

平成 22 年度 卒業研究論文

健康補助食品が肝細胞内の  
脂肪代謝に及ぼす影響

生命工学技術科  
医薬品開発コース 2 班  
084-0009 奥園  
084-0020 木村  
084-0056 水上

# 目次

I. 序論	1
II. 目的	2
III. 材料・機器・器具・試薬	
III - i. 材料	3
III - ii. 機器	3
III - iii. 器具	3
III - iv. 試薬	4
III - v. 試薬の調製法	5
IV. 方法・操作	
IV - i. 肥満モデルマウスの作成及び投与実験	9
IV - ii. 各試料採取	10
IV - iii. 凍結切片作製	11
IV - iv. パラフィン切片作製	11
IV - v. ズダンブラック染色	11
IV - vi. ズダンⅢ染色	12
IV - vii. 脂肪滴のカウント	12
IV - viii. HE 染色	13
IV - ix. マッソン・トリクローム染色	13
IV - x. 血清検査	14
V. 結果	
V - i. 肥満マウスの体重変化、体重に対する肝臓重量及び全脂肪重量の割合	18
V - ii. 肥満マウスの肝細胞内の脂肪染色像	18
V - iii. 各投与処置後 40 日目の肝細胞内の脂肪の比較	18
V - iv. 肥満マウス及び各投与処置後の膠原線維の染色像	19
V - v. 血清中の各濃度の経時的変化及び処置後 40 日目の各指標の濃度	19
V - vi. 肝細胞内の遺伝子発現	20
VI. 考察	
VI - i. 考察	21
VI - ii. 個人考察	23
VII. 参考文献	24
VIII. 謝辞	25
IX. 図表	26
X. 和文要旨	37
XI. 英文要旨	38

## I. 序論

肥満は成人病などの重大な疾患の原因になるとして問題視されており、糖尿病ばかりか肥満における癌の発生率は大変高いものである。特に、肝臓では、肥満による肝細胞への脂肪沈着によって脂肪肝が形成され、肝細胞の傷害によって、肝線維症を経て、肝硬変となり、やがては肝臓癌に至ることが報告されている。

このような発癌リスクを解消するためには、暴飲暴食を避けるばかりでなく、脂肪代謝の改善が最も重要であるものの、遺伝的に脂質代謝が悪い体質の人達も存在する。そのため、薬物に依存しない脂質代謝の改善方法として健康補助食品による脂質代謝の改善が期待されている。しかしながら、肥満の予防あるいは解消に有効と言われる健康補助食品は、体重減少に効果的であるとするものが喧伝されているが、体脂肪のみに効果があるのか、肝細胞の脂肪代謝にも影響を及ぼすのか、その詳細は不明である。

## Ⅱ．目的

本研究では、実験的に肥満モデルマウスを作製し、肥満状態で健康補助食品であるコーゲン、魚油を投与し、これら健康補助食品が肝細胞の脂質代謝に及ぼす影響を定期的な体重測定、経時的な血中脂質濃度・血糖値の測定、そして肝細胞の脂肪沈着の変化の観察などによって検証した。

### Ⅲ. 材料

#### Ⅲ - i. 材料

7週齢雌のICRマウス（日本クレア）を30匹購入して、通常餌（ラボMRストック：日本農産工業株式会社）を与え1週間馴化させた後、卵巣を除去して更に1週間通常餌で飼育した。その後、肥満マウス作成のため、高脂肪飼料HFD-60（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由に摂取させた。いずれの場合も水は自由に摂取させた。

本実験のマウス飼育は東京医薬専門学校動物室にて行った。本動物実験は、東京医薬専門学校実験動物実験方針に則って実施した。

#### Ⅲ - ii. 機器

DISC BOY FB-4000（KURABO）、チビタン HF-120（TOMY）、VORTEX MIXER KMC-1300V（VISION）、オートクレーブ KS323（TOMY）、マイクロ冷却遠心分離機（KUBOTA 3740）、スターラー RCN-7R（EYELA）、HOT STIRRER HS-5BH（iuchi）、電子上皿天秤 FX-3000（研精工業株式会社）、精密天秤（研精工業株式会社）、光学顕微鏡 BX-50（OLYMPUS）、RECIPRO SHAKER NR-10（TATIEC）、Water Bath SB-9（EYELA）、振とう機（TAITEC RecibroShaker R-10）、ディープフリーザー REVCO ULT-1786-5JD（朝日ライフサイエンス）、ガスバーナー、ドラフトチャンバー PSM-3P（日東工業株式会社）、COLDTOME CM-41（サクラ精機株式会社）、BLOK INCUBATOR（株式会社アスティック）、DU700 SPECTROPHOTOMETER（ベックマン・コールター株式会社）

#### Ⅲ - iii. 器具

1.5 mL エッペンチューブ、15 mL 及び 50 mL 遠心チューブ、φ10 及びφ5 シャーレ（CORNING）、解剖セット（両鋭小直剪刀、片鋭片鈍直剪刀、金冠剪刀、骨剪刀、ピンセット）、虫ピン、コルク板、麻酔瓶、ビーカー（IWAKI GLASS）、メスシリンダー50 mL、100 mL、500 mL、1000 mL（IWAKI GLASS）、ニップル、ブルーチップ、イエローチップ、クリスタルチップ（ビーエム機器株式会社）、スターラーバー、スターラー、ライター、ガラスシャーレ、メディウム瓶 500 mL、1000 mL（IWAKI GLASS）、ピペットマン 10 µL 用、20 µL 用、200 µL 用、1000 µL 用（GILSON）、スライドグラス（MATSUNAMI）、カバーグラス、キャピラリーガラス管（フナコシ株式会社）、（MATSUNAMI）、パストゥールピペット（Fisher Scientific）、ユニ・カセット（SAKURA）、両刃カミソリ（フェザー）、マニキュア（株式会社ドウ・ベスト）、アルミホイル（三菱アルミ）、キムワイプ（日本製紙クレシア株式会社）、サランラップ（AsahiKASEI）、キムタオル、パラフィルム（PECHUNEY）、試験管立て、エッペンチューブ立て、薬さじ、シリンジ（TERUMO）、マウス用胃ゾンデ、注射針 27G（TERUMO）

### III - iv. 試薬

#### 使用試薬

コレステロール E テストワコー、グルコース CII テストワコー (和光純薬工業株式会社)  
トリグリセリド E テストワコー (和光純薬工業株式会社)  
ズダンブラック (和光純薬工業株式会社)、ズダンIII (和光純薬工業株式会社)  
リン酸水素二ナトリウム無水  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Sodium Phosphate, Dibasic, Anhydrous  
(和光純薬工業株式会社)  
リン酸水素二ナトリウム 12 水和物  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  Disodium hydrogenphosphate  
dodecahydrate (SIGMA-ALDRICH)  
リン酸二水素ナトリウム 2 水和物  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  Sodium dihydrogenphosphate  
dihydrate (SIGMA-ALDRICH)  
パラホルムアルデヒド Parafomaldehyde (HCHO)<sub>n</sub> (和光純薬工業株式会社)  
水酸化ナトリウム NaOH (SIGMA-ALDRICH)  
塩酸 HCl (関東化学株式会社)  
塩化ナトリウム NaCl (SIGMA-ALDRICH)  
組織培養用ダルベッコ PBS (-) (「ニッスイ」粉末)  
エタノール ethanol  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (特級、和光純薬工業株式会社)  
キシレン xylene  $\text{C}_8\text{H}_{10}$  (和光純薬工業株式会社)  
パラフィン Paraffin (和光純薬工業株式会社)  
アジ化ナトリウム Sodium Azide  $\text{NaN}_3$  (関東化学株式会社)  
スクロース Sucrose  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  (関東化学株式会社)  
グリセロール Glycerol  $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$  (SIGMA-ALDRICH Japan)  
エチルエーテル ethyl ether  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$  (昭和エーテル株式会社)  
過酸化水素水 Hydrogen Peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$  (和光純薬工業株式会社)  
ピクリン酸 Picric acid  $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$  (SIGMA-ALDRICH Japan)  
高脂肪飼料 HFD-60 (オリエンタル酵母工業株式会社)  
精製魚油 (有限会社スパット)  
コラーゲンペプチド C3SJ064 (ゼライス株式会社)  
ヘマトキシリン  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$  (diagnostica MERCK)  
硫酸アルミニウムカリウム (カリウムミョウバン)  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (関東化学株式会社)  
ヨウ素酸ナトリウム  $\text{NaIO}_3$  (キンダ化学株式会社)  
アニリン青 (関東化学株式会社)  
リンタンングステン酸 ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ )  $\cdot n\text{H}_2\text{O}$  (関東化学株式会社)

### III - v. 試薬の調製法

#### 【90%エタノール溶液の作製】

1000 mL メスシリンダーに特級エタノール 900 mL を入れ、超純水で全量が 1000 mL になるようにメスアップしメスシリンダーの口をパラフィルムで閉じて転倒混和した。その後、プラスチック容器に入れて保存した。

#### 【70%エタノール溶液の作製】

1000 mL メスシリンダーに特級エタノール 700 mL を入れ、超純水で全量が 1000 mL になるようにメスアップしメスシリンダーの口をパラフィルムで閉じて転倒混和した。その後、プラスチック容器に入れて保存した。

#### 【50%エタノール溶液の作製】

1000 mL メスシリンダーに特級エタノール 500 mL を入れ、超純水で全量が 1000 mL になるようにメスアップしメスシリンダーの口をパラフィルムで閉じて転倒混和した。その後、プラスチック容器に入れて保存した。

#### 【8%パラホルムアルデヒドの作製】

パラホルムアルデヒドを 80 g 量り、800 mL 程度の超純水を加えて、ホットスターラーを用いて加温しながら攪拌した。白濁してきたら 1 N の水酸化ナトリウム水溶液を数滴滴下し、透明になるまで完全に溶解させ、メスシリンダーに移し超純水で 1000 mL にメスアップ（ドラフト内で行う）して転倒混和した。その後、プラスチック容器に入れて 4°C で保存した。

#### 【0.2 M リン酸水素 2 ナトリウム水溶液（ストック A）の作製】

リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物を 71.6 g 量り、800 mL 程度の超純水を加えスターラーで攪拌し、完全に溶解させた。その後、超純水で 1000 mL にメスアップしてメディウム瓶に移し、オートクレーブ（121°C、15 分、以下同様に）をかけて室温に保存した。

#### 【0.2 M リン酸 2 水素ナトリウム水溶液（ストック B）の作製】

リン酸水素 2 ナトリウム 2 水和物を 31.2 g 量り、800 mL 程度の超純水を加えスターラーで攪拌し、完全に溶解させた。その後、超純水で 1000 mL にメスアップしてメディウム瓶に移し、オートクレーブをかけて室温に保存した。

#### 【0.1 M リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液の作製】

ストック A、ストック B、8%パラホルムアルデヒドをそれぞれ 4 : 1 : 5 の割合になるようにメスシリンダーで量り、4%パラホルムアルデヒド溶液としてプラスチック容器に入れ 4°C で保存した。

#### 【0.1 M リン酸緩衝液 (PB) の作製】

ストック A 400 mL、ストック B 100 mL、超純水 500 mL を混合したものをメディウム瓶に移し、オートクレーブをかけて 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) として室温で保存した。

#### 【0.05 M TBBS (90%グリセリン) 封入剤の作製】

1 M Tris-HCl を 2.5 mL、NaCl を 0.425 g それぞれ量り、超純粋を加えて全量を 5 mL になるようにメスアップした。そしてここに 45 mL のグリセリンを加えて回転機を使って攪拌した。

#### 【10×PBS の作製】

PBS (－) 粉末 96 g を三角フラスコに量り取り、超純水を 500 mL 程入れて溶解した。三角フラスコを超純水で共洗いしながら 1000 mL メスシリンダーに入れて 1000 mL にメスアップした。溶液をメディウム瓶に移し変えて、オートクレーブをかけて室温で保存した。

#### 【1×PBS の作製】

1000 mL メスシリンダーに 10×PBS (－) を 100 mL 入れ超純水で 1000 mL にメスアップした。溶液をメディウム瓶に移し変えてオートクレーブをかけて室温で保存した。

#### 【4 M GTC 溶液の作製】

ビーカーにスターラーバーを入れておき、グアニジンチオシアン酸塩を 236.3 g (最終濃度 4 M)、サルコシル 2.5 g (最終濃度 0.5%)、0.75 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0) を 16.6 mL (最終濃度 25 mM) 加え超純水を 400 mL ほど入れスターラーで溶かした。その後、メスシリンダーで 500 mL にメスアップし常温で保存した。

#### 【1%アジ化ナトリウム、20%SUC・10%Gly/PBS (－) の作製】

アジ化ナトリウム 10 g、スクロース 200 g を電子天秤で量り、グリセリン 100 mL、10×PBS (－) 100 mL をメスシリンダーで量り、それぞれをビーカーに入れて超純水を 800 mL 加えて溶解した。その後、1000 mL のメスシリンダーに移し変えて 1000 mL にメスアップして 4°C で保存した。

#### 【ズダンブラック染色液の作製】

ズダンブラックの粉末試薬を約 0.05 g 電子天秤で量り、50 mL 遠心チューブに入れ、70% エタノール 50 mL を加えキャップを閉め、60℃に設定したウォーターバスの中に入れて溶解した。この時、そのまま長時間溶解すると下にたまったズダン粉末が固形化するため、定期的に上下左右に軽く振って混和させた。その後、ロートにろ紙を乗せてズダンブラック溶液をろ過し、精製したものを実験で使用した。

#### 【ズダンⅢ染色液の作製】

ズダンⅢ粉末試薬を約 1 g 電子天秤で量り、50 mL 遠心チューブに入れ、70%エタノール 50 mL を加えキャップを閉め、60℃に設定したウォーターバスの中に入れて溶解した。このとき、そのまま長時間溶解すると下にたまったズダン粉末が固形化するため、定期的に上下左右に軽く振って混和させた。その後、ロートにろ紙を乗せてズダンⅢ溶液をろ過し、精製したものを実験で使用した。

