

タイワンシジミ(*Corbicula fluminea*)抽出物の
生理機能およびその生理活性物質の探索

平成 30 年

千々松 武司

目次

略号一覧

第1章	序論	1
第2章	タイワンシジミ抽出物が肝障害モデルラットに及ぼす影響	8
第3章	タイワンシジミ抽出物がラットにおけるアルコール性脂肪肝 およびアルコール代謝に及ぼす影響	17
第4章	タイワンシジミ抽出物が食餌性高コレステロール血症 に及ぼす影響およびその活性化合物の探索	
第1節	タイワンシジミ抽出物が食餌性高コレステロール血症モデルラット に及ぼす影響	27
第2節	タイワンシジミ抽出物の脂質画分および分離タンパク質画分が 食餌性高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響	37
第3節	食餌性高コレステロール血症モデルラットを用いた タイワンシジミ抽出物の脂質画分中の活性化合物の探索	50
第4節	小括	63
第5章	タイワンシジミ抽出物が生体異物により誘導される肝障害 および高コレステロール血症に及ぼす影響	
第1節	タイワンシジミ抽出物がクロレトン誘導 高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響	65
第2節	タイワンシジミ抽出物の脂質画分および分離タンパク質画分が クロレトン誘導高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響	77
第3節	小括	90
第6章	総括	92
	要約	99
	引用文献	102

謝辞

略語一覧

6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase	6-グルコン酸デヒドロゲナーゼ
ABC	ATP-binding cassette	ATP 結合カセット
ACE	angiotensin-converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANOVA	analysis of variance	分散分析
apoA-I	apolipoprotein A-I	アポリポプロテイン A-I
ASH	alcoholic steatohepatitis	アルコール性脂肪性肝炎
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the ethanol concentration-time curve	血中エタノール濃度-時間曲線下面積
BARE	bile acid response element	胆汁酸応答領域
BHT	butylated hydroxytoluene	ブチル化ヒドロキシトルエン
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
CYP7A1	cholesterol 7 alpha-hydroxylase	コレステロール 7 α -ヒドロキシラーゼ
DDT	dichlorodiphenyltrichloroethane	ジクロロジフェニルトリクロロエタン
DR	direct repeat	ダイレクトリピート
FADS	fatty acid desaturase	脂肪酸デサチュラーゼ
FAS	fatty acid synthase	脂肪酸シンターゼ
FCE	freshwater clam extract	タイワンシジミ抽出物
FXR	farnesoid X receptor	ファルネソイド X 受容体
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ
HDL	high density lipoprotein	高比重リポ蛋白
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA	ヒドロキシメチルグルタリル CoA
HNF	hepatocyte nuclear factor	肝細胞核因子
LAP	leucine aminopeptidase	ロイシンアミノペプチダーゼ
LD	lactate dehydrogenase	乳酸デヒドロゲナーゼ
LDL	low density lipoprotein	低比重リポ蛋白
LPS	lipopolysaccharide	リポポリサッカライド
LXR	liver X receptor	肝臓 X 受容体
ME	malic enzyme	リンゴ酸酵素
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	非アルコール性脂肪肝
NASH	non-alcoholic steatohepatitis	非アルコール性脂肪性肝炎
NF- κ B	nuclear factor-kappa B	核内因子 κ -B
PCB	polychlorinated biphenyl	ポリ塩化ビフェニル
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin 9	プロ蛋白転換酵素サブチリシン/ケキシン 9 型

PUFA	polyunsaturated fatty acid	多価不飽和脂肪酸
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
SCD	stearoyl-CoA desaturase	ステアロイル-CoA デサチュラーゼ
SEM	standard error of mean	標準誤差
SHP	small heterodimer partner	小型ヘテロ二量体パートナー
SREBP	sterol regulatory element binding protein	ステロール調節配列結合蛋白
TLR	Toll like Receptor	Toll 様受容体
TMS	Trimethylsilyl	トリメチルシリル
TNF	Tumor Necrosis Factor	腫瘍壊死因子
UDP	uridine diphosphate	ウリジン二リン酸
UTP	uridine triphosphate	ウリジン三リン酸
VLDL	very low-density lipoprotein	超低比重リポ蛋白

第 1 章

序論

メタボリックシンドロームは、いくつかの遺伝素因と、運動習慣、食生活などの環境要因によって引き起こされる、肥満、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、高血圧、耐糖能異常を含む代謝異常である。世界的にみると死因の 31%が心疾患に由来し、毎年 1750 万人が死亡している (Hajar, 2016)。このままでは心疾患による死亡者数は、2030 年には、年間 2360 万人にまで増大すると予想されている (Hajar, 2016)。厚生労働省の発表によると 2016 年の日本における死因の 2 位は 15.1%を占める心疾患で、4 位は 8.4%を占める脳血管疾患である。心疾患や脳血管疾患の原因である動脈硬化を引き起こす一因がメタボリックシンドロームである。虚血性心疾患の一次予防ガイドライン (2006 年改訂版) によると日本においては、1970 年頃を境に、脳血管疾患および虚血性心疾患を原因とした死亡率は低下している。一方で、日本人間ドック学会の調査によると 1990 年代と比較すると、高中性脂肪を除き、肥満、高コレステロール、高血圧、耐糖能異常の割合は約 2~3 倍に増加している (日本人間ドック学会, 2016)。つまり、運動習慣や食生活などの生活習慣の激変によってメタボリックシンドロームが増加していると考えられる。死因として動脈硬化が原因である心疾患や脳血管疾患を原因とする死亡率が低下していることとメタボリックシンドロームが増加していることは矛盾が生じている。十分な統計結果は見当たらないものの、軽症や医療技術の進展等に伴い死亡に至らない心疾患や脳血管疾患はむしろ増加している可能性がある。その場合、寝たきり等の後遺症によって日常生活活動や生活の質が著しく阻害されることになる。

