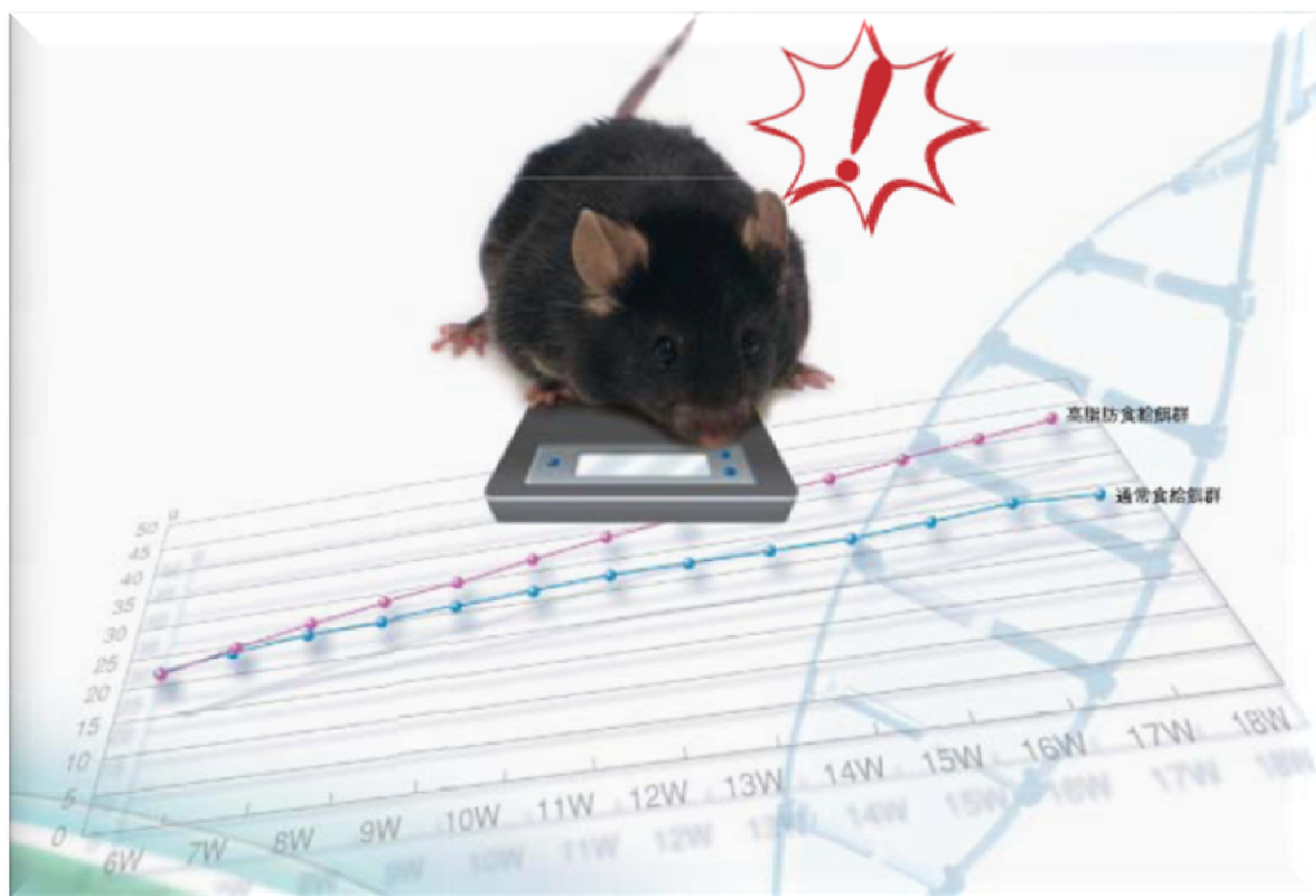


JAX® Mice Strain C57BL/6J を 使用したDIOモデル動物の 評価データ



1. はじめに

C57BL/6J マウスは食餌性肥満(Diet-Induced Obesity)モデルで最も一般的に使用される系統です。このモデルは、肥満に関する表現型の多くを発現し、ヒトに類似した代謝疾患、高脂血症、高インスリン血症、高レプチン血症を発症します。本モデルは、主に肥満、糖尿病の生理学的なメカニズムおよび遺伝子の研究に利用されます。



C57BL/6J-DIOマウス
(高脂肪食給餌)



C57BL/6Jマウス
(通常食給餌)

2. 目的

JAX® Mice Strain C57BL/6J マウスを用いた DIO の基礎的評価のため高脂肪食給餌を行い、体重、血糖値、血液生化学値および肝臓、精巣周囲脂肪組織、骨格筋における遺伝子発現量について評価した。