#### 【媒染剤の作製】

10%トリクロロ酢酸水溶液 200 mL と 10%重クロム酸カリウム水溶液 200 mL をスターラーで混合したものを使用した。

#### 【2倍カラッツィの作製】

ヘマトキシリン 0.8 g を約 40 mL の水に入れ、10%アルコール溶液 4 mL を加えて溶解した。約 240 mL の水にカリウムミョウバン 20 g とヨウ素酸ナトリウム 0.16 g を加えてよく振盪させて完全に溶かし、ヘマトキシリン溶液を加えそこに超純水を加えて全量を 320 mL にしてからスターラーでよく攪拌した。その後、グリセリン 50 mL を加えて攪拌した。調製が終わった直後に使用すると染色が安定しないため、一晩置いてから使用した。

#### 【アニリン青液の作製】

アニリン青を精密天秤で約 1.6 g 量りとり、超純水 400 mL 入れた 1 L ビーカーに入れ、酢酸 24 mL を加えた後 20～30 分間ホットスターラーで攪拌しながら加温し、自然冷却後にろ過し、ろ過したものを使用した。

#### 【1%酢酸水の作製】

1 L メスシリンダーに酢酸を 10 mL 入れ、そこに超純水を入れて 1 L にメスアップした。

#### 【0.75%オレンジ G (OG) 液の作製】

OG を精密天秤で約 3 g 量りとり、超純水を 200 mL 程度入れた 500 mL ビーカーに入れてスターラーで攪拌し、完全に溶解したら 500 mL のメスシリンダーに移し、超純水で 400

mLにメスアップした。

#### 【2.5%リントングステン酸の作製】

リントングステン酸を電子天秤で約 10 g 量りとり、超純水を 200 mL 程度入れた 500 mL ビーカーに入れてスターラーで攪拌し、完全に溶解したら 500 mL のメスシリンダーに移し、超純水で 400 mL にメスアップした。

#### 【コラーゲンペプチド溶液の調製】

コラーゲンペプチドのマウス 1 匹当たり 1 日の投与量を 200 mg/kg 体重とした。クリーンベンチ内でコラーゲンペプチド 1 g を生理食塩水 17 mL で溶かし (60 mg/mL)、フィルター滅菌を用いてコラーゲンペプチド溶液を調製した。エッペンチューブに 1.5 mL ずつ分注し、約 30 日分のコラーゲンペプチド溶液を調製した。エッペンはディープフリーザーで保管し使用する時に用時解凍をした。

## IV. 方法・操作

### IV - i. 肥満モデルマウスの作製及び投与実験

#### 肥満モデルマウス作製

実験群	処置 (1 wk)	肥満処置 (8 wks)	50 g 以上を肥満とした。
7 週齢 ICR 雌マウス	卵巣除去	高脂肪食	体重の一番重い 3 匹を選出し、病理組織学的解析を行った。

- ① 7 週齢 ICR 雌マウスをピクリン酸溶液、耳カットで標識して、5 匹ずつケージに分けて 6 ケージ用意した。
- ② 30 匹全てを卵巣除去して一週間経過観察を行った。
- ③ その後肥満処置として 2 ヶ月間、30% ラードを含んだ高脂肪食を摂取させた。
- ④ 50 g 以上のマウスを肥満マウスとして、その中から一番体重の重い 3 匹のマウスを選出し、通常飼育してきたマウスと平均体重、体重における肝臓の割合、体重における全脂肪重量の割合の比較をした。
- ⑤ 他の 50 g 以上のマウスを投与実験に、50 g 未満のマウスは予備群とした。
- ⑥ 50 g 以上のマウスは投与実験を行う前に、眼窩静脈叢から採血を行った。  
尚、体重 60 g 台の群を高肥満群、体重 50 g 台の群を中肥満群とした。

#### ーコラーゲン・魚油投与実験ー

##### 高肥満群 (60 g 台) 投与処置

実験群	処置法 (10 日置きに経時的採血)
水 (対照群)	6 週間 水 0.2 mL/day 経口投与
コラーゲン①	6 週間 コラーゲン溶液 (12 mg/0.2 mL/day) 経口投与
コラーゲン②	6 週間 コラーゲン溶液 (6 mg/0.1 mL/day) 経口投与

##### 中肥満群 (50 g 台) 投与処置

実験群	処置法 (10 日置きに経時的採血)
水 (対照群)	6 週間 水 0.2 mL/day 経口投与
魚油	6 週間 精製魚油 0.3 mL/day 経口投与
コラーゲン	6 週間 コラーゲン溶液 (6 mg/0.1 mL/day) 経口投与

#### 【各処置群の実験内容】

##### ・高肥満群（60 g 台）の処置

それぞれの実験群の平均体重がほぼ同じになるように実験群を設定して、コラーゲン① 12 mg/0.2 mL/day、コラーゲン② 6 mg/0.1 mL/day、そしてその対照となる水 0.2 mL/day を 6 週間投与した。また投与期間中は、10 日置きに眼窩静脈叢から経時的に採血を行った。

##### ・中肥満群（50 g 台）の処置

それぞれの実験群の平均体重がほぼ同じになるように実験群を設定して、コラーゲン 6 mg/0.1 mL/day、魚油 0.3 mL/day そしてその対照となる水 0.2 mL/day を 6 週間投与した。また投与期間中は、10 日置きに眼窩静脈叢から経時的に採血を行った。

#### IV - ii. 各試料採取

##### 【血液採取】眼窩静脈叢採血（経時的採血）

マウスを麻酔瓶に入れてエーテル麻酔をかけ、マウスの呼吸が遅くなるのを目安に麻酔瓶からマウスを取り出し、各個体の頭部皮膚を指で掴んで眼球を露出させ、ヘマトクリット毛細管を射して軽く回して血液を 0.1 mL 程度採取し、管を抜いた。その後、眼球にキムワイプを押し当て、止血を行った。

採取した血液は、エッペンドルフチューブに移して、約 1 時間放置して、凝固して血清が分離していることを確認したら、遠心分離機にて 3000 rpm で 5 分間遠心した。血清と血餅を完全に分離させて、新しいエッペンチューブに、約 10  $\mu$ L ずつ血清を 3 等分した。これらはエッペンチューブ立てに入れた状態でフリーザーにて凍結保存した。眼窩静脈叢採血は 10 日に 1 回のペースで行い 5 日分をストックした。

##### 【全採血と各臓器、内臓脂肪・皮下脂肪の摘出と臓器の重量測定】

マウスをエーテル麻酔後、仰向けの状態で手足をビニールテープで固定し、腋窩採血にて全採血を行い失血死させた。その後、腹腔を解剖し、最初に肝臓を切除して重量を量り、肝臓の写真を撮った。そして RNA 抽出用に左葉の中央部分を切除して重量を測定し 4M GTC (3 mL) に入れてホモジナイズした。次に、酵素反応用として肝臓全体の約 1/3 を切除して、ろ紙などで水分をよく拭き取った後エッペンチューブに入れて、フリーザー内にて凍結保存した。

さらに肝臓の右葉を切除して 4 等分にトリミングし、うち 2 つは凍結切片作製用、残りの 2 つはパラフィン切片作製用として 4%PFA に入れて保存した。

また、脳の視床下部、脂肪組織からも RNA を採取するために、それぞれトリミングして 4 M GTC (3 mL 視床下部は小さいため濃度が低くなるので 2 mL) に入れてホモジナイズした。

続いて、脳、腎臓、膵臓、胃～結腸、脾臓、心臓、子宮、内臓脂肪・皮下脂肪を摘出し

て重量を測定した。この時、PBS（－）を染みこませた脱脂綿やペーパー等を用いて臓器の乾燥を防いだ。摘出した臓器はトリミングして4%PFAにて固定した。

全採血した血液は、1時間放置後、遠心分離機にて3000 rpmで5分間かけて血清の部分だけを3つのエッペンドルフチューブに分けて凍結保存した。

#### IV - iii. 凍結切片作製

4%PFAで24時間固定後、1%アジ化ナトリウム、20%SUC・10%Gly/PBS（－）に置換した。その後は、この液にて臓器を保存した。

クリオスタットマイクロトームの試料台に、ろ紙を乗せてパスツールピペットで超純水を数滴垂らし、ろ紙を凍らせその上に肝臓を乗せた。臓器の周辺をO.C.T.Compoundと超純水を1:1で割った溶液を少々垂らし、凍結させた。

切片の厚さは8  $\mu\text{m}$ として設定し、作製した切片は超純水を入れたビーカーに一時保存した後、1%アジ化ナトリウム、20%SUC・10%Gly/PBS（－）を入れた $\phi 5$ シャーレに移し保存した。

#### IV - iv. パラフィン切片作製

4%PFAで24時間固定後、0.1 Mリン酸緩衝液（PB）に1日、70%エタノールに1日、90%エタノールに1日、100%エタノールに1日、臓器を振盪させた。そして各臓器をカセットに移して、キシレンに約30分毎に3回浸し透徹を行い、60°C程度で溶かしておいたパラフィンに30分毎に3回浸した。そしてホットプレートを60~70°C程度に加熱し、アルミホイルを敷いて、その上にモルドをおいてパラフィンを流し込み、臓器を入れてカセットで蓋をした。モルドが下になるように氷の上においてパラフィンを固めた。固まったらモルドからカセットを外して、臓器の位置や深さを確認後、マイクロトームで切片の厚さが4  $\mu\text{m}$ になるようにしてパラフィン切片を作製した。

#### IV - v. ズダンブラック染色

$\phi 10$ シャーレを4枚用意し、2枚に超純水を、残り2枚に50%エタノールを適量入れた。さらに $\phi 5$ シャーレを1枚用意し、溶解したズダンブラック染色液を入れてウォーターバス内で加温した。

マイクロトームで8  $\mu\text{m}$ に切った肝臓切片を包埋用カセットに入れ、超純水1分、50%エタノール1分、ズダンブラック染色液3分、50%エタノール1分×2回、超純水1分×2回の順に通した。50%エタノール1分×2回からは、染色液を洗い流すためにカセットを軽くゆすりながら溶液を通した。

その後、肝臓切片が入ったカセットを開け、切片をパスツールピペットですくい取り、スライドガラスに乗せて切片を伸ばして、水分を拭き取った。そして0.05 M TBSS（90%グリセリン）封入剤を数滴たらしかバーガラスに乗せて封入を行った。ここで重りを乗せて

中の余分な封入剤と空気を出し、ろ紙で吸収した。その後、乾燥を防ぐためにカバーガラスの縁の部分にマニキュアを塗って固定し、顕微鏡 BX50(OLYMPUS)で観察した。

(以下同様にして封入を行った)。

#### IV - vi. ズダンⅢ染色

φ10 シャーレを4枚用意し、2枚に超純水を、残り2枚に50%エタノールを適量入れた。さらにφ5 シャーレを1枚用意し、溶解したズダンⅢ染色液を入れてウォーターバス内で加温した。

マイクロトームで8 μm に切った肝臓切片を包埋用カセットに入れ、超純水1分、50%エタノール1分、ズダンⅢ染色液20秒、50%エタノール1分×2回、超純水1分×2回の順に通した。50%エタノール1分×2回からは、染色液を洗い流すためにカセットを軽くゆすりながら溶液を通し、蛍光顕微鏡 BX50(OLYMPUS)で観察した。

#### IV - vii. 脂肪滴のカウント

パソコンを立ち上げて Adobe Photoshop 7.0 を起動させた。ファイルから、ズダンⅢで染色し蛍光顕微鏡を用いて400倍で撮影した肝臓の中心静脈付近の画像を開いた。

イメージ、モード、グレースケールで色彩をモノクロに変更後、イメージ、色調補正、明るさ・コントラストの順で操作し、脂肪滴のみを選択出来るように編集した。この際、上書き保存してしまうと元のズダンⅢの染色画像が消えてしまうため別名で保存をした。プログラムから Inspector 2.1 を起動し、ファイルからモノクロに加工した画像を開いた。View、Zoom Out、×1/4 の順で操作して画像を縮小し、カウントしやすくした。その後、Analysis、Blob、New、の順で操作し、B\_BLOBETI の画面を出した。settings の画面で Foreground を white に設定後、Segmentation に切りかえて、脂肪滴の画像と見比べながら Threshold の値を調整し、元の画像の脂肪滴の数に近くなる様に合わせた。count を押して AllRest.txt の画面を出し、表示された脂肪滴数と Num of Blobs の値を Excel に記載し、Label と Area のデータもコピーして Excel に貼り付けておき、Excel に貼り付けた Label と Area のデータを元に分析ツール内のヒストグラムを用いて各個体のヒストグラムを作成した。

#### 「光学顕微鏡での撮影」

光学顕微鏡の電源を入れ、撮影をする前に光軸を調整するため、対物レンズを×4にして光源を絞り、接眼レンズを覗きながら、レンズ越しに見える光源が正多角形になるように顕微鏡脇の絞りを調整した。

パソコンを立ち上げて DPController を起動し、パソコンの画面を見ながらピントの調整を行った。スライドガラスをセットし、切片の乗っていない部分を基準にしてホワイトバランスの調整を行った。顕微鏡での色彩や明暗がパソコンの画面と異なる場合は、顕微鏡

での色彩や明暗と同様になるようにパソコン側のレベル調整を行った。類洞が放射状に伸びている中心静脈を 5 か所選び、中心静脈を中心にして、×100、×200、×400 の画像を撮影した。

#### 「蛍光顕微鏡での撮影」

蛍光顕微鏡の電源を入れた(蛍光フィルターを WBV にして観察した)。パソコンを立ち上げて DPController を起動し、パソコンの画面を見ながらピントの調整を行った。脂肪滴を観察しやすくするためにパソコン側の明度を調整した。類洞が放射状に伸びている中心静脈を 5 か所選び、中心静脈を中心にして、×100、×200、×400 の画像を撮影した。

#### IV - viii. HE 染色

キシレン I・II に通し、脱パラフィンした。次に 100%EtOH I 及び 100%EtOH II を通してキシレンを十分に洗い落とし、90%EtOH、70%EtOH と通した後、流水中で水和した。

次に、ヘマトキシリンで 1~3 分染色後、約 15 分間流水で流して発色させた。(染色時間はあくまで目安であり、水染後、核染の状態を肉眼または顕微鏡下で観察し調整した。)

