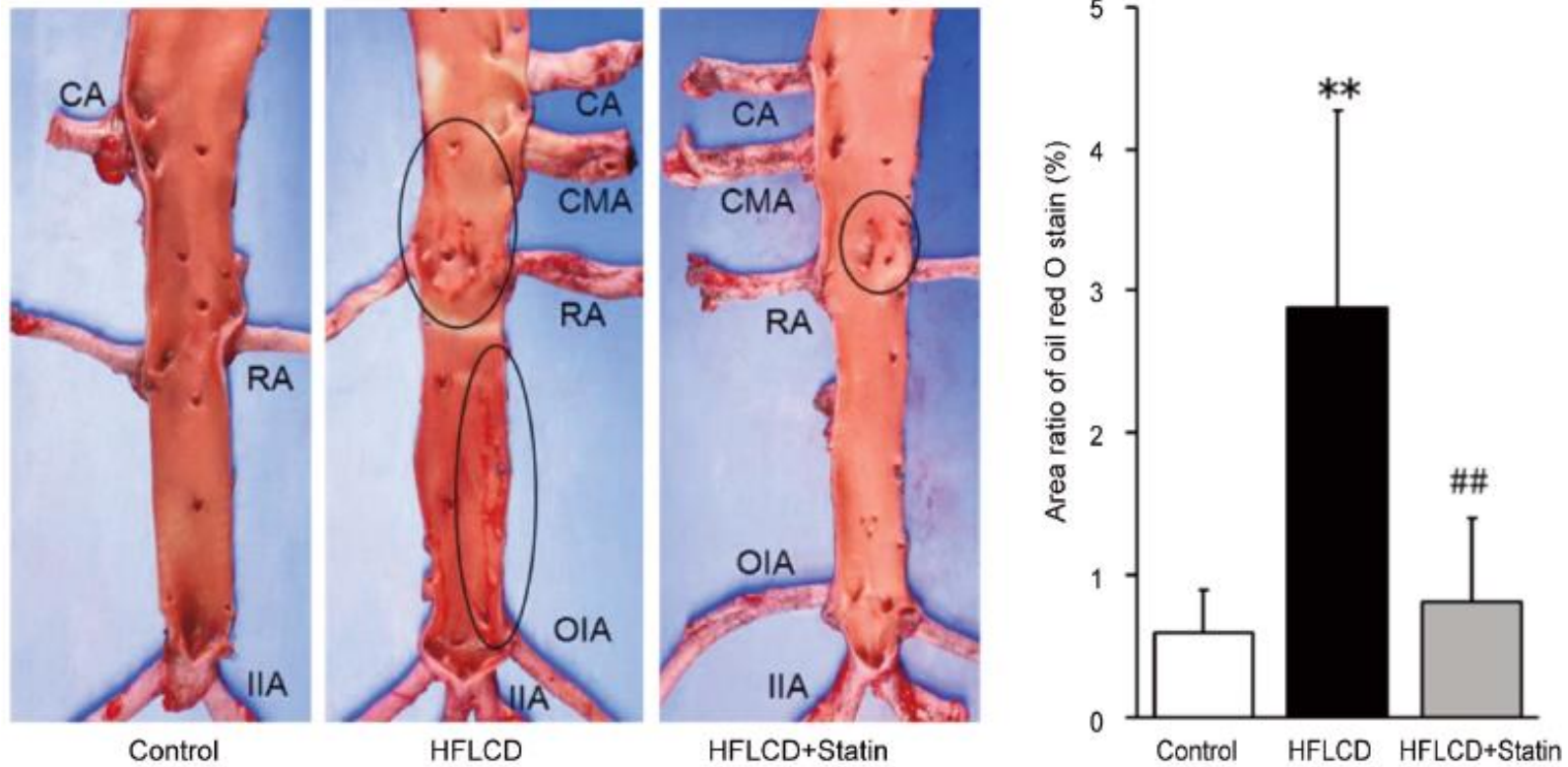
Fig. 15. qRT-PCR で確認した肝臓の *LDLR*、*HMGCR*、*NPC1L1*、*SREBF1*、*SREBF2*、*SRB1*、*LIPC* および小腸の *APOBEC-1*、*NPC1L1* の遺伝子発現結果