3. 材料および方法

【動物】

JAX® Mice Strain C57BL/6J 雄 4 週齢

【飼育環境】

- ・高脂肪食：D12492 飼料（蛋白質 20kcal%，炭水化物 20kcal%，脂質 60kcal%）
Research Diets, Inc.製
- ・通常食：標準飼料（蛋白質 22kcal%，炭水化物 62kcal%，脂質 16kcal%）
オリエンタル酵母工業株式会社製
- ・飲水：地下水を活性炭濾過，フィルター除塵後，UV 照射を行い，次亜塩素酸ナトリウム（塩素濃度 5・8ppm）を添加した水を自動給水した。
- ・摂餌条件：試験終了まで常時自由摂餌
- ・ケージ：プラスチック製 235×325×170H（mm外寸）
- ・ケージ当たりの収容匹数：6 匹
- ・床敷：ホワイトフレーク

- ・温度：20～25℃
- ・湿度：45～70%
- ・照明：6:00～18:00（明）、18:00～6:00（暗）

【評価週齢】

- ・体重：4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 および 24 週齢
- ・血糖値：4,8,12,16,20 および 24 週齢
- ・臓器重量：8,12,16,20 および 24 週齢
- ・血液検査および血液生化学検査：8,12,16,20 および 24 週齢
- ・遺伝子発現量の解析：8,12,16,20 および 24 週齢

【血糖値測定条件】

- ・測定時間：午前 9 時～午前 12 時
- ・麻酔：無麻酔下
- ・測定機器：ダイアメーター（パナソニック四国エレクトロニクス株式会社製）
- ・測定方法：尾部を 70%エタノールで消毒後、剃刀を使用して出来るだけ苦痛を与えないように傷をつけ、測定に必要な最少量の血液を得た。採血後は傷口を乾綿で押さえ止血した。

【臓器採取および重量測定】

- ・麻酔採血：イソフルランによる麻酔を用い、麻酔下で心臓より全採血を行った。
- ・採材：全採血による安楽死を施した後、開腹し精巣周囲脂肪（両側）および肝臓を採取し重量測定を行った。また、腓腹筋より骨格筋を採取した。

【検体の保存】

- ・採取した各組織は保存液 RNeasy Lysis Buffer (Qiagen 株式会社製) に浸し-20℃で保存した。また、全採血で得た血液は室温に約 40 分静置した後、3,000rpm×10 分間遠心分離し得られた血清を-30℃で保存した。

【血液検査および内分泌検査】

（測定項目：キット名）

- ・血清インスリン：マウス・ラット インスリン ELISA キット
（森永生科学研究所株式会社製）
- ・血清レプチン：マウス レプチン ELISA キット（森永生科学研究所株式会社製）

また、下記項目は、自動分析装置 AU400(オリンパス光学株式会社製)を使用し、測定を行った。

（測定項目：測定法）

- ・血清遊離脂肪酸：酵素法
- ・トリグリセライド：GPO/POD 法
- ・総コレステロール：CHOD/DAOS 法

- ・ロイシンアミノペプチダーゼ活性：L-ロイシン - p - ニトロアニリド基質法
- ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ：JSCC 対応法
- ・アラニンアミノトランスフェラーゼ：JSCC 対応法

【各遺伝子発現の評価】

- ・トータル RNA の抽出：ISOGEN（ニッポンジーン株式会社製）により抽出
- ・DNase 処理：Cloned DNase I（タカラバイオ株式会社製）により処理
- ・cDNA の合成：High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（ABI 株式会社製）により逆転写し合成
- ・定量的リアルタイム PCR：ABI Prism 7300 Sequence Detection System(ABI 株式会社製) を使用
- ・プライマー/プローブ：TaqMan Gene Expression Assays（ABI 株式会社製）を使用
(測定項目：Assay ID)
- ・leptin (*Lep*)：Mm00434759_m1
- ・peroxisome proliferator activated receptor gamma (*Pparg*)：Mm00440945_m1
- ・peroxisome proliferator activated receptor alpha (*Ppara*)：Mm00440939_m1
- ・insulin receptor substrate 2 (*Irs2*)：Mm03038438_m1
- ・18S ribosomal RNA(*18S rRNA*)：Hs99999901_s1（内部標準）

4. 評価

各測定項目の高脂肪食給餌による変化を評価した。各週齢の高脂肪食群と通常食群の差を、等分散の場合は Student の T 検定を、不等分散の場合は Aspin-Welch の T 検定を用いて評価した。