コレステロールは動物細胞の細胞膜を構成する重要な脂質の 1 つである。また、コレステロールは、ステロイドホルモン、ビタミン D、胆汁酸の前駆物質でもある。哺乳動物においては、コレステロールは主に肝臓で生合成される内因性のものと、食餌由来の外因性のものがある。一般的に、生体内におけるコレステロール量は、コレステロールホメオスタシスによってバランスが取られているが、何らかの理由によって、ホメオスタシスが破綻し、血中のコレステロールレベルが過剰になると動脈硬化の危険因子となる。特に酸化などの修飾を受けた変性 low density lipoprotein (LDL) が動脈硬化の進展に密接に関与している。LDL はコレステロールとトリグリセリドが核となり、その周囲に遊離脂肪酸やリン脂質の層があり、1 分子の apoB タンパク質が結合している。apoB タンパク質は、LDL 中の不飽和脂肪酸など酸化を受けやすい構成成分の影響等により変性する。LDL は血管壁内膜へ浸入し、血管壁内で生じた酸化ストレスによって酸化 LDL となる。酸化 LDL はマクロファージによって際限なく取り込まれ、マクロファージはコレ

ステロールが蓄積した泡沫細胞となる (Takeya et al., 1999; Witztum & Steinberg, 1991; Lara-Guzmán et al., 2018)。さらに、酸化 LDL は血管内皮細胞にも取り込まれ血管内皮細胞での酸化ストレスを増加させることなどで粥状動脈硬化巣の形成、進展に関わるとされている (Gopaul et al., 1994; Kataoka et al., 2001)。これらのことから、高コレステロール血症を含むメタボリックシンドロームの予防は、心疾患および脳血管疾患発症の予防につながり単なる長寿への寄与のみならず、健康寿命の延伸および医療費の低減の面からも非常に重要である。

一般的に、肝臓は沈黙の臓器といわれており、異変等に気づくことが困難な臓器である。肝疾患には、B 型、C 型肝炎というウイルスによって引き起こされる疾患の他に、アルコール性脂肪肝・脂肪性肝炎 (ASH)、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD)・脂肪性肝炎 (NASH) がある。日本人間ドック協会による 2015 年「人間ドックの現況」によると、2015 年の調査において肝機能異常は 33.2%と年々増加しており、1984 年と比較すると約 3 倍にまで異常頻度が増加している。ウイルス性肝炎の罹患者数は治療および予防方法が進歩したことで、日本においては 200 万人程度にまで減少したとされている (岡上ら, 2015)。ASH および NASH は発症機構に差異もみられるものの、いずれも線維化から肝硬変や肝がんに進展することが知られており (杉本ら, 2015)、予防および治療が重要である。NAFLD および NASH はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられている。従来、非アルコール性肝疾患は注目されていなかったが、生活習慣が大きく変わったことから、NAFLD および NASH の有病率が増加し、注目されている。日本における NAFLD の有病率は報告年等によっても異なるが、2009~2010 年に実施された調査では対象者の 29.7%が NAFLD であったという報告がある (Eguchi et al., 2012)。特に NAFLD および NASH は、基礎疾患として、2 型糖尿病、高コレステロール血症、高血圧症があり、それらに対する治療薬はあるものの、現時点において肝臓に対して有効性が確立した治療薬はない (NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)。そのため、肝機能障害、特にウイルス性以外の肝疾患に対する予防・治療方法の確立は望まれるところである。

これまで、多くの有用産物が陸上生物から発見され、薬などに開発されてきた。しかしながら、陸上生物の代謝産物の研究はかなり進んでいるため、新たな構造を持つ化合物を発見することが必ずしも容易ではなくなっている。水生生物は多様性に富み、有用産物資源が豊富にあると考えられており、マリンバイオテクノロジー分野への期待は高い (Molinski, 2009)。陸上生物とは異なる代謝経路を持ち、開拓の進んでいなかった水生生物には新規化合物を代謝産物として持つものも少なくないと考えられる。特に、深海生物はこれまで調査対象となっていなかったものの、有人深海探査船や深海探査機などの急激な進展により、これまで全く謎であった領域の生物も対象とすることが出来ており、いくつかの有用生物が既に発見されている (Xiong et al., 2013)。一方で、深海生物は、その生育環境が特殊であるため、有用物質を得るための深海生物の培養や

養殖等を行うことが困難であるという問題点もある。その点、浅瀬に生息する水産生物は、増殖させることが比較的容易であり、既に養殖技術等が確立しているものも多くある。しかしながら、比較的浅瀬に生息しており、これまでも食糧資源として利用されてきた水産生物に対して有用産物を求める研究は意外に多くない。