その後、70%EtOH に 30 秒通し、引き上げてからエオシン溶液で染色具合を見ながら 1 分程度染色をした。そして、脱水手順として 90%EtOH に 30 秒、100%EtOH I に 30 秒、100%EtOH II に 30 秒、最後にキシレン I・II を各 30 秒ずつ通し、マリノールを載せてカバーガラスにて封入した。

#### IV - ix. マッソン・トリクローム染色

キシレン I・II・III に通し、脱パラフィンした。その後 100%EtOH、90%EtOH、70%EtOH の順に通してから水道水を入れたバットに入れて流水中で 1~2 分間水和した。

次に超純水で 30 秒ほど洗浄し、媒染剤に 30~40 分間浸した。この 30 分の間に時々スライドを上下させるなどして染色の斑をなくした。30 分後に先程と同様に水道水で洗浄した後、超純水で洗浄した。

核を染色するために、2 倍カラッツィで 30 分間染色し、30 分後、水道水で 10~15 分洗浄した。それから、数枚あるうちのスライド 2~3 枚を顕微鏡で観察し、染色具合を確認してから、超純水の洗浄へ移った。

0.75%オレンジ G に 1~2 分間浸した。オレンジ G は 1%酢酸水での洗浄で落ちやすいため、1%酢酸水×2 で洗浄後、数枚あるうちのスライド 2~3 枚を顕微鏡で観察し、染色具合を確認した。

2.5%リタングステン酸溶液に約 8 分間浸して染色後、1%酢酸水を 2 回通して洗浄した。その後、調製したアニリン青液に約 4 分間浸し、同様に 1%酢酸水で 2 回洗浄後、全スライドを顕微鏡で観察し、染色具合を確認した。染まりが薄かった場合は、もう一度アニリン青で染色した。そして 100%EtOH×4 に 1 回ずつ浸し、キシレン I・II・III を通し

て、マリノールを載せてカバーガラス封入し、顕微鏡で観察を行った。

#### IV - x. 血清検査

##### 【血清中のトリグリセリド濃度の測定】

###### 1. 準備

始めに、緩衝液 1 瓶に発色剤 1 瓶を入れて溶解し、転倒混和したのち、冷蔵庫で保管した。次に下記のように基準液を希釈し、各濃度の調製を行った。

No	基準液	超純水	試料採取量	発色試液	濃度
1	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	100 mg/dL
2	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	200
3	原液		3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	300
4	原液		6 $\mu$ L	450 $\mu$ L	596.1*

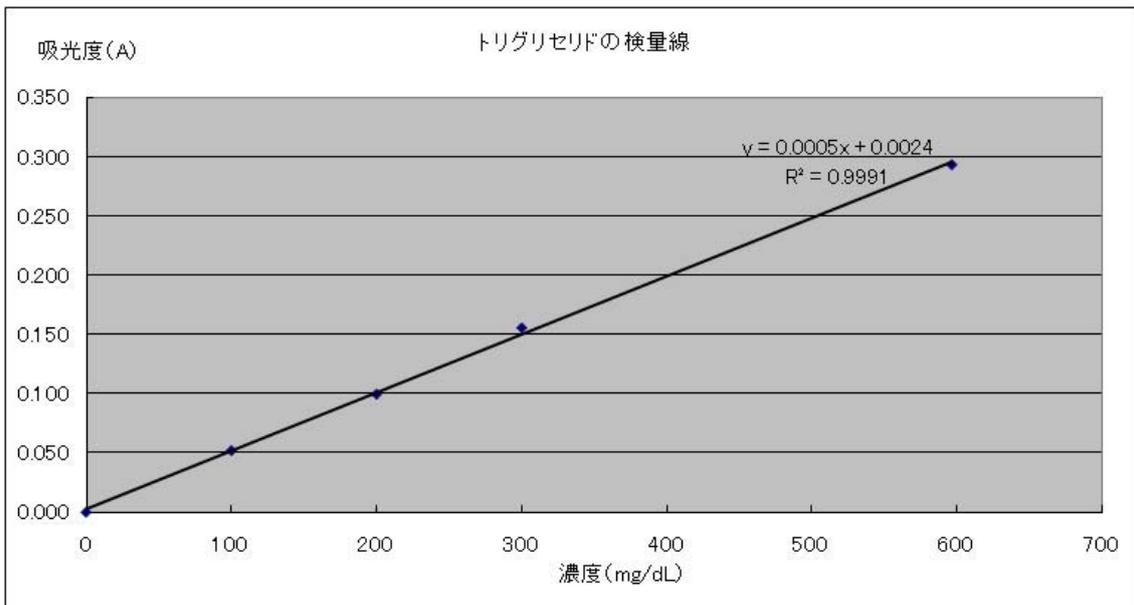
\* この場合は 6  $\mu$ L 使用し、濃度が 2 倍になるが、他と比べて 3  $\mu$ L 液量が増すので (600 mg/dL  $\cdot$  (0.453 mL/0.456 mL=596.1) と補正した。

※1 dL=100 mL

###### 2. 検量線作成

ブランクとして、エッペンチューブに 3  $\mu$ L の超純水を入れ、続いて基準液の各濃度のサンプルを 3  $\mu$ L (No. 4 だけは 6  $\mu$ L) ずつエッペンチューブに分注し、各濃度を 2 本ずつ用意した。測定は、ブランクから順に 450  $\mu$ L の発色試液を入れてボルテックスした後、スピンドウンし、恒温槽を使って 37°C で 5 分加温した。5 分後、恒温槽からエッペンを取り出して、分光光度計を用いて波長 600 nm で各濃度それぞれの吸光度を測定し、各濃度の吸光度の平均値から検量線を作成した。

(※この際、発色の誤差をなくすために、発色試液を入れる時間を 2 分間ずらした。)



### 【血清中のグルコース濃度の測定】

#### 1. 準備

始めに、緩衝液 1 瓶に発色剤 1 瓶を入れて溶解し、転倒混和したのち、冷蔵庫で保管した。次に下記のように基準液を希釈し、各濃度の調製を行った。

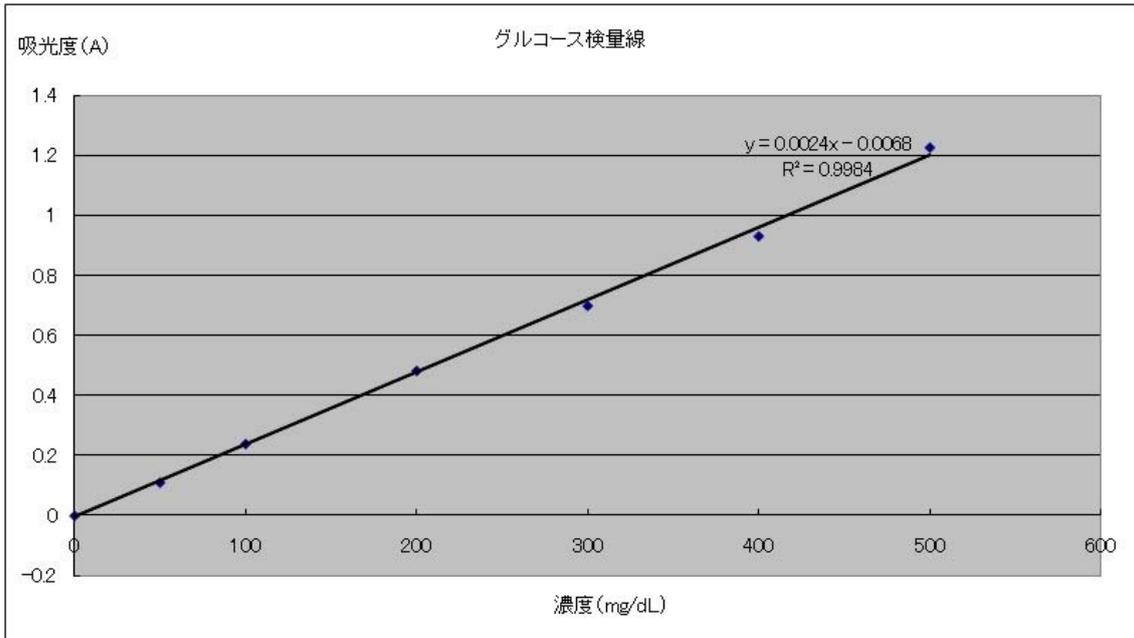
No	ブドウ糖 標準液 I	ブドウ糖 標準液 II	超純水	試料採取量	発色試液	濃度
1	25 $\mu$ L		75 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	50 mg/dL
2	50 $\mu$ L		50 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	100
3	原液			3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	200
4		75 $\mu$ L	50 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	300
5		100 $\mu$ L	25 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	400
6		原液		3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	500

#### 2. 検量線作成

ブランクとして、エッペンチューブに 3  $\mu$ L の超純水を入れ、続いて標準液の各濃度のサンプルを 3  $\mu$ L ずつエッペンチューブに分注し、各濃度を 2 本ずつ用意した。

測定は、ブランクから順に 450  $\mu$ L の発色試液を入れてボルテックスした後、スピンドウンし、恒温槽を使って 37°C で 5 分加温した。5 分後、恒温槽からエッペンを取り出して、分光光度計を用いて波長 505 nm で各濃度それぞれの吸光度を測定し、各濃度の吸光度の平均値から検量線を作成した。

(※この際、発色の誤差をなくすために、発色試液を入れる時間を 2 分間ずらした。)



### 【血清中のコレステロール濃度の測定】

#### 1. 準備

始めに、緩衝液 1 瓶に発色剤 1 瓶を入れて溶解し、転倒混和したのち、冷蔵庫で保管した。次に下記のように基準液を希釈し、各濃度の調製を行った。

No.	標準液	超純水	試料採取量	発色試液	濃度
1	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	100 mg/dL
2	原液		3 $\mu$ L	450 $\mu$ L	200
3	原液		6 $\mu$ L	450 $\mu$ L	397.4*
4	原液		9 $\mu$ L	450 $\mu$ L	592.*

\*試料の採取量は通常 3  $\mu$ L だが、この場合は 6  $\mu$ L および 9  $\mu$ L を使用した。  
そのため液量が増加するので値を補正した。

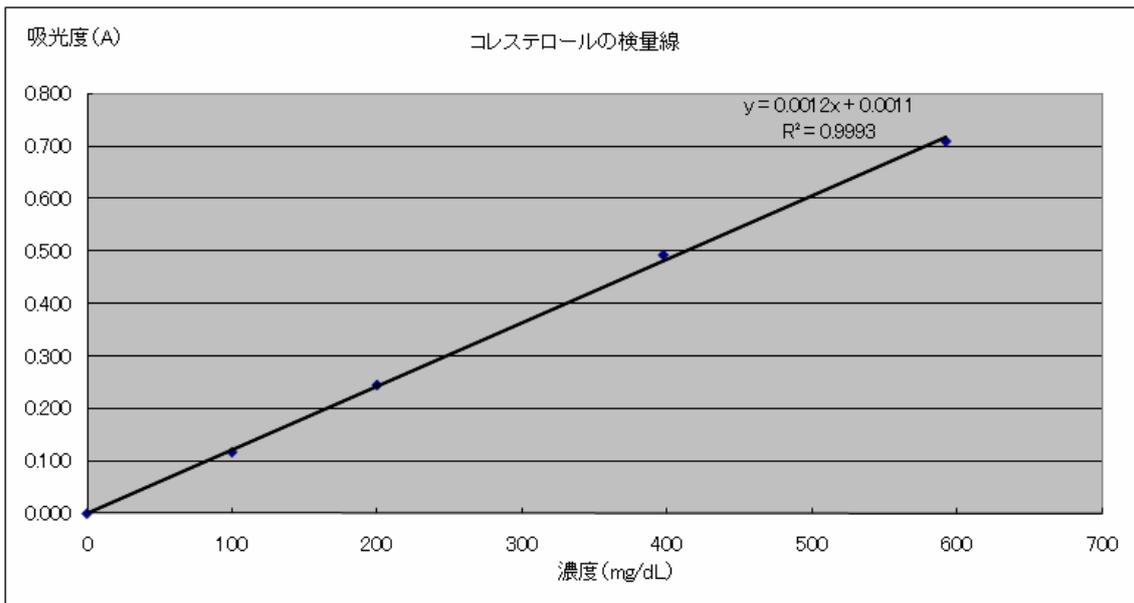
※1 dL=100 mL

#### 2. 検量線作成

ブランクとして、エッペンチューブに 3  $\mu$ L の超純水を入れ、続いて標準液の各濃度のサンプルを 3  $\mu$ L ずつエッペンチューブに分注し、各濃度を 2 本ずつ用意した。

測定は、ブランクから順に 450  $\mu$ L の発色試液を入れてボルテックスした後、スピンドウンし、恒温槽を使って 37°C で 5 分加温した。5 分後、恒温槽からエッペンを取り出して、分光光度計を用いて波長 600 nm で各濃度それぞれの吸光度を測定し、各濃度の吸光度の平均値から検量線を作成した。

(※この際、発色の誤差をなくすために、発色試液を入れる時間を 2 分間ずらした。)



### 3. 測定

それぞれ各項目の検量線を引いた後、ブランクとして、エッペンチューブに 3  $\mu$ L の超純水を入れ、次に各個体、3  $\mu$ L ずつ 3 本に血清を分注した。ブランクから順に 450  $\mu$ L の発色試液を入れてボルテックスした後、スピンドウンし、恒温槽を使って 37°C で 5 分加温した。5 分後、恒温槽からエッペンを取り出して、分光光度計を用いて吸光度を測定し、検量線を元に各サンプル血清中の濃度を測定した。

測定する時は予め、若いマウスから血清を採取しておき、測定時にはその都度、このマウスの血清濃度を測定し毎回吸光度に変化がないかを確認してからサンプルの濃度を測定した。吸光度が極端にずれる場合は、発色試液に問題がないのか、コンタミネーションなどが起こっていないかを考え、明らかに値がずれる場合は改めて検量線を引き直した。

## V. 結果

### V - i. 肥満マウスの体重変化、体重に対する肝臓重量及び全脂肪重量の割合

卵巣除去したマウスを高脂肪食飼育した結果、10日目あたりから体重が急激に増加し2ヶ月後には、30匹中25匹が50g以上となり肥満になった (Fig. 1)。その中から、体重の重い3匹を選出し、未処置でかつ普通食で飼育してきたマウスと比べたところ、体重に対する肝臓重量の割合では大きな変化は認められなかったが、平均体重ではおよそ2倍、体重に対する全脂肪重量の割合では10倍程増加していた (Fig. 2)。