以上

結果

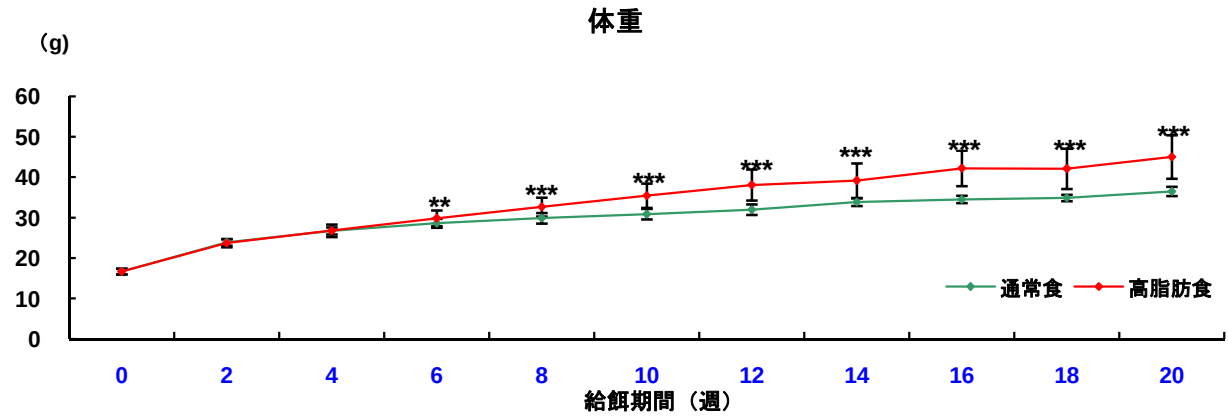


図1.体重 平均値±標準偏差

表1.体重 (単位:g)

週齢		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
給餌期間(週)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
通常食	平均値	16.7	23.9	26.7	28.6	29.9	30.9	32.0	33.9	34.5	34.9	36.5
	標準偏差	0.71	0.77	0.86	1.08	1.29	1.33	1.30	0.92	0.88	0.79	1.16
	個体数	30	30	30	24	24	18	18	12	12	6	6
高脂肪食	平均値	16.7	23.7	26.8	29.8	32.6	35.4	38.1	39.2	42.2	42.1	45.0
	標準偏差	0.68	1.04	1.51	1.95	2.35	3.00	3.84	4.28	4.36	4.99	5.40
	個体数	66	66	66	54	54	42	42	30	30	18	18
有意差検定		n.s.	n.s.	n.s.	**	***	***	***	***	***	***	***

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

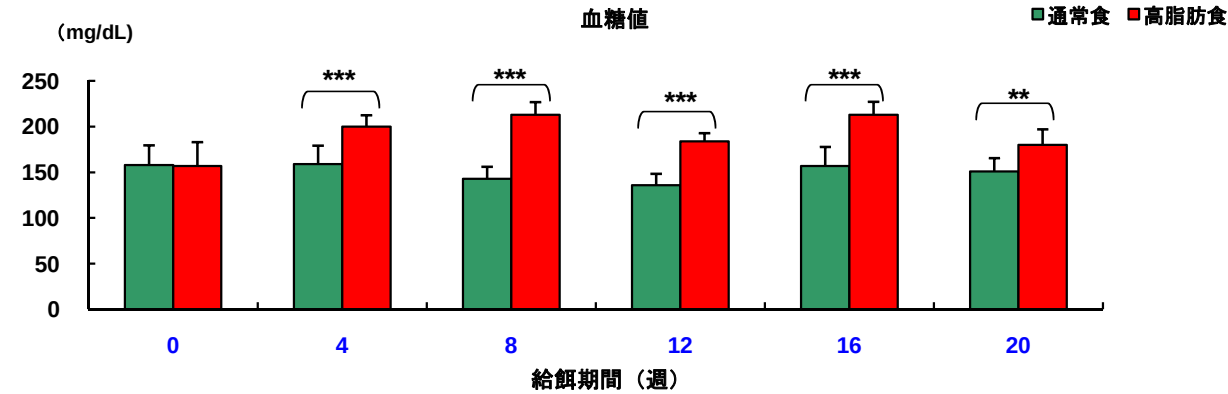


図2.血糖値 平均値±標準偏差

表2.血糖値 (単位:mg/dL)

週齢		4	8	12	16	20	24
給餌期間(週)		0	4	8	12	16	20
通常食	平均値	158	159	143	136	157	151
	標準偏差	21.7	20.3	13.3	12.4	20.9	14.7
	個体数	12	12	12	12	12	6
高脂肪食	平均値	157	200	213	184	213	180
	標準偏差	26.2	12.7	14.0	9.0	14.2	17.3
	個体数	12	12	12	12	12	12
有意差検定		n.s.	***	***	***	***	**

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

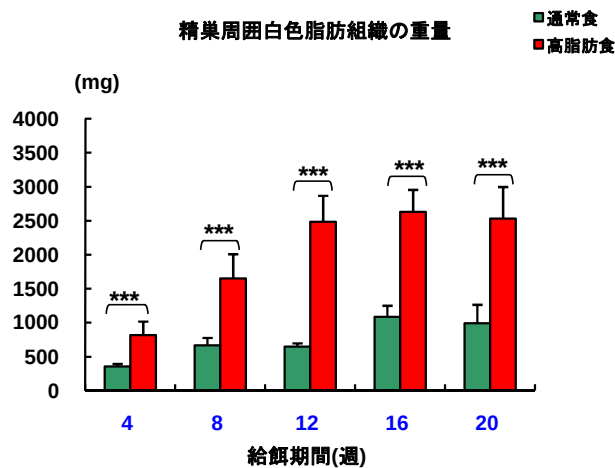


図3.精巣周囲白色脂肪組織の重量

平均値±標準偏差

表3.精巣周囲白色脂肪組織の重量 (単位:mg)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	357.9	666.1	647.9	1085.1	991.5
	標準偏差	36.29	111.06	51.23	165.50	273.5
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	818.5	1653.0	2483.2	2629.9	2532.0
	標準偏差	198.48	356.46	384.85	325.66	465.5
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	***	***	***