G-1:Control, G-2:HFLCD, G-3:HFLCD+Statin

遺伝子発現レベルは、対照群で観察されたレベルに対する発現パーセントとして計算した。

Fig. 16. *En face* 解析による動脈硬化病変の肉眼所見と定量解析

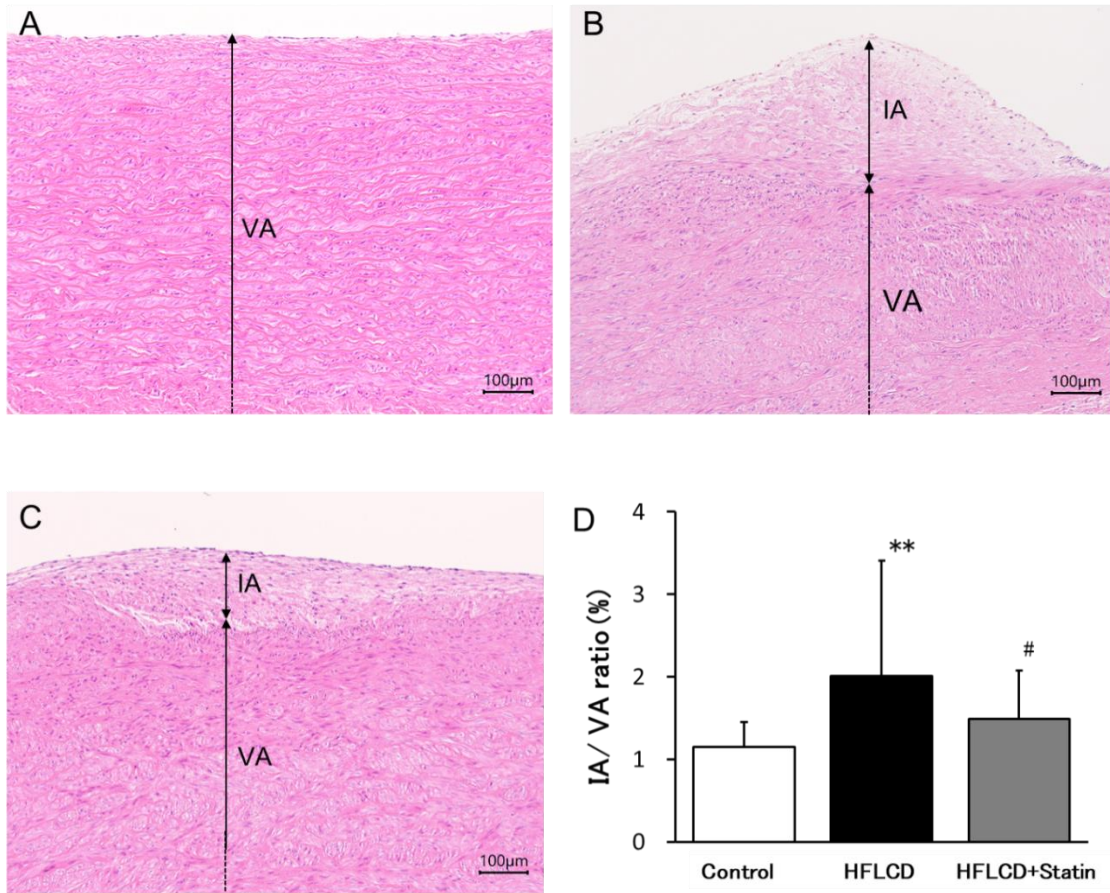


オイルレッド O 染色で検出された動脈硬化性赤色病変部（円で囲った部分）。

オイルレッド O 染色の面積比（全表面積に対するオイルレッド O 染色の面積）を示した。

** $p < 0.01$ vs. Control, ## $p < 0.01$ vs. HFLCD.

Fig.17. 腹部大動脈における組織形態計測：内膜面積/血管面積比



(A) 異常な変化は認められなかった(対照群)。

(B) 軽微なアテローム性プラーク (HFLCD 群)

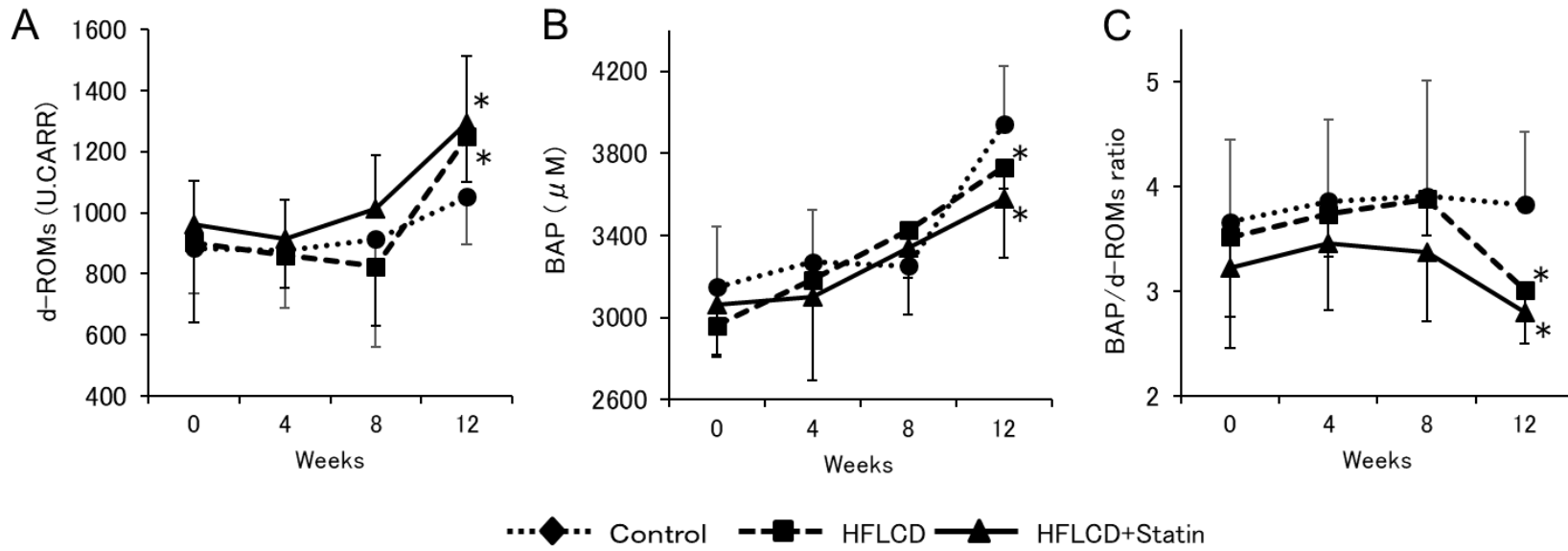
(C) ごく軽微なアテローム性プラーク (HFLCD+Statin 群)