その後肥満マウスを、60g台の高肥満群、50g台の中肥満群と群わけして、通常食に戻しコラーゲン、魚油、そしてその対照となる水を1ヵ月半、経口投与した結果、高肥満群では、20日目まではどの群も一斉に体重が下がり、20日以降は、コラーゲン6mg/0.1mL群、水0.2mL群、コラーゲン12mg/0.2mL群の順で体重の減少は抑えられていったが、40日目を境に、コラーゲン6mg/0.1mL群、12mg/0.2mL群において体重が上昇し、最終的に最も体重が減少したのが水0.2mL群であり、続いてコラーゲン12mg/0.2mL群、6mg/0.1mL群となった。体重に対する肝臓重量の割合ではどの群も大きな変化は認められなかったが、体重に対する全脂肪重量の割合では、水群と比べた時、コラーゲン12mg/0.2mL群ではさほど変わらなかったが、6mg/0.1mL群において増加していた (Fig. 3)。

中肥満群では、10日目までは、どの群も一斉に体重が減少したが、20日目以降、水0.2mL群では減少がとまり、魚油群、コラーゲン6mg/0.1mL群においては水群と比べて有意に減少した。体重に対する肝臓重量の割合ではどの群も大きな変化は認められなかったが、体重に対する全脂肪重量の割合では、水0.2mL群と比べてコラーゲン6mg/0.1mL群で有意な減少が認められた (Fig. 4)。

### V - ii. 肥満マウスの肝細胞内の脂肪染色像

HE染色において、未処置でかつ普通食で飼育してきたマウス (以下、対照群) では、肝実質細胞が良く染まっていたが、肥満群の肝臓では、肝細胞が大きくなり、細胞質が白く抜けていた。また、脂肪滴を観察するために、肝臓の凍結切片をズダンブラック染色すると、対照群では僅かな数の脂肪滴を観察できるのみだったが、肥満群では、細胞質いっぱいには大小様々な大きさの脂肪滴が無数に観察できた (Fig. 5)。

### V - iii. 各投与処置後40日目の肝細胞内の脂肪の比較

処置後40日目の肝細胞内の脂肪蓄積具合をズダンブラック染色によって観察した結果、肥満時と比べると高肥満群、中肥満群のどの群においても脂肪滴は減少していたが、両群共に水群では大きさの異なる様々な脂肪滴が観察できた。しかし、水群と比べた時に、コラーゲン群、魚油群では、脂肪滴数は減少し、また、残留している脂肪滴も小型なものが殆どであった (Fig. 6, 7)。

そして、実際に水投与群と比べて、コラーゲン群、魚油群の脂肪敵数が減少しているかを確かめるため、肝臓の凍結切片をズダンⅢ染色し、蛍光顕微鏡で観察後、画像をモノクロ化して脂肪滴数を統計的に比較解析した。肥満群では、かなり多くの脂肪滴がカウントできたが、水群、コラーゲン群、魚油群では脂肪滴が減少していた。

水群に比べて、高肥満群ではコラーゲン投与量が多くなるにつれて、脂肪滴が減少していた (Fig. 8)。中肥満群では、コラーゲン群、魚油群で有意に脂肪滴数が減少していた (Fig. 9)。

#### V - iv. 肥満マウス及び各投与処置後の膠原線維の染色像

グリッソン鞘内の結合組織を観察した結果、肥満時では、未処置でかつ普通食で飼育してきたマウスと比べて、結合組織の量が極めて少なかった。しかし、各投与処置後のマウスでは、全群、結合組織の量が肥満時と比べて増加しており、未処置でかつ普通食で飼育してきたマウスと同等にまで増加していた。その中でもコラーゲン 12 mg 群が、際立って増加していた (Fig. 10-12)。

#### V - v. 血清中の各濃度の経時的変化及び処置後 40 日目の各指標の濃度

高肥満群の血清中の各濃度の経時的変化を調べた結果、トリグリセリド濃度では、水群に際立った変化はなかったが、30 日目でコラーゲン 6 mg 群が、20 日目でコラーゲン 12 mg 群が一気に上昇し、その後下降する傾向にあった。グルコース濃度では、10 日目に全群、下降し、40 日目まで一定を保つが、その後全群上昇に転じた。コレステロール濃度では 10 日目に全群が一気に下降し、30 日目までは全群、上昇したが、その後下降する傾向にあった (Fig. 13)。

処置後 40 日目の各指標の濃度を算出した結果、肥満時と比較した時にトリグリセリド濃度では、全群上昇し、グルコース濃度では、大きな変化なく、コレステロール濃度では減少していた。しかし、水群、コラーゲン 6mg 群、12mg 群と比べてみると、各濃度において有意な変化は認められなかった (Fig. 14)。

中肥満群の血清中の各濃度の経時的変化を調べた結果、トリグリセリド濃度では、10 日目で魚油群が一気に上昇し、コラーゲン群では 20 日目まで徐々に上がり、その後、両群共に下降する傾向にあった。グルコース濃度では、全群、20 日目に下降するが、20 日目以降は、上昇に転じ、水投与群と比べて、魚油群、コラーゲン群にて濃度上昇が抑制されていた。コレステロール濃度では、10 日目まで一気に下降したが、魚油群ではその後一定を保ち、コラーゲン群、水投与群において上昇傾向が認められた (Fig. 15)。

処置後 40 日目の各指標の濃度を算出した結果、投与前と比べると水群、コラーゲン群、魚油群で濃度は低下していたが、水群、魚油群、コラーゲン群で比べてみると、トリグリセリド濃度及びコレステロール濃度では、有意な変化は認められなかった。

一方、グルコース濃度では、魚油群、コラーゲン群において、有意に低下しており、血

糖値の上昇を抑制する効果が認められた (Fig. 16)。

#### V - vi. 肝細胞内の遺伝子発現

肥満時及び処置後 40 日目の高肥満群の水群、中肥満群の水群をそれぞれ未処置でかつ普通食で飼育してきたマウスと比較したところ、Srebf1、Acox1、Crot、Ppargc11、Cpt1a、Acadm、Hadha、Ppara、Adipor2 のこれらの遺伝子では大きな変化が認められなかったが、脂肪合成関連遺伝子である Acaca は、肥満時、高肥満群の水群、中肥満の水群において、顕著に発現が上昇していた。一方、脂肪分解関連遺伝子である Cpt1a は、肥満時では発現の上昇がみられたが、高肥満群の水群及び中肥満群の水群では、発現に差がみられなかった (Fig. 17)。

処置後 40 日目の高肥満群のコラーゲン 6 mg 群、12 mg 群における遺伝子発現を対水群比として比較したところ、コラーゲン 12 mg 群で Crot の発現上昇が認められたが、これ以外は、大きな変化は認められなかった (Fig. 18)。

処置後 40 日目の中肥満群のコラーゲン群、魚油群における遺伝子発現を対水群比として比較したところ、コラーゲン群で Crot の発現が顕著に上昇していた。一方、魚油群では、Cpt1a、Acadm 及び Hadha で発現の上昇が認められた (Fig. 19)。

## VI. 考察

### VI - i. 考察

今回、卵巣除去したマウスに高脂肪食を 2 ヶ月間、摂取させて肥満マウスにした。その後、健康補助食品であるコラーゲンや魚油、肝細胞内の脂肪代謝にどのような効果をもたらすのか、ということ調べるために、肝細胞内の脂肪の比較、血清中の脂質、糖質の濃度の測定、また肝臓でこれらの代謝を促す肥満関連遺伝子の解析を行った。

本来、雌マウスは雄マウスと比べて太りにくいとされているが、今回卵巣除去を行うことで卵巣から分泌されるエストロゲン、プロゲステロン等のホルモンの影響を排除し、雄と同等にまで太らせることが可能となった。エストロゲン、プロゲステロンの 2 つのホルモンは、脂質代謝の制御以外にも、インスリンに作用し血糖値の正常の維持、体脂肪の減少、LDL の減少と VLDL・HDL の増加による動脈硬化抑制などにも関わっている<sup>ii)</sup>。今回は、この卵巣除去という影響を踏まえた上で考察していく。

肥満マウスは、未処置でかつ普通食飼育のマウスと比べて、脂肪合成遺伝子である *Acaca* が顕著に発現上昇しており、これは、肥満によって発現の上昇が誘導されて、結果的に肝臓や、脂肪組織に中性脂肪の取り込みが促進され、肥満になったと考えられる。一方で、脂肪分解遺伝子である *Cpt1a* も発現が上昇したが、脂肪分解遺伝子と比べて脂肪合成遺伝子の方が発現の上昇がはるかに高かったため、脂肪分解がうまく機能しなかったことが要因であると考えられる。

高肥満群の処置後 40 日目の肝細胞内の脂肪を比較したところ、水群と比べてコラーゲン 6 mg 群、コラーゲン 12 mg で顕著に減少していた。コラーゲンは、細胞の働きを活性化させる様々な生理的活性があり、その他にも損傷した繊維芽細胞を刺激し再生を促進されることが知られている。本実験においても、コラーゲン 12 mg 群で脂肪分解遺伝子である *Crot* の発現量が水群と比べて約 1.5 倍上昇しており、コラーゲンによって脂肪の分解が促進されたと考える。また、肥満時では、グリッソン鞘、細胞間の結合組織が乏しかったのに対して、コラーゲン 6 mg 群、12 mg 群では結合組織が未処置でかつ普通食飼育のマウス以上に再生され結合組織の量が増加していた。このことから、コラーゲンは肝細胞に直接作用し、細胞質、細胞内小器官の生理的活性を促し、脂肪の代謝を促進すると推察した。

中肥満群の処置後 40 日目の肝細胞内の脂肪を比較したところ、水群と比べてコラーゲン群、魚油群で有意に減少していた。魚油は、EPA、DHA などの n-3 系の不飽和脂肪酸が含まれており、これらは、脂肪合成酵素の働きを抑制する効果、血液中の中性脂肪を減らす効果、血液中の総コレステロールの低下、動脈硬化を防ぐ効果があると知られている。本実験においても、魚油群は脂肪合成遺伝子である *Srebf1*、*Acaca* は水群より発現量が抑えられ、脂肪分解遺伝子である、*Cpt1a*、*Acadm* 及び、*Hadha* の発現量は水群と比べて、それぞれ、約 1.2 倍、1.3 倍、1.2 倍上昇しており、魚油の効果によって中性脂肪が減少したと考える。

血清中の脂質、糖質の濃度を経時的に測定したところ、高肥満群、中肥満群共にトリグリセリド濃度では、水群を除いて、徐々に上昇し、下降する傾向にあった。今回、残念ながら遺伝子の発現量は経時的に見ることができなかつたので、遺伝子と関連付けて言うことはできないが、コラーゲン、魚油は肝細胞内の脂肪分解を促進したことにより、それによって合成された中性脂肪が一気に血流に放出されたと考える。グルコース濃度は本来、マウスにおいて、そう変化しないと言われている。しかし、今回は卵巣除去を行っていること、測定前に絶食ではなかつたことも関係してか、全群、徐々に下降し、その後上昇に転ずるというアンバランスな結果となった。高肥満群においては、最終的に全群ほぼ変わらないグルコース濃度となったが、中肥満群において水群と比べて、コラーゲン群、魚油群で血糖値の上昇を抑制する効果が明らかとなった。卵巣除去しているのにもかかわらず、コラーゲン、魚油は血糖値の上昇を抑制する効果が見られたので、卵巣除去を行っていないマウスを高肥満、中肥満にして検証する必要があるだろう。コレステロール濃度では、魚油群において、血液中の総コレステロールを低下するという効果が顕著に現れ、最初に一気に下降し、その後少し上昇するがそれ以降は一定を保った。高肥満群、中肥満群の水群、コラーゲン群も魚油同様に最初に一気に下降し、その後上昇するが、魚油と比べて上昇が高かつた。

血清検査に関しては、高肥満群のコラーゲン 6 mg 群、中肥満群のコラーゲン 6 mg 群でトリグリセリド濃度、コレステロール濃度に関しては同じような作用をもたらしたが、グルコース濃度に関しては違っていた。同じ肥満でも、体重の違い、ケージ内の環境の違い、技術者の腕の違いによっても効き目の早い遅い、良い悪いが若干変わってくるのではないかと考える。

先程も述べたように、今回は遺伝子発現の経時的変化は調べることはできなかつた。よって今回の遺伝子発現の結果は、処置後 40 日目のものであり、既に遺伝子が活発に発現の上昇、下降をしている時のピークを過ぎたものとなっている。もう少し早い段階で、遺伝子の発現を調べることで、コラーゲン、魚油が肝細胞内の脂肪代謝にもたらす影響をより詳しく観察できるであろう。次回、また同じような実験をする機会があるのならば、是非その点に注目して実験を行って行きたい。

## VI - ii. 個人考察

### 奥園 友季

肥満は、放っておくと脂肪肝になる可能性が高く、肥満が進行すると肝臓がんに至ることもあると聞いて、恐ろしいと思ったが、最初は肥満と肝臓がどう結びつくのかがよく分からなかった。それは自分が肝臓という臓器のことを全く知らずにいたからである。卒業研究が始まり、次第に肝臓の勉強をしていくと、肝臓という臓器は口から入れた食べ物の栄養素が集まってきて、代謝や貯蔵やエネルギー産生を頻繁に行う臓器だということが分かった。肝臓の構造や機能を理解することで、この実験もただやっているのだけではなくてどのように健康補助食品が肝臓に作用して脂肪が減少しているのかということを理解できた。これからも肝臓については深く勉強し、社会人になってからも肝臓における様々な研究をしていけたらと思う。

### 木村 雄太

今回の卒業研究で、自分たちは脂質代謝について調べてきました。この卒業研究は去年からの引継ぎであるため、新たな実験群を用意しているものの、初めのころは去年の作業内容をなぞるような流れでした。しかし、去年の先輩方によりすでに確立されている作業をもう一度見直し、自分たちなりにより良い方法を検討し改善することや、新たな作業内容を追加することにより、去年とは異なる自分たちの実験となっていきました。新しい作業内容が増えた分、手探りで模索していく必要がありましたが、それぞれの結果からより多面的な考察を立てることができました。