n.s.; not significant * : P<0.05 ** : P<0.01 *** : P<0.001

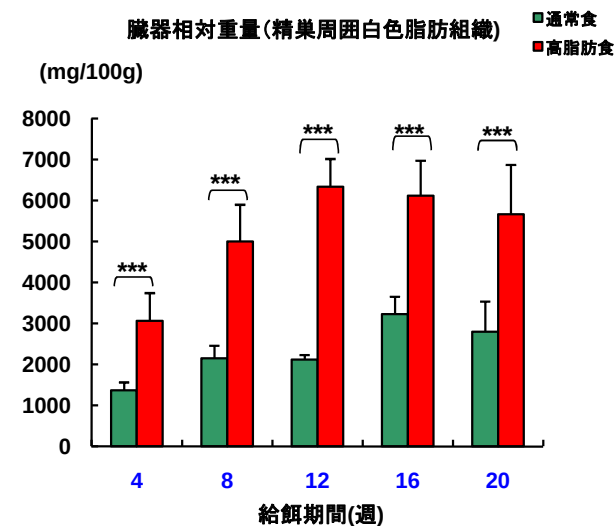


図4.臓器相対重量(精巣周囲白色脂肪組織)

平均値±標準偏差

表4.臓器相対重量(精巣周囲白色脂肪組織) (単位:mg/100g)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	1368.2	2153.0	2115.2	3224.4	2800.1
	標準偏差	196.78	303.62	115.86	426.99	734.7
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	3067.1	5001.2	6335.6	6118.2	5662.5
	標準偏差	675.31	895.69	677.52	851.94	1203.0
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	***	***	***

n.s.; not significant * : P<0.05 ** : P<0.01 *** : P<0.001

※解剖時の体重より算出

臓器(精巣周囲白色脂肪組織)外観



通常食 給餌20週後



高脂肪食 給餌20週後

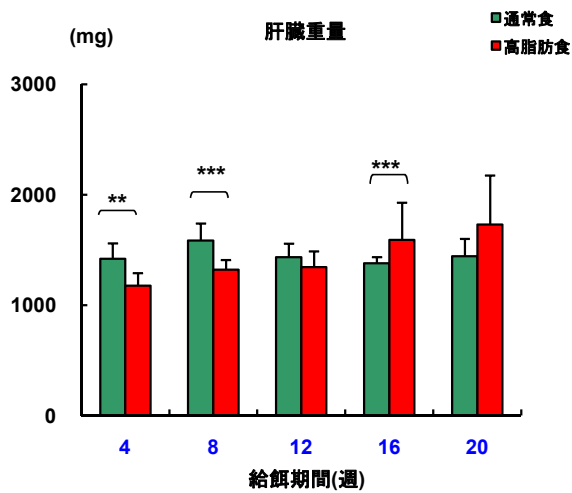


図5.肝臓重量

平均値±標準偏差

表5.肝臓重量 (単位:mg)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	1419.4	1584.9	1436.4	1380.3	1445.0
	標準偏差	142.35	156.76	122.41	56.48	156.8
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	1178.0	1322.8	1345.7	1591.0	1729.6
	標準偏差	112.28	87.16	144.10	338.32	446.8
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		**	***	n.s.	***	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 ***: P<0.01 ****: P<0.001

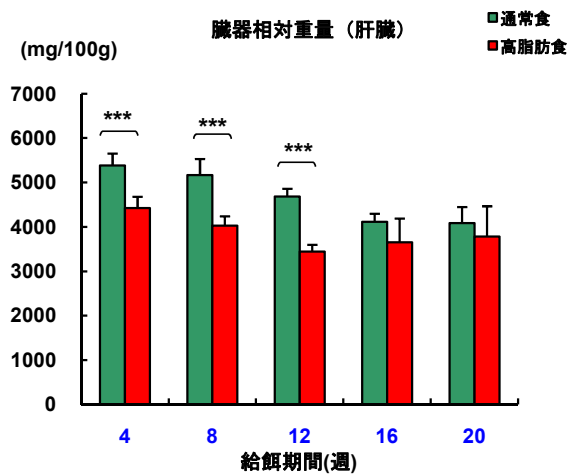


図6.臓器相対重量(肝臓)

平均値±標準偏差

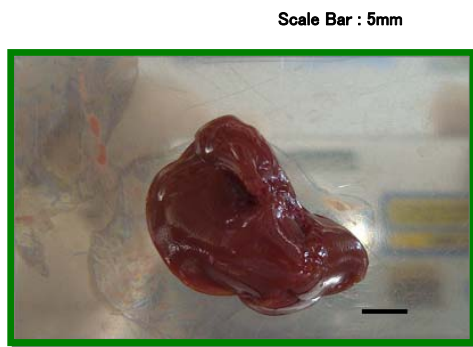
表6.臓器相対重量(肝臓) (単位:mg/100g)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	5384.3	5168.4	4684.7	4111.8	4084.8
	標準偏差	271.1	364.35	176.26	187.43	362.3
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	4424.4	4025.6	3440.6	3655.3	3783.7
	標準偏差	257.08	212.98	156.25	531.71	683.4
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	***	n.s.	n.s.