貝類は世界中で消費されている重要な食糧資源である。古代人が食したであろう貝の非可食部(貝殻)が堆積した貝塚が世界中で見つかっていることから、貝類は古くから食用等に利用されている食糧資源であった。現代においては、サザエ、アワビ、ホラガイなどの巻貝とカキやイガイ(ムール貝)、ザルガイ、マテガイ、ホタテ、ハマグリ、アサリ、シジミなどの二枚貝が世界中で食されている(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FishStat Plus)。国際連合食糧農業機関(FAO)の統計によると、世界における貝類の生産量(漁獲生産量および養殖生産量の合計)は年々増加しており、天然および養殖の貝類(巻貝と二枚貝含む)の漁獲高は、2000年の10,974ktから2010年には15,752ktへ増加している(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FishStat Plus)。その中でも、二枚貝は重要な資源であり、2010年生産量のうち、15,226kt(貝類生産量の約96.7%)が二枚貝であり、また、全ての水産資源の約1割を占めている(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FishStat Plus)。日本では、刺身、寿司などとして魚介類を生食する習慣があり、サザエ、アワビなどの巻貝、カキ、ホタテなどの二枚貝も生食する。日本以外では、貝類含め魚介類全般を生食する習慣は一般的にないが、カキについては欧米諸国にあるオイスターバーなどで生食することもある。特徴的な貝類の生食の文化として、ニュージーランドのマオリ族が緑イガイを生食していたという文化がある。シジミは日本で、食材として非常になじみの深い食材の1つである。味噌汁や佃煮として、利用されるのが一般的である。一方で、台湾では、スープ等の利用方法以外に、半生の状態のシジミを醤油漬けにして食する方法もある。しかし、貝類の生食は食中毒や肝炎ウイルスの感染のリスクがあるため、加熱調理して食されることが一般的である。

食材としての有用性だけでなく、貝類は民間療法薬として利用されてきた(Mahawar & Jaroli, 2007; Wakimoto et al., 2011)。ニュージーランドでマオリ族が生食していたとされるイガイは、滋養強壮のために常食していたとされている(Wakimoto et al., 2011)。沖縄では、ミズイリショウジョウガイ(Thorny Oyster: *Spondylus varius*)は肝臓に良いとされて利用されてきた(Koyama et al., 2006)。漢方薬について総合的に記載された現存する書物の中で古いものである本草綱目(李)には、シジミは「暴熱を去り、目を明にし、小便を利し、熱気、脚気、湿毒を下し、酒毒目黄を解す。浸した汁を服すれば消渴を治す」とあり、中国、台湾、日本などの東アジアにおいてはシジミの可食部や抽出液(スープ)が肝臓に良いとされ利用されてきた。また、二枚貝の一部では軟体の可食部だけではなく、貝殻を焼成したのもも伝承薬として使用されてきた

(Mahawar & Jaroli, 2007)。このように、貝類は食材としての価値のみならず、様々な生理活性物質を有する資源としても有益な可能性がある。しかしながら、その科学的根拠についてはそれほど多く示されていない。一方で機能性が未開発であるということは、様々な新規生理活性物質を含んでいる可能性も高いと思われる。これまでの生理活性物質を探索するための研究は、主に陸上生物に求めてきた。しかし、水生生物は、生息環境が陸上生物と全く異なるため、その代謝経路も異なる。それ故、水生生物から、陸上生物では見つかっていなかった新規生理活性物質が発見される可能性が高いと考えられる。近年、マリンバイオテクノロジーへの関心が高まっているが、新規化合物の発見による創薬シーズを提供するだけでなく、従来食されている水産資源であれば機能性食品としての利用の可能性も高い。水生生物の中でも、貝類の機能性や貝類中に含まれる生理活性物質については研究が進んでおらず、新規作用や新規化合物が発見される可能性が期待できるものと思われる。また、貝類に含まれる生理活性物質には、ステロールやカロテノイドなど餌由来と思われる成分もある。いくつかの貝類は、既に食糧資源としての養殖技術は確立されている。一方で、様々な貝類の生理活性物質が明らかになれば、養殖方法により生理活性物質を富化した機能性食品の開発や、生理活性物質を生産するための生物工場としての利用も期待される。このように、貝類には様々な可能性が秘められているが、これまでは貝類の生理活性についての研究が多くないのが現状である。これまでに報告されている貝類の研究について次に述べる。

貝類は一般的にアミノ酸が豊富であると言われている。アミノ酸は単なる窒素源としてだけではなく、その組成や単一のアミノ酸によって脂質代謝等の機能性を示すことが知られている。特に、含硫アミノ酸であるタウリンは脂質代謝を促進することが報告されている (Oda, 2006)。また、グリシンも脂質代謝促進効果 (Park et al., 1999; Hafidi et al., 2004) や肝機能保護効果 (Stachlewitz et al., 1999) が報告されているアミノ酸の1つである。貝類相互間ではアミノ酸組成はかなりの違いがあり、貝類のアミノ酸と一口に表現するのは適切ではないかもしれないが、魚肉エキスと比較すると、総じて貝肉エキスのアミノ酸には、ヒスチジンが少なく、グリシン、アラニン、グルタミン酸、アルギニン、プロリン、アスパラギン酸、タウリンが多いことが報告されている (高木ら, 1970)。

一般的に食用に供されている貝類は巻貝および二枚貝である。巻貝であるアワビ、サザエ、ホラ貝などの生理活性に関する報告は限られている。アワビは伝承的に目に良いと言われている。しかしながら、その科学的な根拠は見当たらない。一方で、アワビ中の硫酸化多糖は免疫の調整機能、抗腫瘍活性、抗酸化活性を有することが報告されている (Sun et al., 2010; Zhu et al., 2010)。また、サザエも日本で良く食される巻貝の1種であるが、その生理活性についての研究報告は、見当たらない。以上のように、現状、巻貝の生理活性に関する研究報告は進んでいない。そのた