(D) 内膜面積/血管面積 (IA/VA) 比 (%) のデータ

VA：血管面積、IA：内膜面積

* $p < 0.01$ vs. Control, # $p < 0.05$ vs. HFLCD.

Fig. 18. 血中酸化ストレスマーカー



** $p < 0.01$ vs. Control.

総括

第 I 章の研究により、マイクロミニピッグの体重、成長曲線、血液学的検査および血液生化学的検査の基準値の範囲を示すことができ、マイクロミニピッグの実験動物としての有用性を示すことができた。このマイクロミニピッグを使用し、ヒトと非常に類似したコレステロール代謝を持つ、高コレステロール血症誘発性ヒト型アテローム性動脈硬化症の新しい病態モデルを確立することでき、HMGCR 阻害剤の評価に有用な病態モデルであることを示すことができた。今後、本マイクロミニピッグの動脈硬化症モデルを使用することにより、HMGCR 阻害剤の評価および今後の治療薬開発の薬効試験に貢献すると考えられる。

参考文献

1. Kumar. V., Abbas, AK. and Faust, N. (eds.). 2005. Schoen FJ: Blood Vessels. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7th Ed: 511–554.
2. Washio, M., Sasazuki, S., Kodama, H., Yoshimasu, PK., Liu, Y., Tanaka, K., Tokunaga, S., Kono, PS., Arai, H., Koyanagi, S., Hiyamuta, K., Doi, Y., Kawano, MT., Nakagaki, MO., Takada, K., Nii, MT., Shirai, K., Ideishi, MM., Arakawa, MK., Mohri, MM. and Takeshita, A. 2021. Role of hypertension, dyslipidemia and diabetes mellitus in the development of coronary atherosclerosis in Japan. *Jpn Circ J.* **65(8)**: 731–737.
3. Hamada, N., Miyata, M., Eto, H., Ikeda, Y., Shirasawa, T., Akasaki, Y., Miyauchi, T., Furusho, Y., Nagaki, A., Aronow, BJ. and Tei, C. 2011. Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF- α . *J Atheroscler Thromb.* **18(3)**: 209–216.
4. Reddick, RL., Zhang, SH. and Maeda, N.: Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. 1994. *Arterioscler Thromb.* **14(1)**: 141–147.
5. van Vlijmen, BJ., van den Maagdenberg, AM., Gijbels, MJ. van der Boom, H., HogenEsch, H., Frants, RR., Hofker, MH., and Havekes, LM. 1994. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest.* **93(4)**: 1403–1410.
6. Suzuki, H., Kobayashi, H., Sato, F., Yonemitsu, Y., Nakashima,

- Y. and Sueishi, K. 2003. Plaque-stabilizing effect of pitavastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *J Atheroscler Thromb.* **10(2)**: 109–116.
7. Buja, LM., Kita, T., Goldstein, JL., Watanabe, Y. and Brown, MS. 1983. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis.* **3(1)**:87–101.
 8. Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Miura, N., Fujiki, M., Horiuchi, M., Izumi, Y., Miyajima, H., Nagata, R., Misumi, K., Takeuchi, T., Tanimoto, A. and Yoshida, H. 2011. Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: Novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet. *J Pharmacol Sci.* **115(2)**: 115–121.
 9. Bollen, P. J. A., Hansen, A. K. and Rasmussen, H. J. 2010. Important biological features. In: *The Laboratory Swine*, 2nd ed. 1–13.
 10. Svendsen, O. 2006. The minipig in toxicology. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**: 335–339.
 11. Mikala, S., Zuhail, D., Wanda, M.H., Kris, H., Binod, J., Bjoern, J., Gitte, J., Atsuhiko, K., Hiroaki, K., Sean M., Keith, N., Susanne R., Dirk, S., Vimala, V. and Zbigniew, W.W. 2021. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND): Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Minipig. *Toxicol Pathol.* **49(1)**:110-228.
 12. Morris, w., George, A., Pantely, D. and Herbert, D. 1986. A

- quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovascular Res.* **20(12)**: 907–917.
13. Kamimura, R., Miura, N. and Suzuki S. 2003. The hemodynamic effects of acute myocardial ischemia and reperfusion in Clawn miniature pigs. *Exp Anim.* **52**: 335-338.
 14. Ellegaard, L., Jorgensen, K. D., Klastrup, S., Hansen, A. K. and Svendsen, O. 1995. Haematologic and clinical chemical values in 3 and 6 months old Göttingen minipigs. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **22**: 239–248.
 15. Rispat, G., Slaoui, M., Weber, D., Salemink, P., Berthoux, C. and Shrivastava, R. 1993. Haematological and plasma biochemical values for healthy Yucatan micropigs. *Lab. Anim.* **27**: 368–373.
 16. Tumbleson, M. E., Badger, T. M., Baker, P. C. and Hutcheson, D. P. 1972. Systematic oscillations of serum biochemic and hematologic parameters in Sinclair(S-1) miniature swine. *J. Anim. Sci.* **35**: 48–50.
 17. Swindle, MM (ed.). and Boca Raton, F. 2007. Swindle MM: Biology, handling, husbandry, and anatomy. *In*: Swine in the Laboratory, Second edition. 1-33.
 18. Goodrich, JA., Clarkson, TB., Cline, JM., Jenkins, AJ. and Del Signore, MJ. 2003. Value of the minipig model of menopause in the assessment of benefits and risks of postmenopausal therapies for cardiovascular and reproductive tissues. *Fertil*

Steril, **79**: 779-788.

19. Turk, JR., Henderson, KK., Vanvickle, GD., Watkins, J. and Laughlin, MH. 2005. Arterial endothelial function in a porcine model of early-stage atherosclerotic disease. *Int J Exp Pathol*, **86**: 335-345.
20. Zhang, C., Yin, W., Liao, D., Huang, L., Tang, C., Tsutsumi, K., Wang, Z., Liu, Y., Li, Q., Hou, H., Cai, M. and Xiao, J. 2006. NO-1886 upregulates ATP binding cassette transporter A1 and inhibits diet-induced atherosclerosis in Chinese Bama minipigs. *J Lipid Res.* **47**: 2055-2063
21. Herrmann, J., Saguner, AM., Versari, D., Peterson, TE., Chade, A., Olson, M., Lerman, LO. and Lerman, A. 2007. Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circ Res.* **101**: 865-874
22. Takai, H., Miyoshi, A., Yamazaki, M., Adachi, K., Katagiri, K., Arakawa, H., Katsuyama, K., Ito, T., dujii, E., Hayashi, S., Kato, A. and Suzuki, M. 2008. Granulocyte colony-stimulating factor has no adverse effects on atherosclerotic lesions in high cholesterol-fed miniature Swine. *J Vet Med Sci.* **70**: 943-950
23. 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. and Kawaguchi H. 2010. Novel Microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. *In Vivo.* **24(5)**: 671-680.

24. Takeishi, K., Horiuchi, M., Kawaguchi, H., Deguchi, Y., Izumi, H., Arimura, E., Kuchiiwa, S., Tanimoto, A. and Takeuchi T. 2012. 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* 472982.
25. Kaneko, N., Itoh, K., Sugiyama, A. and Izumi, Y. 2011. Micro-minipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: preface. *J. Pharmacol. Sci.* **115**: 112–114.
26. Murayama, N., Kaneko, N., Horiuchi, K., Ohyama, K., Shimizu, M., Ito, K. and Yamazaki, H. 2009. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activity of liver microsomes from Microminipigs, a possible new animal model for humans in non-clinical studies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**: 404–408.
27. Sugiyama, A., Nakamura, Y., Akie, Y., Saito, H., Izumi, Y., Yamazaki, H., Kaneko, N. and Itoh, K. 2011. Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: in vivo proarrhythmia models of drug-induced long QT syndrome: development of chronic atrioventricular block model of microminipig. *J. Pharmacol. Sci.* **115**: 122–126.
28. Yoshikawa, T., Takahashi, Y., Kawaguchi, H., Utsunomiya, S., Miura, N., Izumi, H., Miyoshi, N. and Tanimoto, A. 2013. A dermal phototoxicity study following intravenous infusion administration of ciprofloxacin hydrochloride in the novel