### 水上 亮

卒業研究の課題が提示されたときに、直感で「これをやってみたい」と思ったのがこの2班での脂肪代謝に関するものでした。このテーマの根本自体は去年の先輩方が培ってきたものでしたが、それをベースにして新たなプロセスの構築、実験群の見直しなどを行っていくうちに、去年とはまた違う自分たち独自の実験となってゆきました。これが良いか悪いかといえばもちろん良いと言わざるを得ないのですが、逆に去年無かったプロセスを追加すると先輩方の実習書が参考にならないため、自分たちで模索する段階から始めないといけませんでした。それ故に失敗の回数も大きく、時には先生方に迷惑をかけてしまうようなことも多々あった気がしなくもありません。しかしながら、その先生方のアシストがあったからこそ、2班はここまでたどり着くことが出来たのだと思います。

## VII. 参考文献

- i) 中野昭一 編集 「ヒトのからだ」(2008年)
- ii) アン・ウォー アリソン・グラント 著 「解剖生理学」(2008年)
- iii) 田村隆明・村松正實 著 「基礎分子生物学」(2009年)

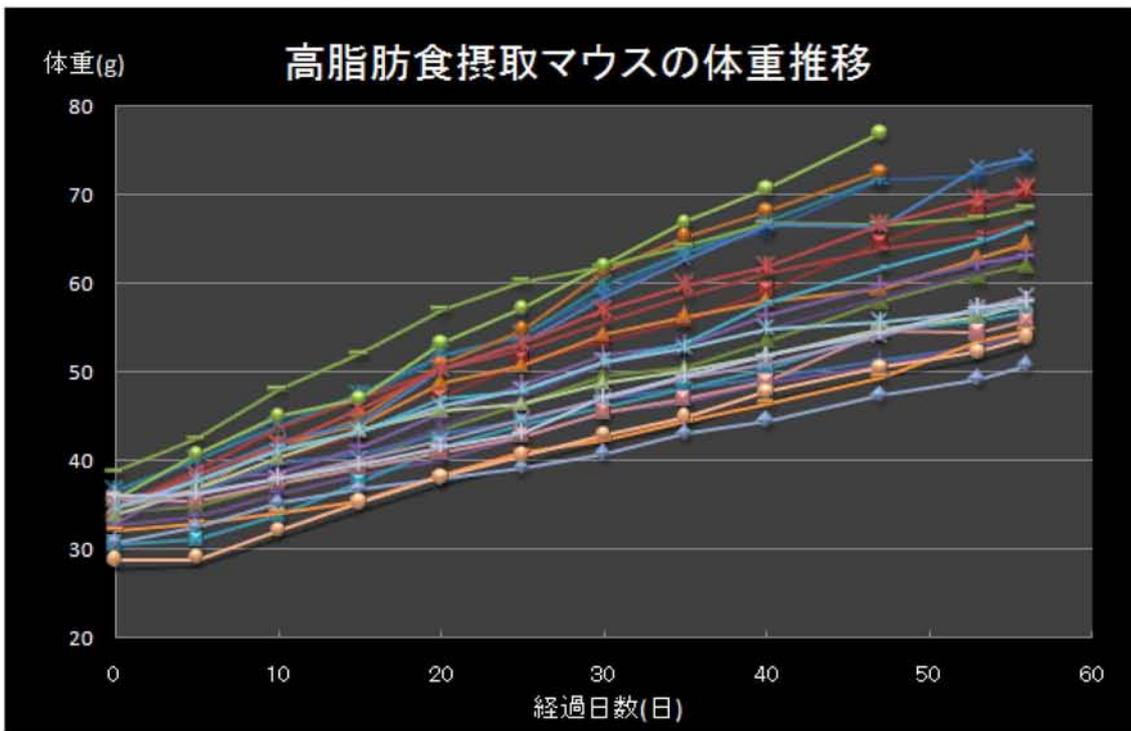
## VIII. 謝辞

本研究におきまして、日下部守昭先生、橋本尚詞先生、河邊友範先生、Jorge E.Zavaleta-Ahane 先生、ご指導ご鞭撻厚く御礼申し上げます。

また、東京医薬専門学校医薬品開発コースの矢ノ倉絵美子さんと横溝朋美さんが、内研2班の遺伝子解析に参加して頂き遺伝子発現解析を行って頂いたことに感謝致します。

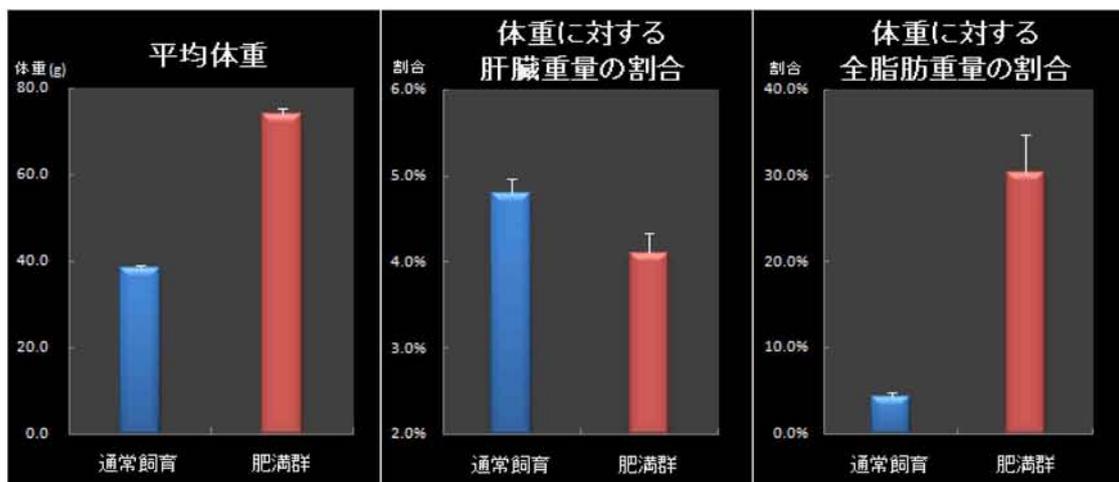
## IX. 図表

Fig. 1 高脂肪食摂取開始からの体重推移



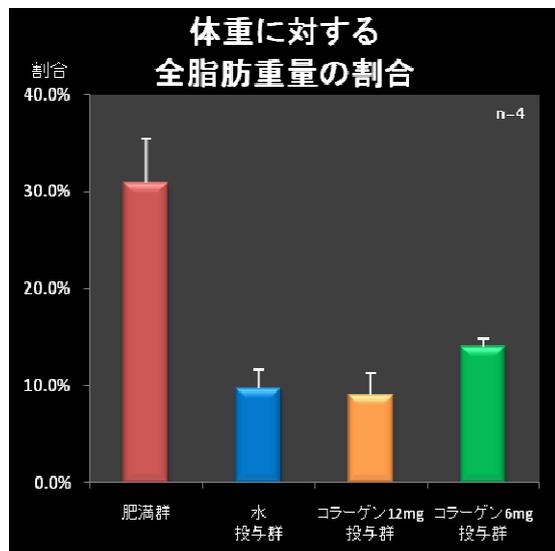
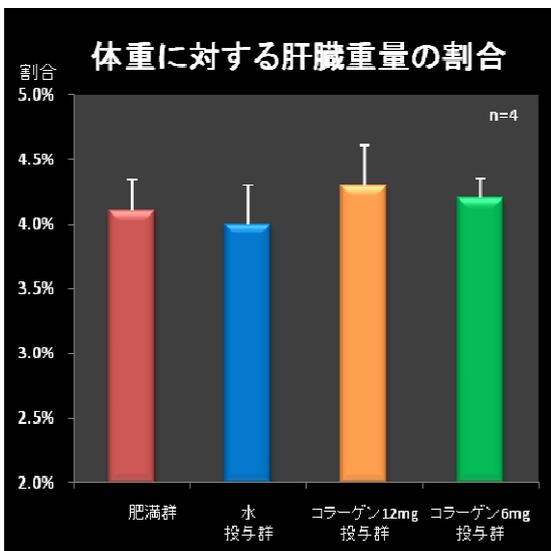
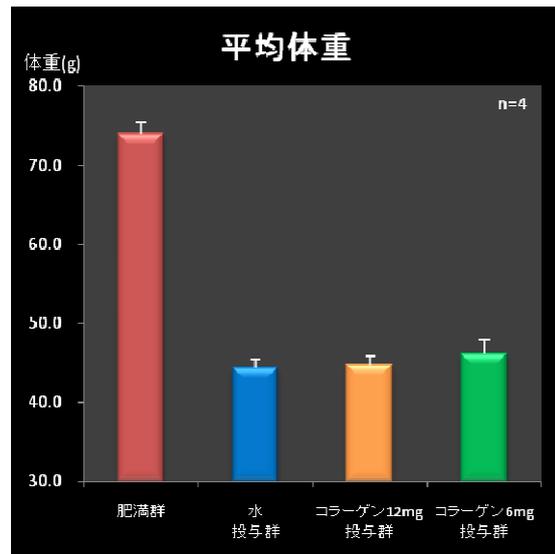
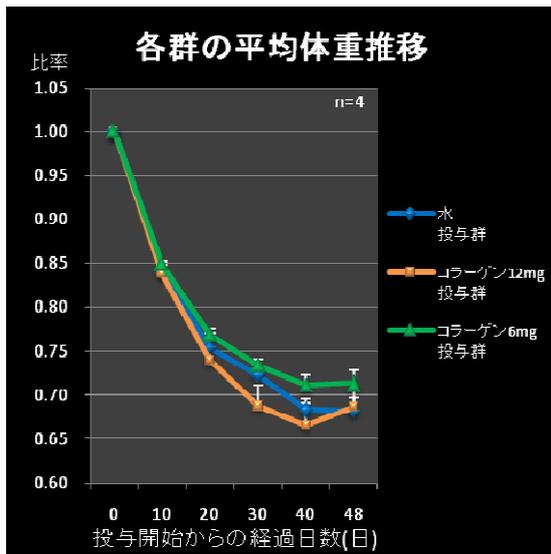
卵巣除去を行ってから高脂肪食を2か月間摂取させた結果、30匹中25匹が50g以上の肥満となった。

Fig. 2 肥満マウスと通常飼育マウスの比較



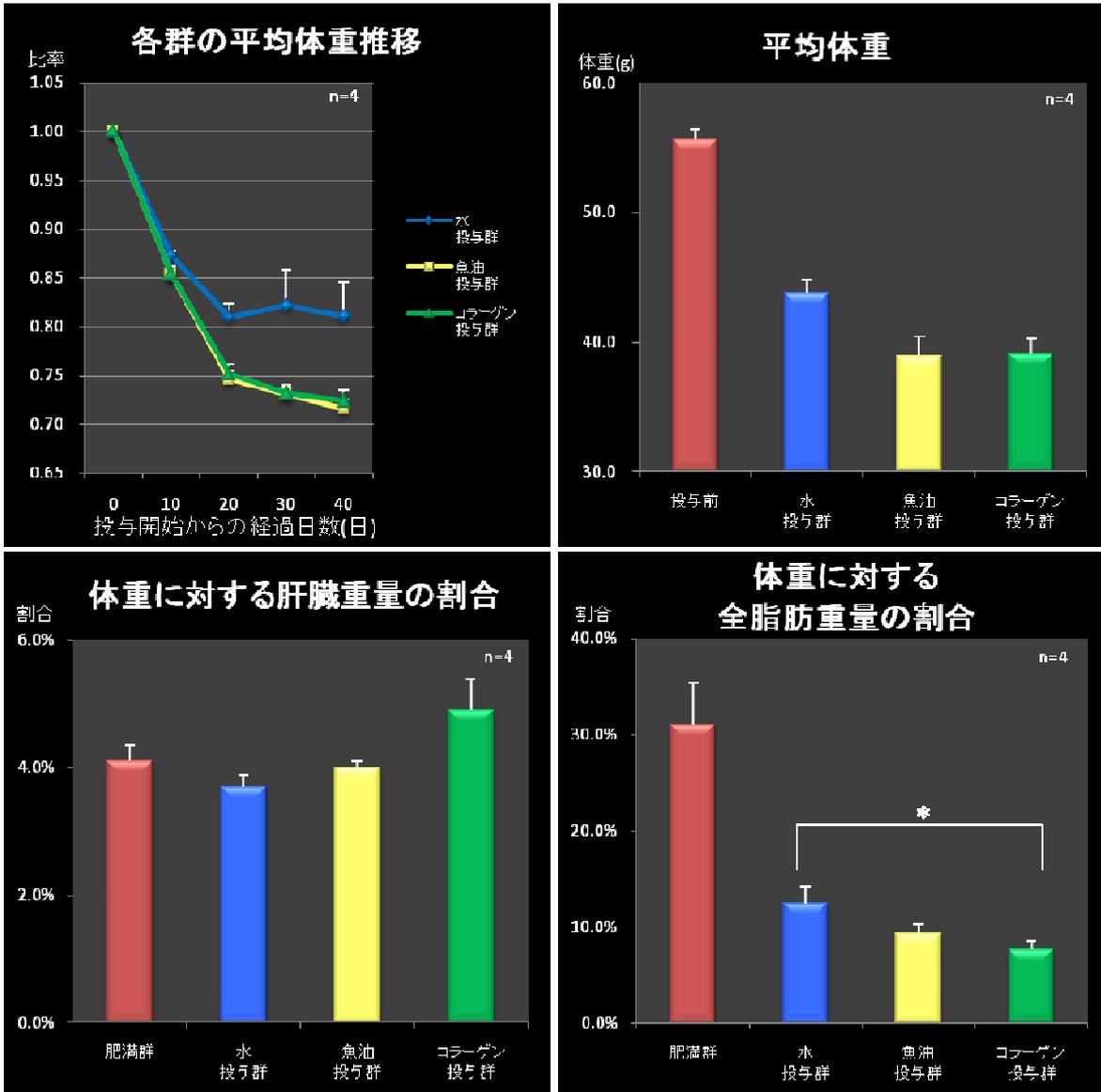
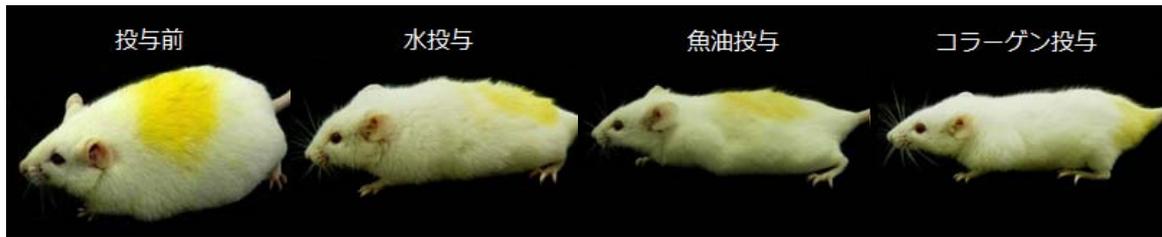
肥満マウスでは平均体重、体重に対する全脂肪重量の割合が顕著に増加していた。