め、今後の機能性が期待される食材でもある。

二枚貝については、いくつかの生理活性の研究報告が見られる。中国原産の二枚貝の 1 種であるヒレイケチョウガイの多糖類には抗酸化活性があることが報告されている (Qiao et al., 2009)。カキ、アサリには脂質代謝改善効果があることが報告されている (Iritani et al., 1979a; Iritani et al., 1980)。特に、これらの貝類の中性脂肪は多価不飽和脂肪酸を多く含み、肝臓における脂肪酸合成系の酵素活性を抑制して脂質代謝に影響を及ぼす可能性が示されている (Iritani et al., 1980)。また、生理活性を有する脂肪酸として、緑イガイの脂肪酸があり、特に抗炎症活性成分としてフラン脂肪酸が同定されている (Wakimoto et al., 2011)。ホタテは日本でも代表的な食用の二枚貝の 1 つである。ホタテの可食部は主に貝柱であり、それ以外の部分は廃棄物となるため、問題となっている。そのホタテ未利用資源の有効利用につながる機能性として、紫外線による細胞傷害に対して保護効果および皮膚繊維芽細胞の増殖促進効果を示すマイコスポリン様アミノ酸がホタテ卵巣に含まれていることが報告されている (Oyamada et al., 2008)。また、ラットの白色脂肪組織重量を減少させる効果が、ホタテの貝殻を粉末化したものにあることが報告されている (Liu & Hasegawa, 2006)。カキは、以前から機能性食品として利用されている代表的な貝類の 1 つである。カキ可食部や抽出物は脂質代謝を促進することが報告されている (Tanaka et al., 2003; Kimura et al., 1998)。魚介類タンパク質の加水分解物にはアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性があることが報告されている (Wijesekara & Kim, 2010)。ハマグリ、カキ、ムール貝のタンパク質加水分解物でも ACE 阻害活性があることが報告されている (Wijesekara & Kim, 2010)。同じ二枚貝原料であっても、加水分解の条件が異なると生成するペプチドも異なり、その作用の強さや阻害様式は異なる。例えば、Je ら (2005) は発酵したカキソースにも ACE 阻害活性があり、その阻害様式は拮抗阻害であることを見出しているが、Wang ら (2008) はカキのペプシン加水分解物の ACE 阻害の阻害様式は非拮抗阻害であるとしている。

シジミは、本草綱目にも記載されている生薬の 1 つであり、日本でも昔から肝機能に対する効果が伝承的に言われている二枚貝の 1 つである。シジミにはオルニチン含量が高いことが報告されている (Wu & Shiau, 2002)。アミノ酸の 1 種であるオルニチンは、肝保護作用などいくつかの機能性が報告されている (Bucci et al., 1990)。Uchisawa ら (2004) はシジミを冷凍することで、オルニチン含量が増加する加工方法を報告している。また、シジミは、オルニチンを含むトリペプチド (acorbine : β -Ala-Orn-Orn) を含むことが見い出されている (Uchisawa et al., 2007)。シジミを冷凍処理することで、遊離アラニンおよびオルニチン量が増加するが、一方でこの acorbine 量を減少させることも報告されている (Uchisawa et al., 2007)。脂質成分としては、シジミにも他の魚介類同様に多価不飽和脂肪酸が含まれる (Iritani et al., 1980)。またシジミの脂質中にはコレステロールの吸収を抑制する植物ステロールも含まれている (Iritani et al., 1979b)。

動物には植物ステロールの生合成能力はないことが知られているため、シジミはエサである植物プランクトンが合成した植物ステロールを取り込んで蓄積しているものと思われる。また、シジミ中からは新規ステロールとしてポリ酸化ステロールが同定されている (Kong et al., 2011)。シジミ中にはいくつかの新規カロテノイドも見出されている (Maoka et al., 2005)。シジミ中のカロテノイドについても植物ステロール同様にシジミが摂取している植物プランクトンに由来しているものと思われ、淡水のシジミと汽水域に生息するシジミとではカロテノイドの組成が異なり、その原因が摂取している植物プランクトンの種類の違いによる可能性が示唆されている (Maoka et al., 2005)。これらのことは、貝類は自ら生理活性物質を合成する可能性だけではなく、エサとしての微生物、原生生物由来の生理活性物質を濃縮する能力を持っているものと思われる。このように、いくつかの生理活性物質がシジミに含まれていることが報告されているが、シジミが有する生理活性機能についての研究は他の貝類同様にそれほど多くない。

そこで、本論文ではシジミ、特に淡水で生息している台湾シジミに注目して、台湾シジミ抽出物 (freshwater clam extract: FCE) の生理活性を検討し、さらにその生理活性が FCE 中のどのような成分によるものなのかを探索した。シジミは昔から肝機能に良いとされている。そのため、第 2 章では FCE がガラクトサミン誘導肝障害モデルに及ぼす影響を検討した。その結果、FCE がガラクトサミンによって誘導される肝障害に対し保護効果を有することを明らかにした。第 3 章では FCE がアルコール代謝およびアルコール性脂肪肝に及ぼす影響について、エタノール急性経口投与モデルに及ぼす影響を検討した。その結果、FCE はアルコール代謝促進効果、脂肪肝抑制作用があることを明らかにした。第 4 章では、高コレステロール食を投与した外因性高コレステロール血症モデルラットを用いて、FCE のコレステロール低下作用、およびその作用メカニズム、活性化化合物の探索を行った。その結果として、FCE はコレステロール低下作用を有し、その主要構成成分である脂質画分および分離タンパク質画分のどちらにもその作用があることが明らかとなった。特に効果の強かった脂質画分について、さらに詳細に活性化化合物を探索したところ、スフィンゴ脂質、中性脂肪、ステロールエステルを含む画分に効果があることが明らかとなった。また、これらの活性画分においてコレステロールの異化代謝の促進および糞中への胆汁酸排泄促進によってコレステロール低下作用が示される可能性が示唆された。第 5 章では、クロレトンによって誘導される内因性高コレステロール血症および脂肪肝、肝障害に対する FCE の効果を検討した。その結果、FCE およびその脂質画分、分離タンパク質画分にコレステロール低下作用、脂肪肝抑制作用および肝障害抑制作用があることが明らかとなった。