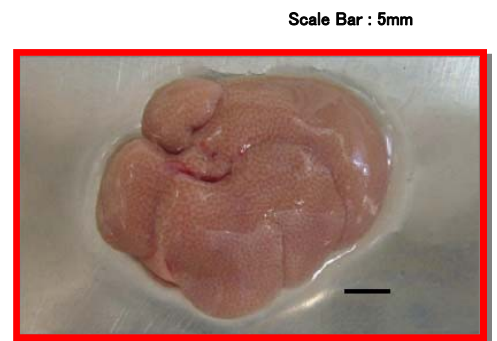
n.s.; not significant *: P<0.05 ***: P<0.01 ****: P<0.001

※解剖時の体重より算出

臓器(肝臓)外観



通常食 給餌20週後



高脂肪食 給餌20週後

※一部の個体にのみ肝臓の褐色化が観察された。

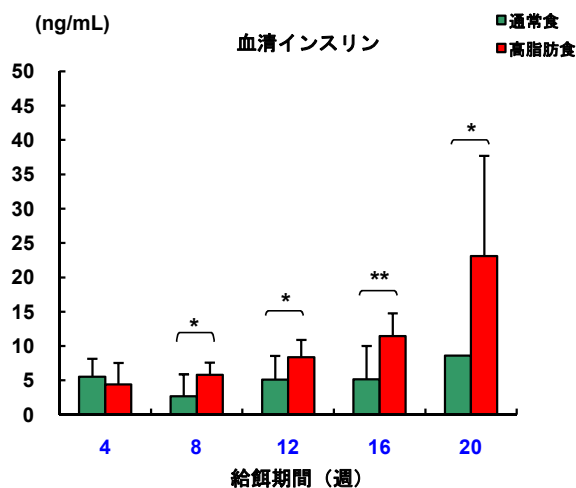


図7.血清インスリン

平均値±標準偏差

表7.血清インスリン

		(単位:ng/mL)				
週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	5.5	2.7	5.1	5.2	8.6
	標準偏差	2.63	3.22	3.46	4.86	5.48
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	4.4	5.8	8.4	11.5	23.1
	標準偏差	3.15	1.77	2.55	3.30	14.62
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		n.s.	*	*	**	*

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

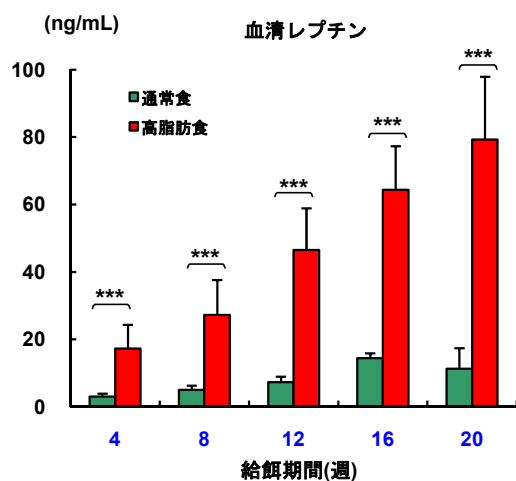


図8.血清レプチン

平均値±標準偏差

表8.血清レプチン

		(単位:ng/mL)				
週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	3.0	5.0	7.3	14.4	11.3
	標準偏差	0.89	1.26	1.68	1.52	6.09
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	17.3	27.2	46.6	64.3	79.3
	標準偏差	7.08	10.38	12.33	13.03	18.68
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	***	***	***

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

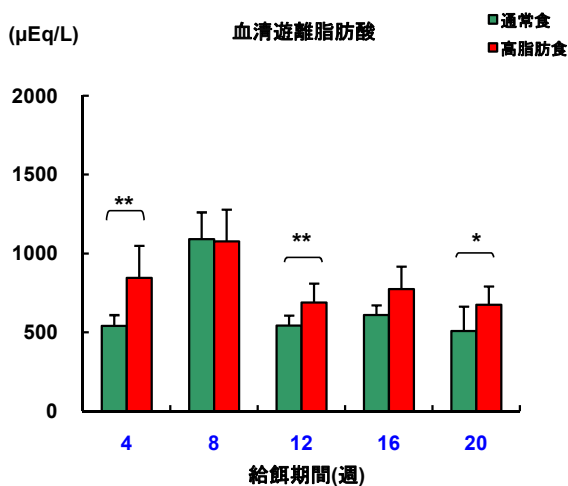


図10.血清遊離脂肪酸

平均値±標準偏差

表10.血清遊離脂肪酸

		(単位:μEq/L)				
週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	542.0	1090.5	542.7	610.2	508.5
	標準偏差	68.02	170.46	64.99	62.46	154.95
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	844.5	1076.8	688.9	774.2	674.3
	標準偏差	203.80	200.88	120.14	143.14	116.60
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		**	n.s.	**	n.s.	*