Fig. 3 高肥満群のコラーゲン投与結果



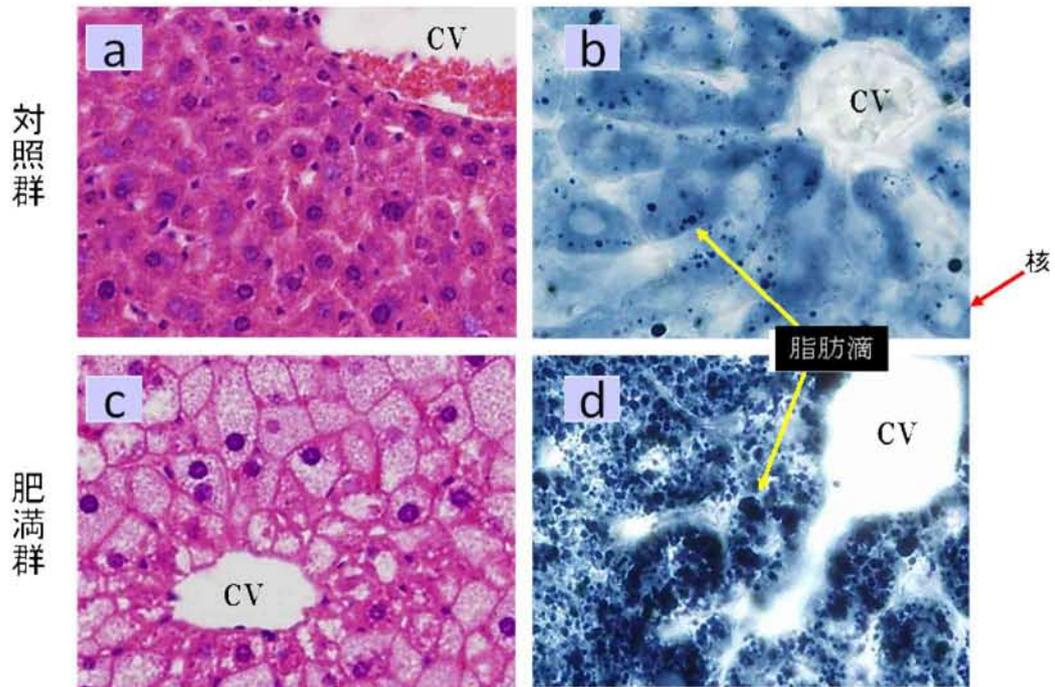
コラーゲンを投与した結果、水投与群と比較して、体重、全脂肪重量はコラーゲン 12 mg ではあまり差は見られなかったが、コラーゲン 6 mg では増加していた。

Fig. 4 中肥満群のコラーゲン、魚油の投与結果



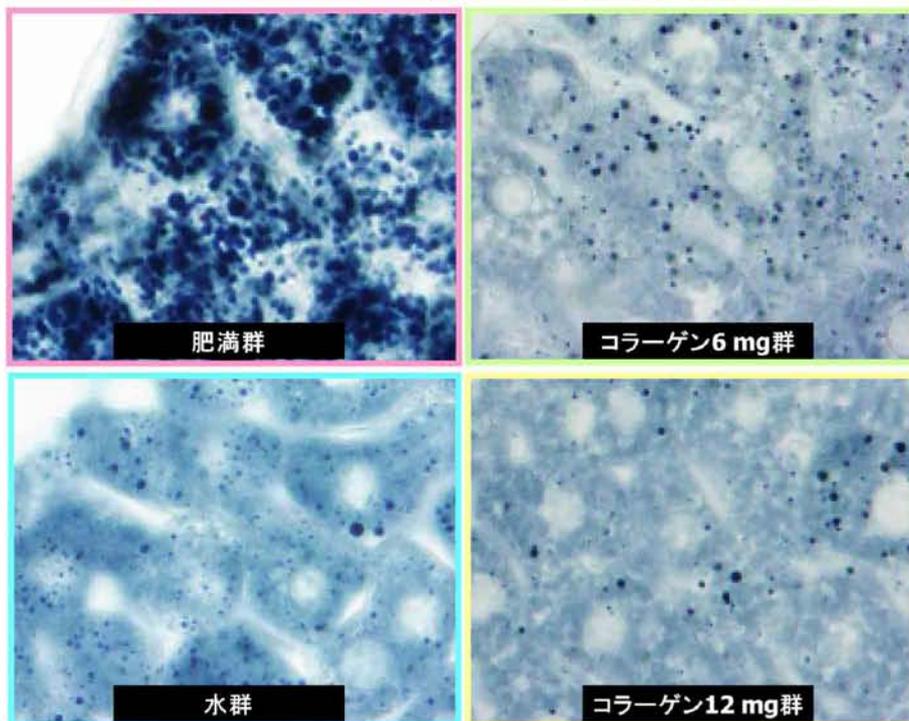
コラーゲン、魚油を投与した結果、両処置群ともに体重、全脂肪重量が顕著に減少していた。

Fig. 5 肥満群の肝臓の HE 染色像と脂肪染色像



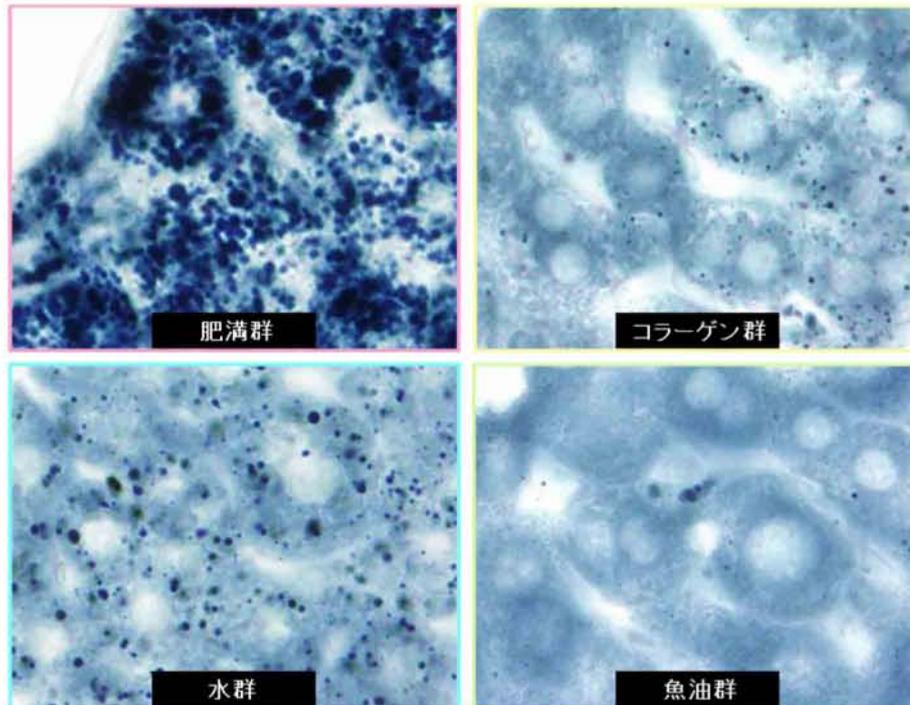
対照群と比較し、HE 染色では、肝細胞が大きくなり細胞質が白く抜けていた。ズダン B 染色では、細胞質いっぱいになん種な脂肪滴が無数に確認できた。

Fig. 6 処置後 40 日目の高肥満群の肝細胞内の脂肪染色像



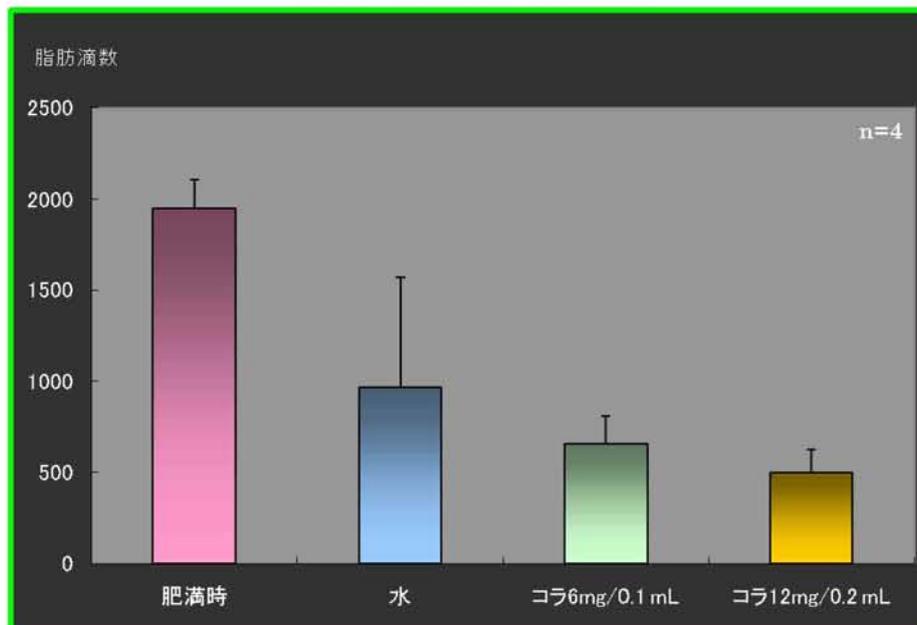
肥満群と比べて各群とも脂肪滴が減少し、水群では大小様々な脂肪滴が観察できた。

Fig. 7 処置後 40 日目の中肥満群の肝細胞内の脂肪染色像



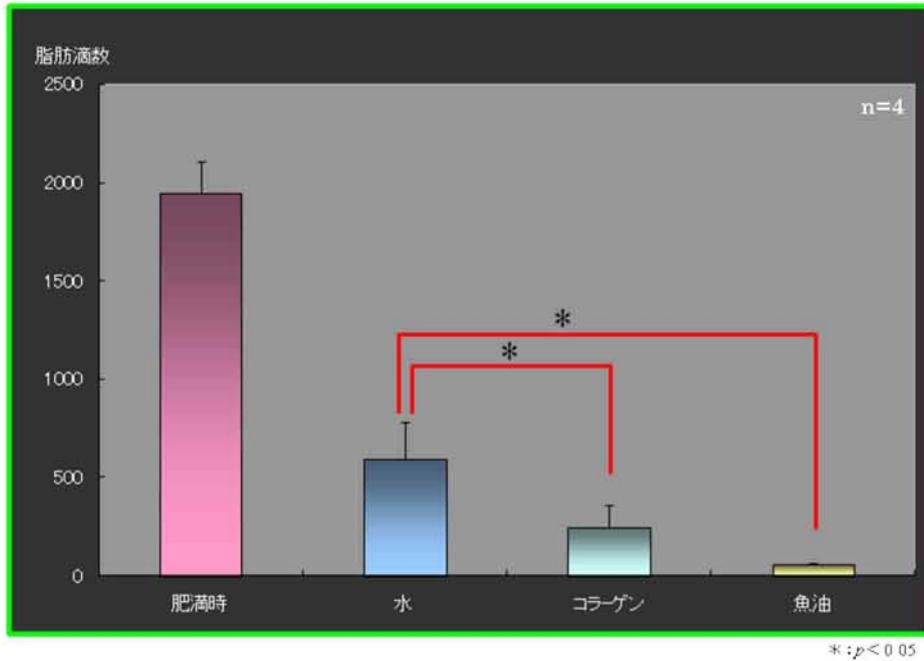
肥満群と比べて各群ともに脂肪滴が減少していた。水群と比べると、コラーゲン群、魚油群共に脂肪滴が減少しており、残留している脂肪滴も小型のものがほとんどであった。

Fig. 8 高肥満群の脂肪滴数



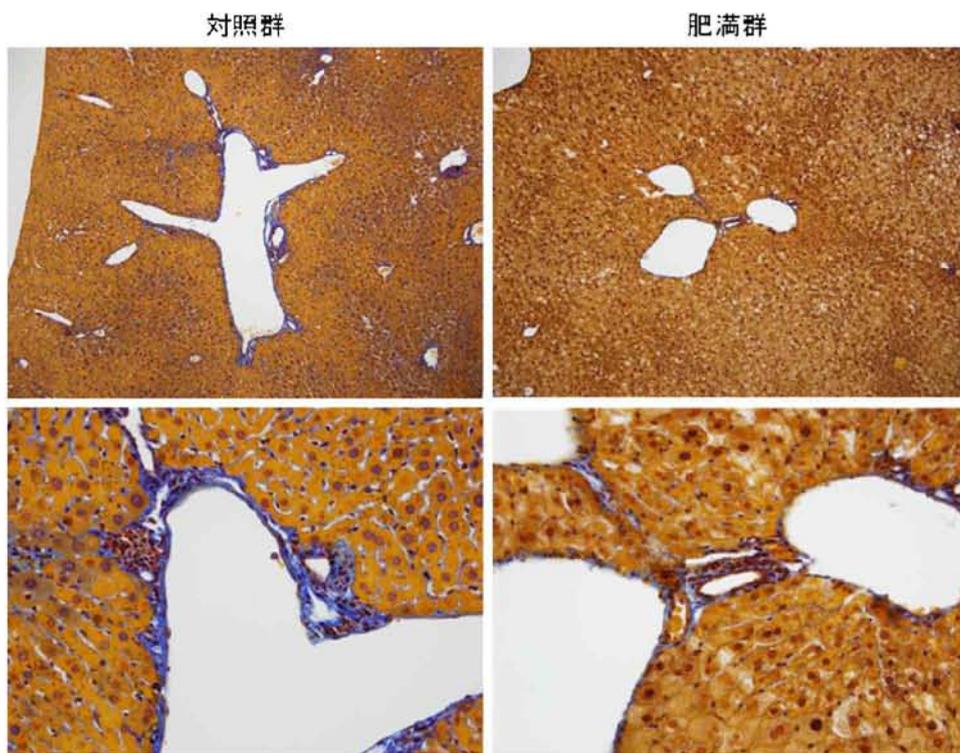
肥満時と比べて、各群ともに脂肪滴数が減少していた。  
水群と比べてコラーゲン群では濃度依存的に脂肪滴数が減少していた。