以上のように本論文では、高コレステロール血症などの脂質代謝異常を含むメタボリックシンドロームやその肝臓における表現型である NAFLD/NASH に対する有用物質を水産生物であるシジミ、特に養殖方法の確立している台湾シジミの熱水抽出物から探索することを目的として

研究を行った。実験動物を用いた検討によってタイワンシジミの熱水抽出物である FCE が脂質代謝異常改善効果、および肝機能改善効果を有することを明らかにした。さらに、FCE に含まれる脂質成分が生体内でどのように作用しているのかというメカニズムの一端も明らかにした。

第2章

台湾シジミ抽出物が肝障害モデルラットに及ぼす影響

2.1. 緒言

シジミは、東アジア特に、日本、中国、台湾で良く食されている二枚貝の1つである。また、食用としてだけではなく、民間療法、生薬としても用いられてきた。特に、肝機能に対する生薬の1つとして利用してきた。

これまでの研究において、台湾シジミ抽出物 (FCE) には、四塩化炭素又は、出血性ショックにより誘導される肝障害に対する予防効果があることが報告されている (Peng et al., 2008; Hsu et al., 2010)。

ガラクトサミン誘導肝障害モデルはウイルス性肝障害と病態が似通っているとしてよく利用される動物モデルの1つである。ガラクトサミンにより誘発される肝障害のメカニズムは完全には明らかとなっていないが、いくつかのメカニズムが提唱されている。1つのメカニズムとして、ガラクトサミンが代謝される過程において uridine diphosphate (UDP)-ガラクトサミンとなり、肝臓における uridine triphosphate (UTP) が減少することでリボ核酸 (RNA) およびタンパク質合成の阻害が起きていることが考えられている (Decker & Keppler, 1974)。また、他のメカニズムとして、ガラクトサミンがマスト細胞を活性化し、ヒスタミンの放出を促進する。ヒスタミンは腸の透過性を増加させ、腸内細菌により産生されるリポポリサッカライド (LPS) が血中へ移行し Kupffer 細胞が活性化される。活性化された Kupffer 細胞では腫瘍壊死因子 (TNF)- α の産生が誘導される。そして炎症性サイトカインの1つである TNF- α によって肝細胞のアポトーシスが誘導されると考えられている (Stachlewitz et al., 1999)。また、ヒトにおいて肝炎ウイルスに感染していると血漿中 LPS 濃度が高まることから、ガラクトサミン同様にウイルス性肝炎においても LPS を介したアポトーシスの誘導の可能性も示唆されている (Sheron et al., 1991; Nelson et al., 1997)。また、アルコール性肝障害についても同様に LPS を介している可能性が示唆されている (Enomoto et al., 1998)。

そこで、ガラクトサミン誘導肝障害モデルを用いて、FCE が肝機能に及ぼす影響について明らかにすることを目的として検討を行った。

2.2. 実験方法

2.2.1. FCE の調製および成分分析

台湾花蓮縣で養殖されたタイワンシジミ (*C. fluminea*) 50kg を蒸煮した後、非可食部として殻を取り除いた。殻を取り除いた後の肉質部として 4.8kg を得て、ミートチョッパーで肉質部を粉碎した。肉質部に対し 2 倍量の加水をし、熱水にて 2 時間攪拌抽出した。抽出液を 80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE 745g を得た (FCE の収率：生のタイワンシジミ貝の約 1.5%)。以下、本論文における研究において FCE は同じ方法によって調製されたものを用いた。

FCE の一般成分組成、コハク酸およびグリコーゲン は日本冷凍食品検査協会センターに、分析を委託した。水分は常圧加熱乾燥法、粗タンパク質はケルダール法、粗脂肪をエーテル抽出法、灰分は直接灰化法、コハク酸は HPLC 法、グリコーゲンはソモギー変法によって分析した。炭水化物は差し引き法により算出した。加水分解アミノ酸は食品分析開発センターに委託した。加水分解アミノ酸のうちアスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、プロリンは塩酸加水分解したもの、メチオニンおよびシスチンは過ギ酸酸化し塩酸加水分解をしたものをアミノ酸自動分析計により分析した。トリプトファンは水酸化バリウムにより加水分解した後、HPLC によって分析した。タウリンおよびオルニチンは、食品環境検査協会にて分析を委託した。除タンパクした後、アミノ酸自動分析計によって分析を行った。FCE 中の植物ステロール (ブラシカステロール、カンペステロール、ステイグマステロールおよび β -シトステロール) は Delaney らの方法 (2003) により抽出し、トリメチルシリル (TMS) 化した。内部標準として 5 α -コレスタンを用いた。TMS 化したサンプルをガスクロマトグラフマススペクトロメトリー (GC/MS : GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー(株)) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度 : 300°C、ディテクタ温度 : 230°C、カラム : 30m \times 0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー(株))、カラム温度 : 245°C で 2 分間保持、その後 300°C まで 2°C/分で昇温させた。