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

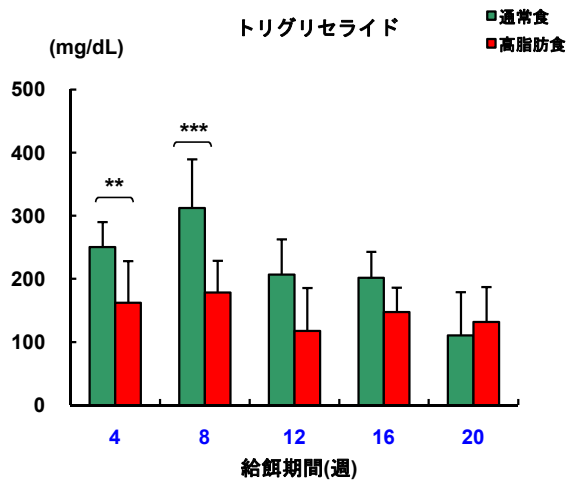


図11.トリグリセライド

平均値±標準偏差

表11.トリグリセライド (単位:mg/dL)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	250.5	312.5	206.7	201.5	110.3
	標準偏差	39.58	76.89	56.35	41.39	68.97
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	162.1	178.3	117.5	147.6	131.6
	標準偏差	66.24	50.48	68.39	38.69	55.47
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		**	***	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

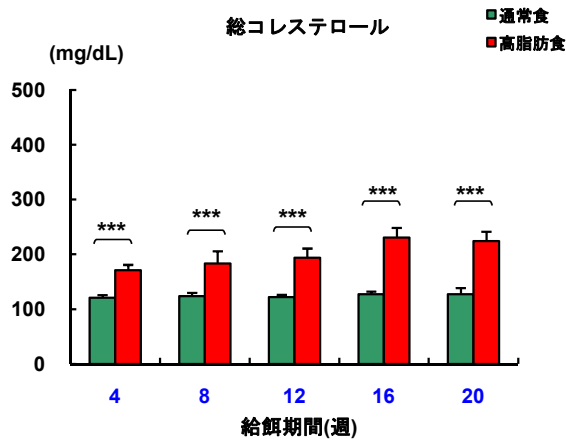


図12.総コレステロール

平均値±標準偏差

表12.総コレステロール (単位:mg/dL)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	120.7	123.8	122.0	127.2	127.2
	標準偏差	5.35	6.31	4.10	5.15	11.57
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	171.3	183.6	194.0	230.5	223.9
	標準偏差	9.72	22.08	16.75	17.70	17.37
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	***	***	***

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

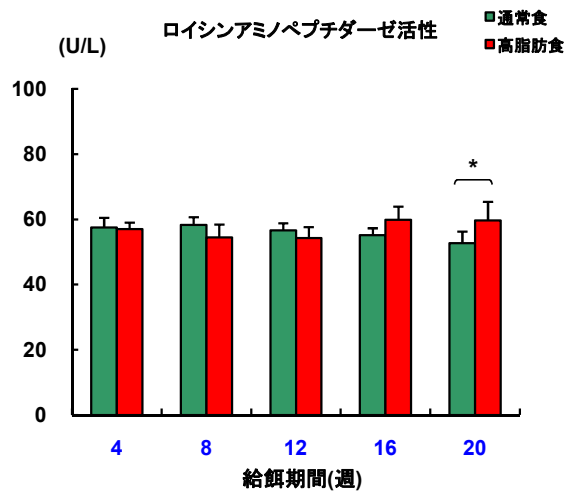


図13.ロイシンアミノペプチダーゼ活性

平均値±標準偏差

表13.ロイシンアミノペプチダーゼ活性 (単位:U/L)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	57.5	58.3	56.7	55.2	52.7
	標準偏差	3.02	2.34	2.16	2.14	3.56
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	57.0	54.5	54.3	59.8	59.7
	標準偏差	2.00	3.90	3.41	4.11	5.66
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

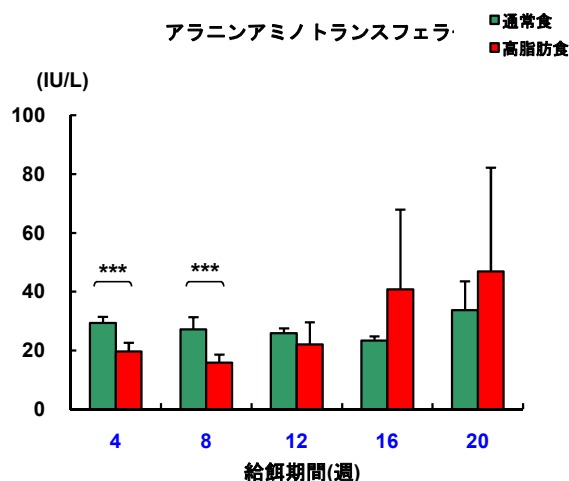


図14.アラニンアミノトランスフェラーゼ 平均値±標準偏差

表14.アラニンアミノトランスフェラーゼ (単位: IU/L)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	29.3	27.2	25.8	23.3	33.7
	標準偏差	2.16	4.26	1.72	1.51	9.87
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	19.7	15.8	22.1	40.8	46.9
	標準偏差	3.03	2.79	7.56	27.21	35.29
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		***	***	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