Fig. 9 中肥満群の脂肪滴数



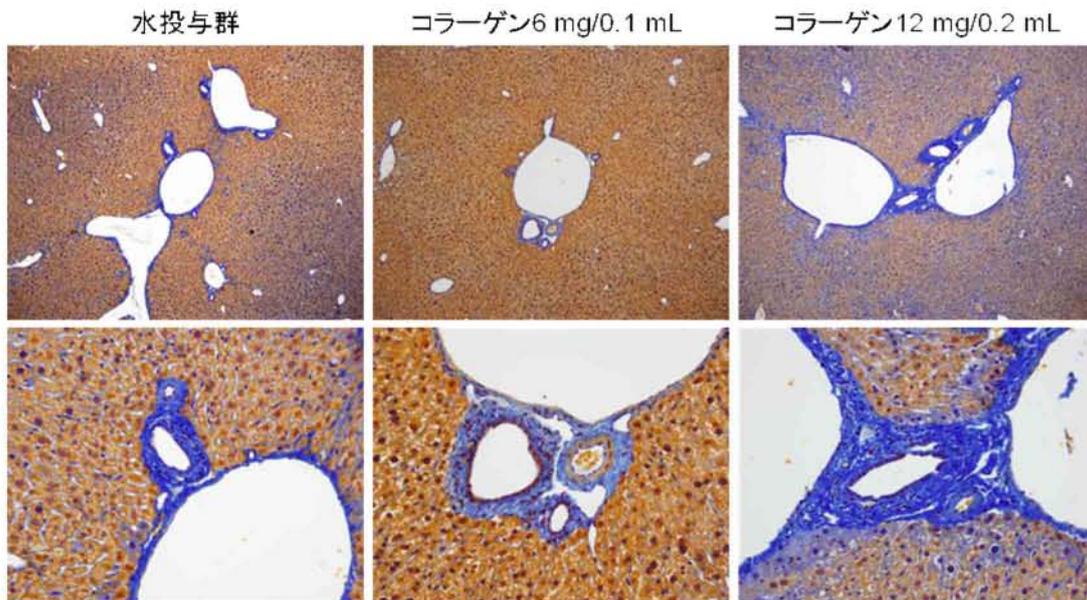
水群と比べて、コラーゲン群、魚油群ともに有意に脂肪滴数が減少していた。

Fig. 10 対照群と肥満群のマッソントリクローム染色像



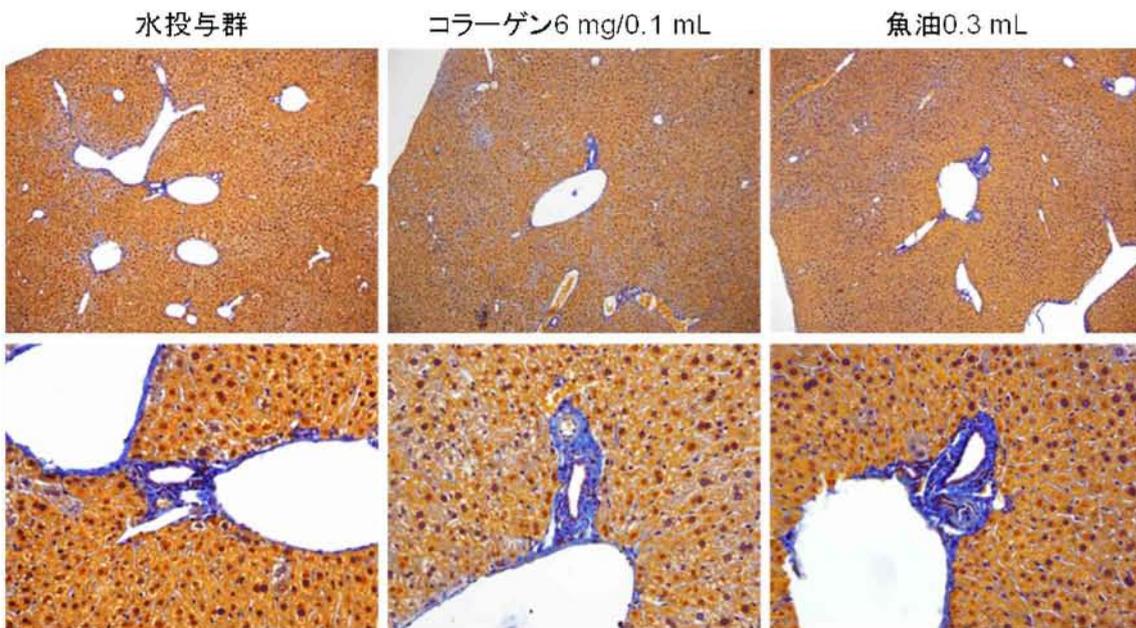
肥満群では対照群と比べて結合組織の量が極めて少なかった。

Fig. 11 高肥満群のマッソントリクローム染色像の比較



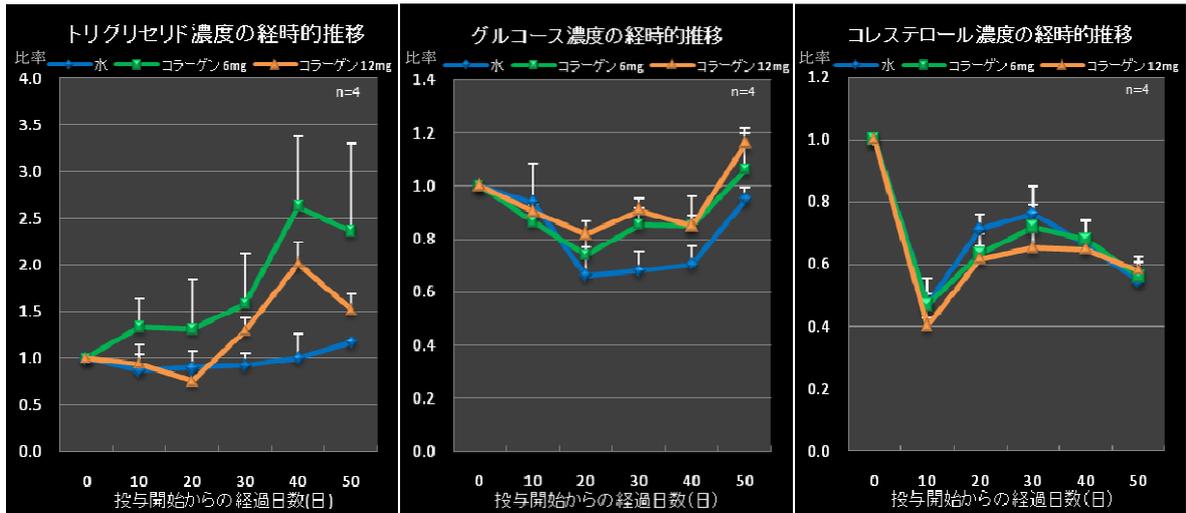
各群ともに肥満時と比べて結合組織の量が増加しており、コラーゲン 12 mg/0.2 mL 投与群では際立って増加していた。

Fig. 12 中肥満群のマッソントリクローム染色像の比較



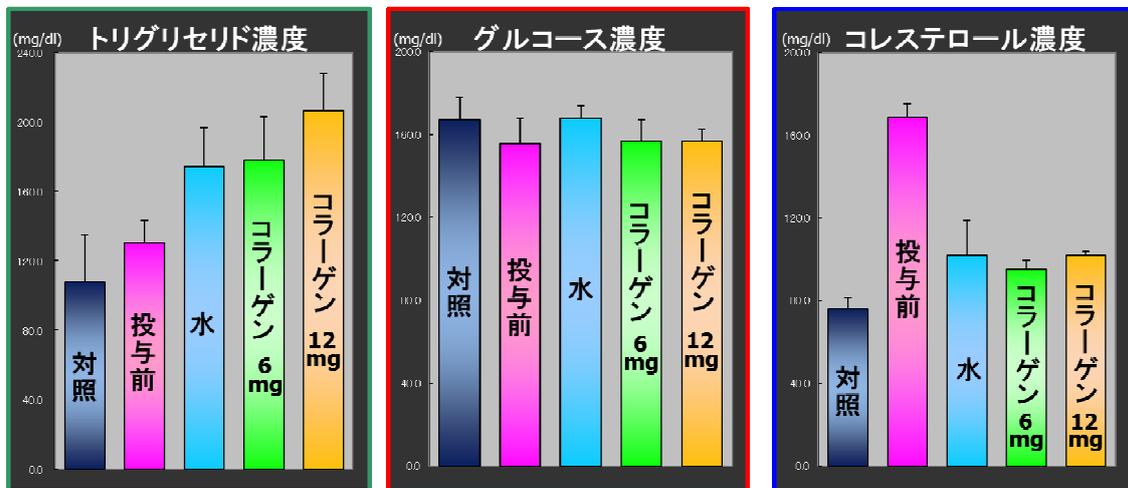
各群ともに肥満時と比べて結合組織の量が増加しており、対照群と同程度まで増加していた。

Fig. 13 高肥満マウスの血清指標値の経時的変化



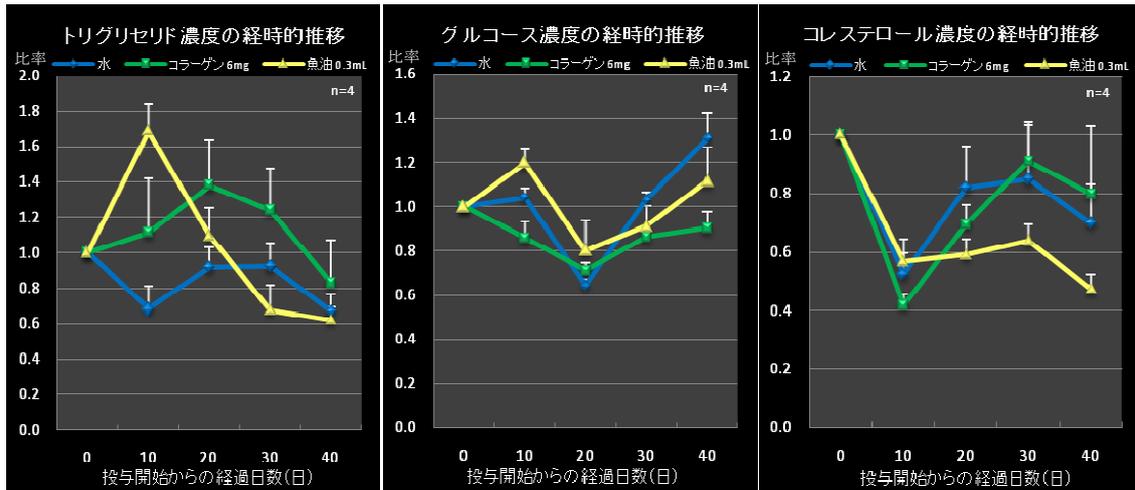
トリグリセリド濃度では、両コラーゲン群で 20 日目付近から上昇し、40 日目付近から下降する傾向にあった。グルコース、コレステロールの濃度に関しては、水群と比較して大きな変化はなかった。

Fig. 14 高肥満マウスの処理後 40 日目の血清指標値の比較



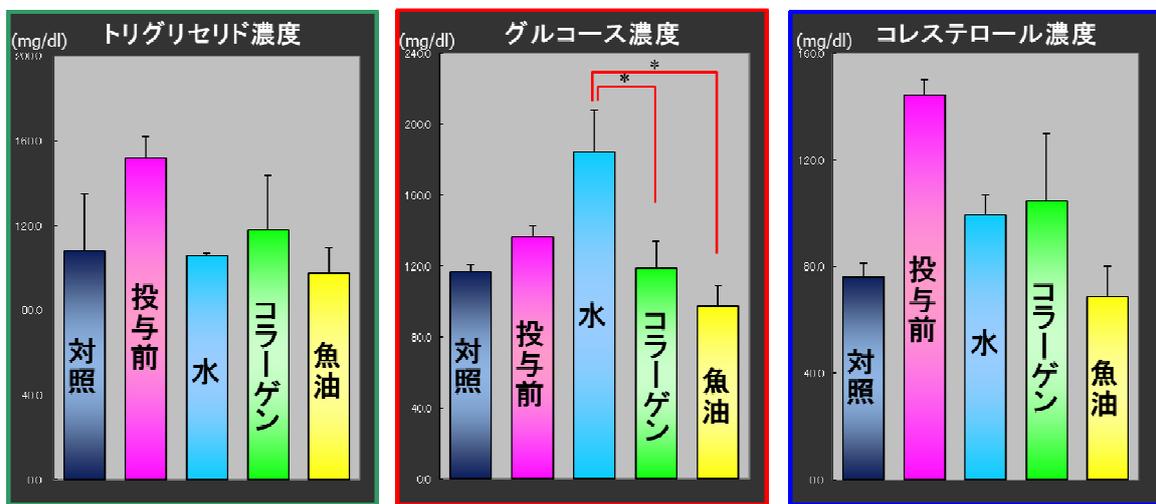
投与前と比較して、トリグリセリド濃度では全群上昇し、グルコース濃度では、大きな変化はなく、コレステロール濃度では減少していた。しかし、水群、コラーゲン 6 mg 群、12 mg 群と比べてみると、各濃度において有意な変化は認められなかった。