2.2.2. 実験動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 23 \pm 1°C、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (MF: オリエンタル酵母工業(株)) で2日間、半合成飼料 (Table 2.1 中の対照食) で4日間飼育し、試験に供した。対照群を6匹、FCE群を8匹の2群とした。試験食を Table 2.1 に示した。対照群はタンパク質量が20%となるようにカゼインを添加し、FCE群は、FCEを2%添加し、タンパク質量が同じになるようにカゼイン、コーンスターチ、ショ糖で調整した (Table 2.1)。

試験食の投与期間は10日間とした。試験食投与9日目に、D-ガラクトサミン (和光純薬(株): 大阪) を350mg/kg B.W.の割合で投与量2mL/kg B.W.となるように生理食塩水に溶解して、腹腔内投与した。D-ガラクトサミン投与前後の絶食は行わなかった。D-ガラクトサミン投与22時間後にエーテル麻酔を行い、開腹し心臓より採血した。

Table 2.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the hepato-protective effect of freshwater clam extract (FCE) in rats injected D-galactosamine.

	Control	FCE
	<i>g/kg</i>	
Casein	222.0	210.0
Corn starch	435.0	430.0
Sucrose	218.0	215.0
Cellulose	30.0	30.0
Corn oil	50.0	50.0
AIN-76 mineral mixture	35.0	35.0
AIN-76 vitamin mixture	10.0	10.0
FCE	—	20.0

2.2.3. 生化学分析

採血後、血液を室温に30分間放置した後、遠心分離 (1,500×g, 10分間) することによって血清を得た。血清成分は市販キットを用いて測定した。血清中 aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1)活性はデタミナーAST II (協和メディックス(株))、alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) 活性はデタミナーALT II (協和メディックス(株))、lactate dehydrogenase (LD, EC1.1.1.27) 活性はデタミナーLD (協和メディックス(株))、alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1) 活性はデタミナーALP (協和メディックス(株))、中性脂肪はTG-EN カイノス(カイノス(株))、総コレステロールはT-CHO カイノス (カイノス(株))、リン脂質はリン脂質-C テストワコー (和光純薬(株))、遊離脂肪酸は NEFA 試薬 B (シスメックス国際(株)) を用いた。

2.2.4. 統計解析

2 群間の統計的有意差の検定は、Student の t -検定により行った ($p < 0.05$ or 0.01)。

2.3. 結果

得られた FCE の収率は、生のタイワンシジミ貝の約 1.5%であった。そのため、FCE が 2%添加された試験食 (Table 2.1) 1kg には、約 1.3kg に相当する生の殻付のタイワンシジミから得られた抽出物が含まれることになる。また、FCE は水可溶部だけでなく、約 35%が水不溶部であった。FCE の一般成分組成を Table 2.2 に示した。FCE の主要構成成分はタンパク質で 57%であった。また、熱水により抽出したものであるが、比較的脂質が多く 7.2%であった。また、灰分が 6.4%であった。シジミは一般的にコハク酸を多く含む。炭水化物の定量は差し引き法によって行われるため、コハク酸の量によっては炭水化物量に大きな影響を及ぼす可能性があると考えられたため、コハク酸も定量した。FCE に含まれるコハク酸は 11.4%と無視できない量であったため、炭水化物の差し引き法に用いた。グリコーゲンは、9.8%であり、炭水化物の大部分を占めていた。

Table 2.2 Proximate composition of freshwater clam extract (FCE).

Components (%)	FCE
Moisture	8.1
Crude protein	57.0
Crude fat	7.2
Ash	6.4
Carbohydrate	9.9
Succinic acid	11.4

Each components were analyzed by following method; moisture: heat-drying method, crude protein: Kjeldahl method, crude fat: Soxhlet extraction using diethyl ether, ash: direct ashing method, succinic acid: HPLC method. Carbohydrate content was calculated by subtracting the sum of the percentage of moisture, crude protein, crude fat, ash and succinic acid from 100%.

また、FCE 中の加水分解アミノ酸量についても Table 2.3 に示した。動物性タンパク質のカゼインとの比較をおこなった結果、FCE にはグリシン、アルギニンが比較的多く、またプロリンが比較的少なかった (Table 2.3)。また、貝類に一般的に多いとされるタウリンと、シジミに特に多いとされるオルニチンの 2つの遊離アミノ酸についても分析を行い、Table 2.3 に示した。FCE100g 中のタウリンおよびオルニチン量は 69mg と 51mg であった。

シジミには植物ステロールが含まれていることが報告されている (Iritani et al., 1979b)。そのため、FCE 中の植物ステロールとしてブラシカステロール、カンペステロール、スティグマステロールおよび β -シトステロールの 4 種類のステロールの分析を行った。また、コレステロールも併せて分析を行った。その結果を Fig. 2.1、Table 2.4 に示した。分析した 4 種の植物ステロールはす

べて FCE 中に含まれていたが、その中でもカンペステロールが最も多く 3.31 μ mol/g であった。

Table 2.3 Amino acids composition of freshwater clam extract (FCE).