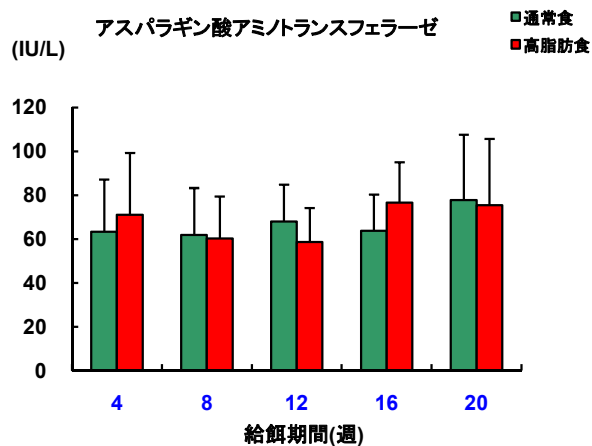


図15.アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ 平均値±標準偏差

表15.アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (単位: IU/L)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	63.3	61.8	68.0	63.8	77.8
	標準偏差	23.88	21.48	16.79	16.51	29.84
	個体数	6	6	6	6	6
高脂肪食	平均	71.0	60.3	58.7	76.7	75.5
	標準偏差	28.34	19.10	15.58	18.45	30.20
	個体数	12	12	12	12	12
有意差検定		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

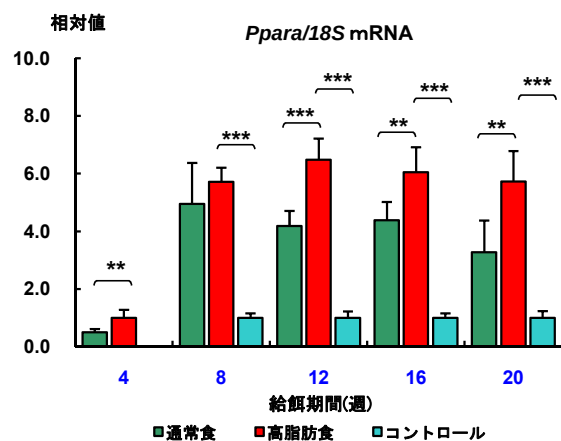


図16. 肝臓のPparaの発現 平均値±標準偏差

表16. 肝臓のPparaの発現 (相対値)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	0.50	4.94	4.19	4.38	3.27
	標準偏差	0.12	1.43	0.53	0.64	1.11
	個体数	5	5	5	5	5
高脂肪食	平均	1.00	5.72	6.48	6.04	5.73
	標準偏差	0.29	0.49	0.73	0.87	1.06
	個体数	5	5	5	5	5
コントロール	平均	-	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	-	0.17	0.23	0.17	0.24
	個体数	-	5	5	5	5
通常食 vs 高脂肪食		**	n.s.	***	***	***
高脂肪食 vs コントロール		-	***	***	***	***

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

※コントロール: 8週齢高脂肪食(4週間高脂肪食給餌)

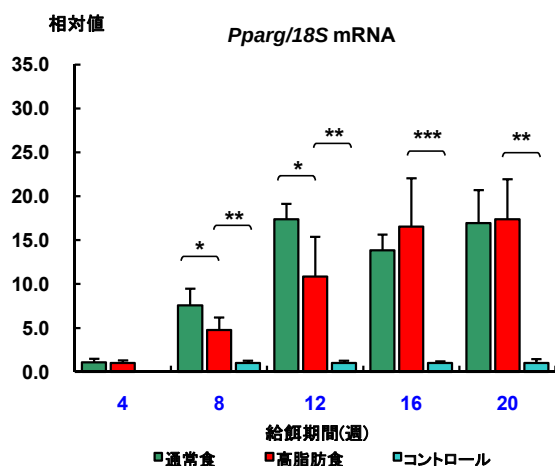


図17. 肝臓の*Pparg*の発現 平均値±標準偏差

表17. 肝臓の*Pparg*の発現 (相対値)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	1.09	7.57	17.40	13.83	16.94
	標準偏差	0.39	1.93	1.77	1.8	3.78
	個体数	5	5	5	5	5
高脂肪食	平均	1.00	4.78	10.86	16.53	17.38
	標準偏差	0.32	1.41	4.54	5.55	4.57
	個体数	5	5	5	5	5
コントロール	平均	-	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	-	0.27	0.28	0.21	0.45
	個体数	-	5	5	5	5
通常食 vs 高脂肪食		n.s.	*	*	n.s.	n.s.
高脂肪食 vs コントロール		-	**	**	***	**

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

※コントロール：8週齢高脂肪食(4週間高脂肪食給餌)