Fig. 15 中肥満マウスの血清指標値の経時的変化



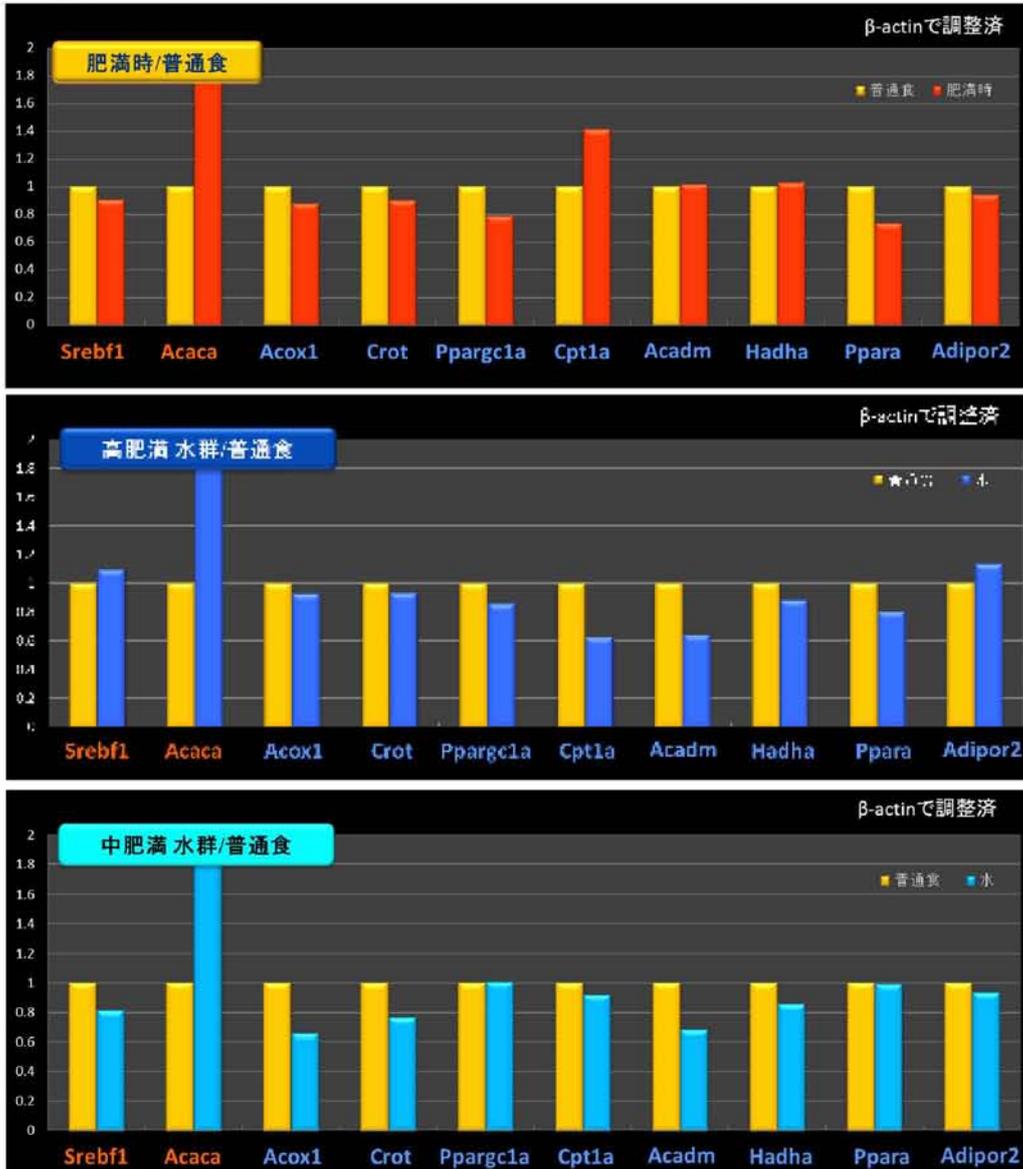
トリグリセリド濃度では、10日目で魚油群が一気に上昇し、コラーゲン群では20日目まで徐々に上がり、その後、両群共に下降する傾向にあった。グルコース濃度では、全群20日目に下降するが、20日目以降は、上昇に転じ、魚油群、コラーゲン群において濃度上昇が抑制されていた。コレステロール濃度では、10日目まで一気に下降したが、魚油群ではその後一定を保ち、コラーゲン群、水投与群において上昇傾向が認められた。

Fig. 16 中肥満マウスの処理後40日目の血清指標値の比較



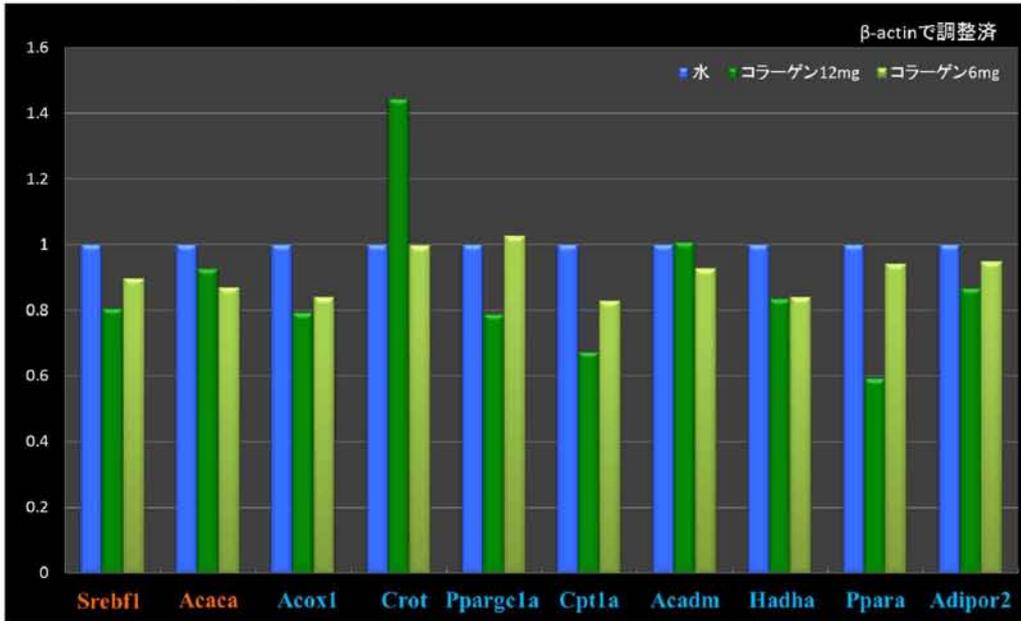
グルコース濃度は水投与群と比べてコラーゲン、魚油において有意に低下した。  
また、対照群と比べると水投与群でグルコース濃度が有意に上昇していた。  
\*:  $p < 0.05$

Fig. 17 肥満時、高肥満水群、中肥満水群における遺伝子発現の対普通食群比



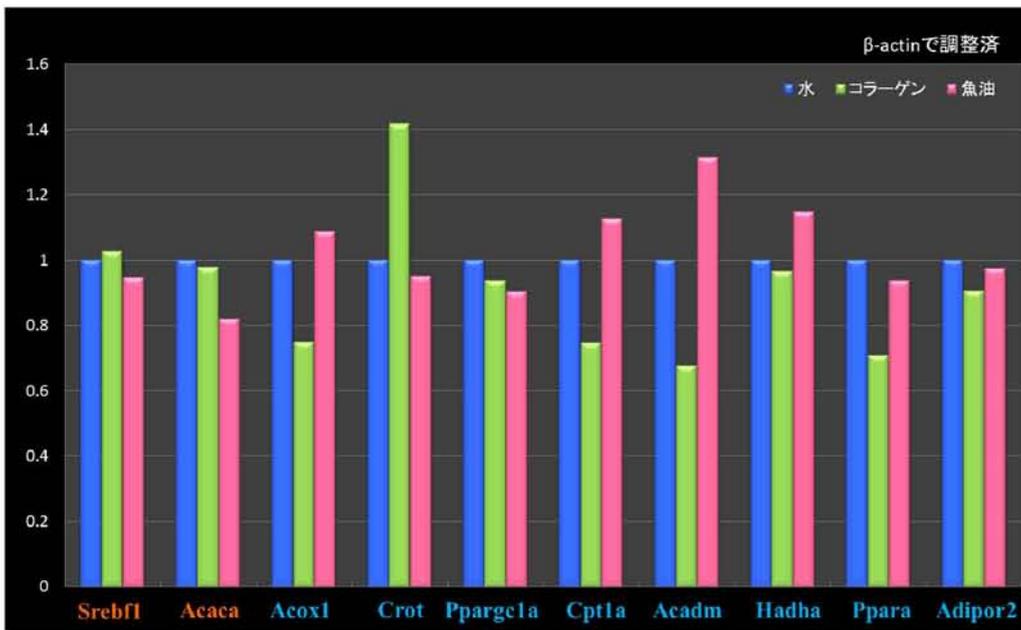
肥満時、高肥満の水群、中肥満の水群において、脂肪合成関連遺伝子である *Acaca* の発現が顕著に上昇していた。一方、脂肪分解関連遺伝子である *Cpt1a* は、肥満時で発現の上昇がみられた。

Fig. 18 高肥満群における遺伝子発現の対水群比



コラーゲン 12 mg 群で Crot の発現上昇が認められた。

Fig. 19 中肥満群における遺伝子発現の対水群比



コラーゲン群では Crot の発現が顕著に上昇しており、魚油群では Cpt1a、Acadm 及び Hadha の発現上昇が認められた。

## X. 和文要旨

### 【背景】

近年、肥満は糖尿病や癌などの疾患の原因となり、メタボリックシンドロームとして問題視されている。肥満に伴う脂肪肝は、肝線維症、肝硬変を経て肝臓になる可能性が高い。このリスクを回避するためには脂肪代謝の改善が最も重要である。その方法のひとつとして健康補助食品による脂質代謝の改善があげられる。しかしながら、肥満の予防あるいは解消に有効と言われる健康補助食品は、体脂肪のみに効果があるのか、肝細胞の脂肪代謝にも影響を及ぼすのかは不明である。

### 【目的】

本研究では、健康補助食品であるコラーゲンペプチドや魚油が高脂肪食摂取による肥満モデルマウスの肝細胞の脂質代謝に及ぼす影響を、病理組織学的及び RT-PCR 法によって解析した。

### 【方法】

7 週齢で卵巣除去した ICR 雌マウスに高脂肪食を摂取させて肥満にし、肥満モデルマウスとした。次に、この肥満マウスを、コラーゲン投与群 (C 群)、魚油投与群 (F 群) および水投与群 (対照群、W 群) に分け、定期的な体重の計測と採血を行い、実験終了時には全血を採取後、各臓器や内臓脂肪、皮下脂肪の重量を測定した。また、肝臓は病理組織学的に解析するとともに、各群における肝細胞内の脂肪滴数を比較した。更に、各群の肝臓における脂肪代謝関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法によって比較検討した。

### 【結果】

実験開始前に肥満になったマウスを、普通食で飼育したマウスと比較したところ、体脂肪の増加だけでなく、肝細胞内にも脂肪滴の増加が確認できた。肥満マウスは、高肥満群 (60 g 台) と中肥満群 (50 g 台) 共に、コラーゲン、魚油及び水を投与したところ、全群で急速な体重減少を示したが、W 群では 20 日目以降、体重減少は横ばい状態となり、C 群と F 群では更に減少を続けた。体脂肪量も W 群に比べて C 群と F 群では減少した。一方、肝細胞内の脂肪滴数は F 群で最も減少し、次いで C 群、W 群であった。血清中のブドウ糖、コレステロールの濃度は、肥満時と比べて、顕著に低下していたが、トリグリセリド濃度に大きな変化は認められなかった。この時の遺伝子発現では、W 群に比べて、C 群では *Crot* が、F 群では、*Acadm* が上昇した。

### 【考察】

コラーゲン及び魚油投与によって肝細胞に蓄積した脂肪滴は効果的に排除されたことから、両物質は、肝臓の脂肪代謝に効果的に作用することが示された。また、両物質の投与によって異なった遺伝子が発現上昇を示したことから、それぞれ異なった脂肪代謝経路に作用していることが示唆された。

## XI. 英文要旨

### Effects of Supplements on Lipid Metabolism in Mouse Hepatocytes

Recently, obesity has been demonstrated to be a cause of diseases such as diabetes and cancer and is therefore a serious problem with regards to metabolic syndrome. Obesity sufferers with fatty liver have a risk of liver cancer preceded by liver fibrosis and cirrhosis. In order to avoid this risk of cancer it would be beneficial to improve lipid metabolism in the liver. For this purpose, health food supplements can be considered as candidates for treatment. There are, however, many supplements which may effectively prevent obesity but their molecular mechanisms are not fully understood.

The purpose of our experiment here is to analyze not only the effects of both a collagen tripeptide and fish oil on lipid metabolism in the liver of obese mice, but also the expression of lipid metabolism-related genes in these mice after treatment with the above supplements.

To carry out our experiments, seven-weeks old ICR female mice were ovariectomized (Ovox) and then fed with a high-fat diet. Once they became obese, these mice were divided into the following: collagen-treated (C) group, fish oil-treated (F) group, and water-treated/control (W) group. During treatment with the respective supplements mice were fed a standard diet. Measurement of body weight and blood sampling were regularly done, followed by whole blood collection at the end of the treatment period and weighing of each organ and subcutaneous and visceral fat. Furthermore, liver fat droplets were histopathologically analyzed and lipid metabolism-related gene expression in the liver of mice post-treatment was analyzed by real-time-PCR.

Prior to carrying out the above procedures, after feeding with a high-fat diet, the body weight of Ovox mice was over 50 grams. The weight of adipose tissue and the presence of lipid droplets in the liver were also significantly increased in obese mice when compared to the standard diet control group. By day 20 after removing the high-fat feed, body weight in all groups showed a rapid decrease. In the W-group, body weight became steady, while in C- and F-groups, there was a continual decrease. Following from this, the adipose tissue weight in C- and F-groups was also reduced in comparison to those in the W-group and in F- and C-groups lipid droplets in hepatocytes were greatly decreased in number. As for serum markers, glucose and cholesterol levels showed a decrease when compared to the obese period, but triglyceride levels were unchanged. Lastly, gene expression comparison showed that, when compared to W-group, the Crot gene in C-group was upregulated 1.5 times and Acadm in F-group was upregulated 1.3 times.

In conclusion, these data suggest that both fish oil and collagen tripeptide effectively promoted lipolysis in the fatty liver by means of respectively different lipid metabolic pathways.