- Microminipigs. *Toxicol Pathol.* **41**: 109-113.
29. Nissen, SE., Tuzcu, EM., Schoenhagen, P., Brown, BG., Ganz, P., Vogel, RA., Crowe, T., Howard, G., Cooper, CJ., Brodie, B., Grines, CL. and DeMaria, AN. 2004. REVERSAL Investigators: Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* **291(9)**: 1071–1080.
30. Ma, PT., Gil, G., Südhof, TC., Bilheimer, DW. And Goldstein, JL. 1986. Brown MS: Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83(21)**: 8370–8374.
31. Kawaguchi, H., Yamada, T., Miura, N., Takahashi, Y., Yoshikawa, T., Izumi, H., Kawarasaki, T., Miyoshi, N., and Tanimoto, 2012. A. Reference values of hematological and biochemical parameters for the world smallest microminipigs. *J Vet Med Sci* **74(7)**: 933–936.
32. Kawaguchi, H., Yamada, T., Miura, N., Noguchi, M., Izumi, H., Miyoshi, N. and Tanimoto, A. 2013. Sex differences in serum lipid profile in novel Microminipigs. *In Vivo.* **27(5)**: 617-622.
33. Köhn, F., Sharifi, A. R. and Simianer, H. 2007. Modeling the growth of the Goettingen minipig. *J. Anim. Sci.* **85**: 84–92.
34. Jørgensen, K. D., Ellegaard, L., Klastrup, S. and Svendsen, O. 1998. Haematological and clinical chemical values in

- pregnant and juvenile Göttingen minipigs. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **25**: 181–190.
35. Niwa, Taizaemon. 1994. Handbook of Swine Farming. Yokendo Corporation. 8-41.
36. Klobasa, F., Werhahn, E. and Butler JE. 1987. Composition of sow milk during lactation. *J Anim Sci.* **64**: 1458-1466.
37. Williams, CM. 2004. Lipid metabolism in women. *Proc Nutr Soc* **63**: 153-160.
38. Krishnaveni, GV., Veena, SR., Hill, JC., Kehoe, S., Karat, SC. and Fall CH. 2010. Intrauterine exposure to maternal diabetes is associated with higher adiposity and insulin resistance and clustering of cardiovascular risk markers in Indian children. *Diabetes Care.* **33**: 402-404.
39. Jawien, J. 2012. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* **13**: 2435-2439.
40. Wouters, K., Shiri-Sverdlov, R., van Gorp, PJ., van Bilsen, M. and Hofker, MH. 2005. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med.* **43**: 470-479
41. Getz, GS. and Reardon, CA. 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **32**: 1104-1115
42. Fan, J. and Watanabe T. 2003. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther.* **79**: 261–282.

43. Yamada, S., Wang, KY., Tanimoto, A., Fan, J., Shimajiri, S., Kitajima, S., Morimoto, M. and Tsutsui, M., Watanabe, T., Yasumoto, K., and Sasaguri, Y. 2008. Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol.* **172(5)**: 1419–1429.
44. Luo, F., Guo, Y., Ruan, GY., Long, JK., Zheng, XL., Xia, Q., Zhao, SP., Peng, DQ., Fang, ZF. and Li, XP. 2017. Combined use of metformin and atorvastatin attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Sci Rep.* **7(1)**: 2169.
45. Kawaguchi, H., Yamada, T., Miura, N., Ayaori, M., Uto-Kondo, H., Ikegawa, M., Noguchi, M., Wang, KY., Izumi, H. and Tanimoto, A. 2014. Rapid development of atherosclerosis in the world's smallest Microminipig fed a high-fat/high-cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb.* **21(3)**: 186–203.
46. Lichtman, AH., Clinton, SK., Iiyama, K., Connelly, PW., Libby, P. and Cybulsky, MI. 1999. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**: 1938-1944.
47. Gordon, DJ. and Rifkind, BM. 1989. High-density lipoprotein—the clinical implications of recent studies. *N Eng J Med.* **321**: 1311-1316.
48. Quig, DW. and Zilversmit, DB. 1989. High density lipoprotein metabolism in a rabbit model of hyperalphalipoproteinemia.

Atherosclerosis. **76**: 9-19.

49. Brinton, EA., Eisenberg, S., and Breslow, JL. 1990. A low-fat diet decreases high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels by decreasing HDL apolipoprotein transport rates. *J Clin Invest*. **85**: 144-151.
50. Hayek, T., Ito, Y., Azrolan, N., Verdery, RB., Aalto-Setala, K., Walsh, A. and Breslow, JL. 1993. Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. *J Clin Invest*. **91**: 1665-1671.
51. Greeve, J., altkemper, I., Dieterich, JH., Greten, H. and Windler, E. 1993. Apoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. **34**: 1367-1383.
52. Greeve, J., Jona, VK., Chowdhury, NR., Horwitz, MS. And Chowdhury, JR. 1996. Hepatic gene transfer of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme results in a reduction of plasma LDL levels in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Lipid Res*. **37**: 2001-2017.
53. Hardtmann, DA., Pullinger, CR., Hamilton, RL., Kane, JP. and Malloy, MJ. 1991. Molecular and metabolic basis for the metabolic disorder normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. *J Clin Invest*. **88**: 1722-1729.