	FCE ¹	Casein ²
	(mg/g Nitrogen)	
Aspartic acid	677 (659 , 696)	460
Threonine	333 (354 , 312)	270
Serine	299 (304 , 295)	340
Glutamic acid	877 (803 , 951)	1400
Glycine	316 (272 , 360)	120
Alanine	332 (315 , 349)	200
Valine	332 (334 , 330)	440
Cystine	58 (68 , 49)	32
Methionine	158 (164 , 152)	200
Isoleucine	289 (275 , 302)	360
Leucine	469 (453 , 486)	620
Tyrosine	249 (240 , 257)	370
Phenylalanine	266 (266 , 266)	340
Histidine	159 (138 , 180)	200
Lysine	462 (455 , 468)	530
Tryptophan	80 (76 , 84)	84
Arginine	428 (416 , 440)	240
Proline	263 (251 , 275)	750
	(mg/100g)	
Taurine	69	—
Ornithine	51	—

¹ Analysis of amino acids other than tryptophan were performed by amino acid analyzer. Tryptophan content was analyzed by HPLC. Analyses of amino acids after hydrolysis were performed in duplicate. Each data were shown in parentheses. Each values represents the mean.

² The data of casein was quoted from *Standard of Food Composition* in Japan, 4th ed

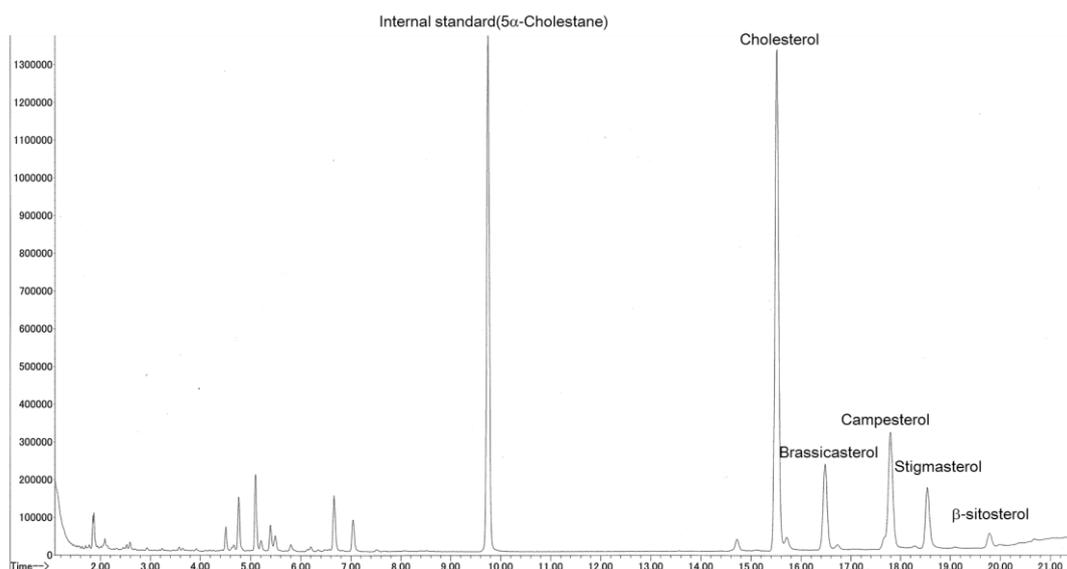


Figure 2.1 Chromatogram of sterol in the freshwater clam extract (FCE)

Sterols in FCE were extracted and trimethylsilylated by the method described by Delany et al. (2003). The sterols as trimethylsilyl esters were analyzed by GC/MS.

Table 2.4 Sterol concentration in the freshwater clam extract (FCE)

Sterol	FCE
	($\mu\text{mol/g}$)
Brassicasterol	1.80
Campesterol	3.31
Stigmasterol	1.42
β -sitosterol	0.33
Cholesterol	8.54

Sterols in FCE were analyzed by GC/MS. Quantification of each sterol was calculated by ratio of the peak area of each sterol to that of internal standard (5α -cholestane).

ラットの初体重、終体重、飼料摂取量、肝臓重量を Table 2.5 に示した。終体重、飼料摂取量および肝臓重量は 2 群間で差は見られなかった。

肝障害の指標である血清 AST、ALT および LD 活性、胆汁鬱滞の指標の 1 つである ALP 活性を Table 2.5 に示した。血清 AST、ALT および LD 活性ともに、対照群と比較して FCE 群では有意に低値を示した。また、ALP 活性においても、FCE 群は、対照群と比べ有意に低値を示した。

血清脂質 (中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸) 濃度を Table 2.5 に示した。血清脂質は、2 群間で有意差は見られなかった。

Table 2.5 Effect of freshwater clam extract (FCE) on food intake, body weight, relative liver weight, serum parameter in rats injected D-galactosamine¹

Group	Control	FCE ²
Initial body weight (g)	122 \pm 3	125 \pm 2
Final body weight (g)	155 \pm 4	162 \pm 3
Food intake (g for 10 days)	126 \pm 2	128 \pm 4
Liver/Body weight (g/100g of body weight)	3.61 \pm 0.08	3.68 \pm 0.12
Serum		
AST (IU/L)	9908 \pm 1028	5321 \pm 892**
ALT (IU/L)	7728 \pm 647	4383 \pm 689**
LD (IU/L)	40280 \pm 5555	17695 \pm 3561**
ALP (IU/L)	2134 \pm 24	1979 \pm 49*
Triacylglycerol (mg/dL)	32.8 \pm 6.8	48.6 \pm 10.6
Total cholesterol (mg/dL)	59.5 \pm 3.6	54.0 \pm 2.6
Phospholipids (mg/dL)	113.2 \pm 3.7	113.4 \pm 5.1
Free fatty acid (mEq/L)	1.21 \pm 0.11	1.05 \pm 0.09

¹ Each value represents the mean \pm standard error of mean (SEM) for the 6-8 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed by Student's t test. *,** Significantly different from each of control ($p < 0.05$ and < 0.01).