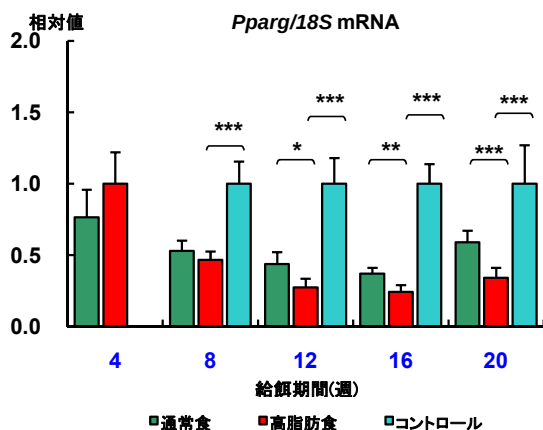


図18. 精巣周囲脂肪組織の*Pparg*の発現 平均値±標準偏差

表18. 精巣周囲脂肪組織の*Pparg*の発現 (相対値)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	0.76	0.53	0.44	0.37	0.59
	標準偏差	0.19	0.07	0.08	0.04	0.08
	個体数	5	5	5	5	5
高脂肪食	平均	1.00	0.47	0.27	0.24	0.34
	標準偏差	0.22	0.06	0.06	0.05	0.07
	個体数	5	5	5	5	5
コントロール	平均	-	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	-	0.16	0.18	0.14	0.27
	個体数	-	5	5	5	5
通常食 vs 高脂肪食		n.s.	n.s.	*	**	***
高脂肪食 vs コントロール		-	***	***	***	***

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

※コントロール：8週齢高脂肪食(4週間高脂肪食給餌)

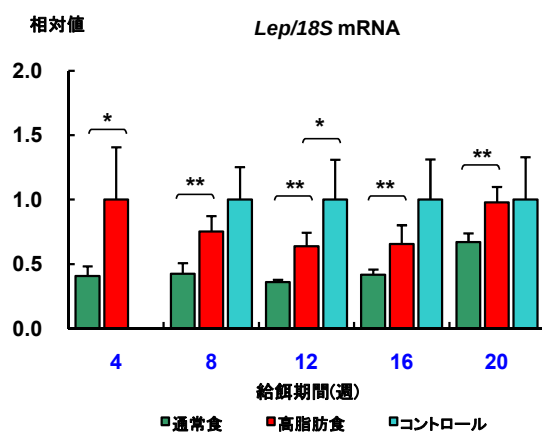


図19. 精巣周囲脂肪組織の*Lep*の発現 平均値±標準偏差

表19. 精巣周囲脂肪組織の*Lep*の発現 (相対値)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	0.41	0.42	0.36	0.42	0.67
	標準偏差	0.07	0.08	0.02	0.04	0.07
	個体数	5	5	5	5	5
高脂肪食	平均	1.00	0.75	0.64	0.66	0.98
	標準偏差	0.41	0.12	0.10	0.15	0.12
	個体数	5	5	5	5	5
コントロール	平均	-	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	-	0.25	0.31	0.31	0.33
	個体数	-	5	5	5	5
通常食 vs 高脂肪食		*	**	**	**	**
高脂肪食 vs コントロール		-	n.s.	*	n.s.	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

※コントロール：8週齢高脂肪食(4週間高脂肪食給餌)

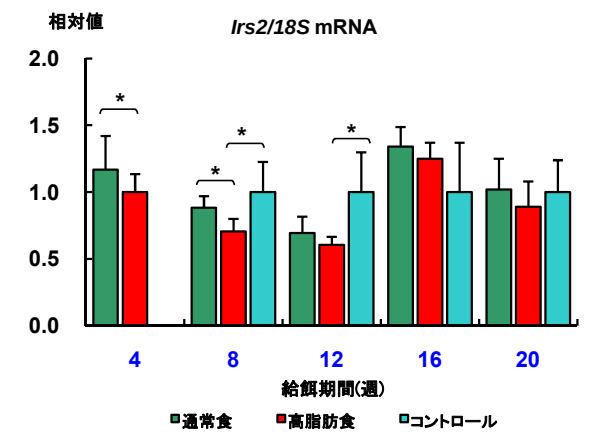


図21. 骨格筋の*Irs2*の発現 平均値±標準偏差

表21. 骨格筋の*Irs2*の発現 (相対値)

週齢		8	12	16	20	24
給餌期間(週)		4	8	12	16	20
通常食	平均	1.17	0.88	0.69	1.34	1.02
	標準偏差	0.25	0.09	0.12	0.15	0.23
	個体数	5	5	5	5	5
高脂肪食	平均	1.00	0.71	0.61	1.25	0.89
	標準偏差	0.14	0.09	0.06	0.12	0.19
	個体数	5	5	5	5	5
コントロール	平均	—	1.00	1.00	1.00	1.00
	標準偏差	—	0.23	0.30	0.37	0.24
	個体数	—	5	5	5	5
通常食 vs 高脂肪食		*	*	n.s.	n.s.	n.s.
高脂肪食 vs コントロール		—	*	*	n.s.	n.s.

n.s.; not significant *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001
 ※コントロール：8週齢高脂肪食(4週間高脂肪食給餌)