54. Brown, MS. And Goldstein, JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**: 34-47.
55. Goedeke, L. and dernandez-Hernando, C. 2012. Regulation of cho- lesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. **69**: 915-930.
56. Rudling, M. 1992. Hepatic mRNA levels for the LDL receptor and HMG-CoA reductase show coordinate regulation in vivo. *J Lipid Res*. **33**: 493-501.
57. Rudling, M., Angelin, B., Stahle, L., Reihner, E., Sahlin, S., Olivecrona, H., Bjorkhem, I. and Einarsson, C. 2002. Regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3- methylglutaryl Coenzyme A reductase, and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNAs in human liver. *J Clin Endocrinol Metab*. **87**: 4307-4313.
58. Kong, WJ., Liu, J. and Jiang, JD. 2006. Human low-density lipopro- tein receptor gene and its regulation. *J Mol Med*. **84**: 29-36.
59. Lammert, d. and Wang, DQ. 2005. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterol- ogy*. **129**: 718-734.
60. Redinger, RN. 2003. Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med*. **142**: 7-20.
61. Betters, JL. and Yu, L. 2010. NPC1L1 and cholesterol transport. *dEBS Lett*. **584**: 2740-2747.

62. Pramfalk, C., Jiang, ZY., Cai, Q., Hu, H., Zhang, SD., Han, TQ., Eriksson, M., Parini, P. 2010. HND1 α and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver. *J Lipid Res.* **51**: 1354-1362.
63. Alrefai, WA., Annabadi, Sarwar, Z., Dwivedi, A., Saksena, S., Singla, A., Dudeja, PK. And Gill, RK. 2007. Modulation of human Niemann-Pick C1-like 1 gene expression by sterol: Role of sterol regulatory element binding protein 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **292**: G369- G376.
64. Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N. and Matsuzawa, Y. 2000. Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta.* **1529**: 257-275.
65. Rosenson, RS., Brewer, Jr HB., Davidson, WS., Dayad, ZA., Duster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, XC., Phillips, MC., Rader, DJ., Remaley, AT., Rothblat, GH., Tall, AR., and van-Charvet, LY. 2012. Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation.* **125**: 1905-1919.
66. Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C., Lagrost, L. 1998. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Regulation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **120**: 517-525.
67. Hogarth, CA., Roy, A. and Ebert, DL. 2003. Genomic evidence

- for the absence of a functional cholesterol ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **35**: 71-81.
68. Marotti, KR., Castle, CK., Boyle, TP., Lin, AH., Murry, RW. and Melchior, GW. 1993. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature.* **364**: 73-75.
69. Zuckerman, SH., Evans, Gd., Schekm, JA., Eacho, PI. And Sandusky, G. 1999. Estrogen-mediated increases in LDL cholesterol and foam cell-containing lesions in human apo B100 x CETP transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**: 1476-1483.
70. Hayek, T., L, Massuci-Magoulas., Jiang, X., Walsh, A., Rubin, E., Breslow, JL. and Tall, AR. 1995. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest.* **96**: 2071-2074.
71. Döger, B., Chase, M., Amar, MJ., Vaisman, BL., Shamburek, RD., Paigen, B., druchart-Najib, J., Paiz, JA., Koch, CA., Hoyt, Rd., Brewer, HB Jr. and Santamarina-dojo, S. 1999. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem.* **274**: 36912-36920.
72. Gardner, CD., dortmann, SP. and Krauss RM. 1996. Association

- of small low density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA*. **276**: 875-881.
73. Lamarche, B., Tchernof, A., Moorjani, S., Cantin, B., Dagenais, GR., Lupien, PJ., Després, JP. 1997. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation*. **95**: 69-75.
74. Schaefer, EJ., McNamara, JR., Tayler, T., Daly, JA., Gleason, JA., Seman, LJ., derrari, A. and Rubenstein, JJ. 2002. Effects of atorvas- tatin on fasting and postprandial lipoprotein subclasses in coronary heart disease patients versus control subjects. *Am J Cardiol*. **90**: 689-696.
75. Brousseau, ME., Schaefer, EJ., Wolfe, ML., Bloedon, LT., Digenio, AG., Clark, RW., Mancuso, JP. and Rader, DJ. 2004. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*. **350**: 1505-1515.
76. Ishigami, M., Yamashita, S., Sakai, N., Arai, T., Hirano, K., Hiraoka, H., Kameda-Takemura, K. an Matsuzawa, Y. 1994. Large and cholesterylester-rich high density lipoproteins in cholesteryl ester transfer protein deficienct can not protect macrophages from cholesterol accumulation induced by acetylated low density lipoproteins. *J Biochem*. 116: 257-262.
77. Ordovas, JM., Cupples, LA., Corella, D., Otvos, JD., Osgood, D., Martinez, A., Lahoz, C., Coltell, O., Wilson, PW. and

- Schaefer EJ: 2000. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**: 1323-9132.
78. Brousseau, ME., O'Connor, JJ Jr., Ordovas, JM., Collins, D., Otvos, JD., Massov, T., McNamara, JR., Rubins, HB., Robins, SJ., and Schaefer, EJ. 2002. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**: 1148-1154.
79. Yamashita, S., Hui, DY., Wetterau, JR., Sprecher, DL., Harmony, JAK., Matsuzawa, Y. and Tarui S. 1990. Total deficiency of plasma cholesteryl ester transfer protein in subjects homozygous and heterozygous for the intron 14 splicing defect. *Biochem Biophys Res Commun.* **170**: 1346-1351.
80. Hirano, K., Yamashita, S., Kuga, Y., Sakai, N., Nozaki, S., Kihara, S., Arai, T., Yanagi, K., Takami, S., Menju, M, Ishigami, M., Yoshida, Y., Kameda-Takemura, K., Hayashi, K. and Matsuzawa, Y. 1995. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipo- proteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **15**: 1849-5618.
81. Hirano, K., Yamashita, S., Sakai, N., Arai, T., Yoshida, Y.,

- Nozaki, S., Kameda-Takemura, K. and Matsuzawa Y. 1995. Molecular defect and atherogenicity in cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* **748**: 599-602.
82. Schwartz, GG., Olsson, AG., Abt, M., Ballantyne, CM., Barter, PJ., Brumm, J., Chaitman, BR., Holme, IM., Kallend, D., Leiter, LA., Leitersdorf, E., McMurray, JJ., Mundl, H., Nicholls, SJ., Shah, PK., Tardif, JC. and Wright, RS. 2012. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* **367**: 2089-2099.
83. Peterson, J., Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T. 1986. Mouse preheparin plasma contains high levels of hepatic lipase with low affinity for heparin. *Biochim Biophys Acta.* **878**: 65-70.
84. Mezdour, H. and Jones, R. 1997. Dengremont C, Castro G, Maeda N: Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem.* **272**: 13570-13575.
85. Dichek, HL., Qian, K. and Agrawal, N. 2004. Divergent effects of the catalytic and bridging functions of hepatic lipase on atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**: 1696-1702.
86. Dan, J., Wang, J., Bensadoun, A., Lauer, SJ. and Dang, Q. 1994. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**:

8724-8728.

87. Tani, S., Takahashi, A., Nagao, K., and Hirayama. 2015. A. Contribution of apolipoprotein A-I to the reduction in high-sensitivity C-reactive protein levels by different statins: comparative study of pitavastatin and atorvastatin. *Heart Vessels*. **30(6)**: 762–770.
88. Jones, P., Kafonek, S., Laurora, I. and Hunninghake, D. 1998. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. **81(5)**: 582–587.
89. Gentile, S., Turco, S., Guarino, G., Sasso, CF., Amodio, M., Magliano, P., Salvatore, T., Corigliano, G., Agrusta, M., De Simone, G., Gaeta, I., Oliviro, B. and Torella, R. 2000. Comparative efficacy study of atorvastatin vs simvastatin, pravastatin, lovastatin and placebo in type 2 diabetic patients with hypercholesterolaemia. *Diabetes Obes Metab*. **2(6)**: 355–362.
90. Martínez-González, J., Alfón, J., Berrozpe, M. and Badimon, L. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemotactic protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis*. **159(1)**: 27–33.
91. Busnelli, M., Manzini, S., Froio, A., Vargiolu, A., Cerrito, MG., Smolenski, RT., Giunti, M., Cinti, A., Zannoni, A., Leone, BE.,

- Forni, M., Bacci, ML., Biasi, GM., Giovannoni, R. and Lavitrano, M. 2013. Diet induced mild hypercholesterolemia in pigs: local and systemic inflammation, effects on vascular injury-rescue by high-dose statin treatment. *PLoS One*. **8(11)**: e80588.
92. Li, Y., Fuchimoto, D., Sudo, M., Haruta, H., Lin, QF., Takayama, T., Morita, S., Nochi, T., Suzuki, S., Sembon, S., Nakai, M., Kojima, M., Iwamoto, M., Hashimoto, M., Yoda, S., Kunimoto, S., Hiro, T., Matsumoto, T., Mitsumata, M., Sugitani, M., Saito, S., Hirayama, A. and Onishi, A. 2016. Development of human-like advanced coronary plaques in low-density lipoprotein receptor knockout pigs and justification for statin treatment before formation of atherosclerotic plaques. *J Am Heart Assoc*. **5(4)**: e002779.
93. Amuzie, C., Swart, JR., Rogers, CS., Vihtelic, T., Denham, S. and Mais, DE. 2016. A translational model for diet-related atherosclerosis: Effect of statins on hypercholesterolemia and atherosclerosis in a minipig. *Toxicol Pathol* .**44(3)**: 442–449.
94. Wierzbicki, AS. and Mikhailidis, DP. 2002. Dose-response effects of atorvastatin and simvastatin on high-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolaemic patients: a review of five comparative studies. *Int J Cardiol*. **84(1)**: 53–57.
95. Otake, M., Kawaguchi, H., Enya, S., Kangawa, A., Koga, T., Matsuo, K., Yamada, S., Rahman, MM., Miura, N., Shibata, M. and Tanimoto, A. 2021. High Pathological Reproducibility of

- Diet-induced Atherosclerosis in Microminipigs via Cloning Technology. *In Vivo*. **35(4)**: 2025–2033.
96. Huff, J W., Gilfillan, V. and Hunt, V. 1963. Effect of cholestyramine, a bile acid-binding polymer on plasma cholesterol and fecal bile acid excretion in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. **114**:352–355.
97. Burnett, J., Wilcox, L., Telford, D., Kleinstiver, S., Barrett, P., Newton, S. and Huff, M. 1997. Inhibition of HMG-CoA reductase by atorvastatin decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **17(11)**: 2589–2600.
98. Sasaki, J., Ikeda, Y., Kuribayashi, T., Kajiwara, K., Biro, S., Yamamoto, K., Ageta, M., Kobori, S., Saikawa, T., Otonari, T. and Kono, S. 2008. A 52-week, randomized, open-label, parallel-group comparison of the tolerability and effects of pitavastatin and atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol levels and glucose metabolism in Japanese patients with elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol and glucose intolerance. *Clin Ther*. **30(6)**: 1089–1101.
99. Poolsup, N., Suksomboon, N., Wongyaowarat, K., Rungkanchananon, B., Niyomrat, P. and Kongsuwan, S. 2012. Meta-analysis of the comparative efficacy and safety of pitavastatin and atorvastatin in patients with dyslipidaemia. *J Clin Pharm Ther*. **37(2)**: 166–172.
100. Yokote, K., Bujo, H., Hanaoka, H., Shinomiya, M., Mikami, K.,

- Miyashita, Y., Nishikawa, T., Kodama, T., Tada, N. and Saito, Y. 2008. Multicenter collaborative randomized parallel group comparative study of pitavastatin and atorvastatin in Japanese hypercholesterolemic patients: collaborative study on hypercholesterolemia drug intervention and their benefits for atherosclerosis prevention (CHIBA study). *Atherosclerosis*. **201(2)**: 345–352.
101. Alrasadi, K., Awan, Z., Alwaili, K., Ruel, I., Hafiane, A., Krimbou, L. and Genest, J. 2008. Comparison of treatment of severe high-density lipoprotein cholesterol deficiency in men with daily atorvastatin (20 mg) versus fenofibrate (200 mg) versus extended-release niacin (2 g). *Am J Cardiol*. **102(10)**: 1341–1347.
102. Fukui, T., Yamauchi, K., Maruyama, M., Yasuda, T., Kohno, M. and Abe, Y. 2011. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res*. **34(9)**: 1041–1045.
103. Hirata, Y., Yamamoto, E., Tokitsu, T., Fujisue, K., Kurokawa, H., Sugamura, K., Sakamoto, K., Tsujita, K., Tanaka, T., Kaikita, K., Hokimoto, S., Sugiyama, S. and Ogawa, H. 2015. The pivotal role of a novel biomarker of reactive oxygen species in chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)*. **94(25)**: e1040.
104. Hirata, Y., Yamamoto, E., Tokitsu, T., Kusaka, H., Fujisue, K.,

- Kurokawa, H., Sugamura, K., Maeda, H., Tsujita, K., Kaikita, K., Hokimoto, S., Sugiyama, S. and Ogawa, H. 2015. Reactive oxygen metabolites are closely associated with the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *J Am Heart Assoc.* **4(2)**: e001451.
105. Yagi, H., Sumino, H., Yoshida, K., Aoki, T., Tsunekawa, K., Araki, O., Kimura, T., Nara, M., Nakajima, K. and Murakami, M. 2016. Biological antioxidant potential negatively correlates with carotid artery intima-media thickness. *Int Heart J.* **57(2)**: 220–225.
106. Faienza, MF., Francavilla, R., Goffredo, R., Ventura, A., Marzano, F., Panzarino, G., Marinelli, G., Cavallo, L., and Di Bitonto, G. 2012. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm Res Paediatr.* **78(3)**: 158–164.

謝 辞

本稿を終えるにあたり、始終ご指導、ご鞭撻を承りました北里大学獣医学系研究科獣医病理学研究室の川口博明教授をはじめ、朴天鎬准教授、安藤亮講師、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学専攻腫瘍学の谷本昭英教授、株式会社新日本科学の永田良一博士、福崎好一郎博士、故和泉博之様に深甚の経緯を表します。

最後に、本研究の動物飼育管理、投与、採血、測定をはじめとする実験全般において、多大なるご協力、ご支援を頂戴しました株式会社新日本科学の各位に心から御礼申し上げます。

2024年1月4日

山田 知信