² FCE: Freshwater clam extract

2.4. 考察

本節の研究により FCE によって、D-ガラクトサミンの投与によって誘導される血清トランスアミナーゼの上昇が有意に抑制された。このことから、FCE には D-ガラクトサミンによって誘導される肝障害に対し予防効果があることが示唆された。武内ら (1981a) は、セタジミを水溶性画分とヘキサソ可溶性画分に分け、D-ガラクトサミン誘導肝障害に対する効果を検討している。その結果として、水溶性画分または水溶性画分とヘキサソ可溶性画分の併用によって、肝障害予防効果を報告している (武内ら, 1981a)。Hsu ら (2010) は四塩化炭素によって誘導される肝障害に対し FCE が予防効果を示すことを報告している。Peng ら (2008) も FCE が出血性ショックによって誘導される肝障害に対し、予防効果を示すことを報告している。また、FCE は出血性ショックによって誘導される TNF- α の産生を抑制することも報告されている (Lee et al., 2012)。ガラクトサミンによる肝障害を誘発するメカニズムについては、1)ガラクトサミンの代謝過程において UDP-ガラクトサミンとなり、肝臓における UTP の枯渇による RNA およびタンパク質合成の阻害、2)ガラクトサミンが、腸の透過性を増加させ、LPS が取り込まれやすくなり、LPS が TNF- α の産生を誘導し、TNF- α によって肝細胞のアポトーシスが誘導されるという、2つのメカニズムが考えられている (Decker & Keppler, 1974; Stachlewitz et al., 1999)。本節の研究においては、FCE の D-ガラクトサミン誘導肝障害に対する予防効果のメカニズムについての検討は十分に出来ていない。しかしながら、上述のように、出血性ショックによって誘導される肝障害モデルに対する FCE の予防効果のメカニズムと同様に TNF- α の産生を抑制している可能性は考えられる (Lee et al., 2012)。

本試験に使用した FCE にはタンパク質が 57%と多く含まれている (Table 2.2)。Wang ら (1999) は、D-ガラクトサミン誘導肝障害モデルラットにおいて、アミノ酸が及ぼす影響について検討を行っている。その結果、グルタミン、アスパラギン、セリン、ヒスチジン、チロシン、リジン、グリシンに肝障害に対する保護効果があることを明らかにしている (Wang et al., 1999)。これらのアミノ酸について、本節で用いた試験食の比較を行った。FCE の添加量は 2%であり飼料全体としてのアミノ酸組成に影響を及ぼすほどでなく、対照食と FCE 添加食に含まれるアミノ酸組成に明確な差は見られていない (Table 2.3)。そのため、FCE 中のアミノ酸による作用ではないと考えられた。しかし、FCE 中のタンパク質やペプチドがどのような形で存在しているかは、今のところ不明である。そのため、D-ガラクトサミン誘導肝障害に対し、FCE 中のタンパク質またはペプチドが作用しているかどうかを検討することは今後の課題である。また、未発表ではあるが、FCE の水溶性成分に着目して、D-ガラクトサミン誘導肝障害に対する生理活性物質の探索も行った。水溶性成分を等電点電気泳動法により分画する方法 (Hashimoto et al., 2006) が報告されており、FCE の分画を行い、ラットを用いて D-ガラクトサミンによる肝障害予防効果を検討した。その結

果として酸性画分に活性がみられ、さらにその酸性画分を逆相クロマトグラフィーによって分画し特定の画分に活性があることを見出した。活性画分の主要成分を分析したところ、ウリジンおよびウラシルを同定した。ウリジンはD-ガラクトサミン肝障害を予防するという報告もある (Stachlewitz et al., 1999)。しかしながら、市販試薬のウリジンおよびウラシルを混餌投与し、D-ガラクトサミンによって引き起こされる肝障害を予防する効果があるかどうかを検討した結果においては、肝障害予防効果が見られなかったため、FCEの肝障害予防効果はウリジンおよびウラシルによる可能性は低いと考えられた。

また、FCEには7.2%と比較的脂質も多く含まれていた (Table 2.2)。Linら (2012) は、FCEからクロロホルム可溶部と熱水可溶部を調製して、*in vitro* および *in vivo* におけるLPSによって誘導される炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討している。Linら (2012) の報告では、クロロホルム可溶部の収率は8.2%であり、本節のFCEの脂質と同程度である。*In vitro* において、ヒト白血病細胞株および末梢血単核球細胞を用い、また *in vivo* においてラットを用いて、LPSによって誘導されるTNF- α の産生がFCEクロロホルム可溶部で有意に抑制されることを明らかにしている (Lin et al., 2012)。FCE脂質画分がD-ガラクトサミン誘導肝障害モデルラットに対し保護効果を示すかどうか、またその作用メカニズムとしてTNF- α の産生抑制によるかどうか、今後更なる検討が必要である。

本節において、FCEがD-ガラクトサミン誘導肝障害に対し保護効果を示すことが明らかとなった。しかしながら、FCE中の活性化化合物の単離・同定および、そのメカニズムについては明らかにすることが出来ていない。今後、D-ガラクトサミン誘導肝障害モデルや他の肝障害モデルも用いながら、FCEの肝保護作用について活性化化合物の同定およびメカニズムの解明を進めていく必要があると思われる。

第3章

タイワンシジミ抽出物がラットにおける アルコール性脂肪肝およびアルコール代謝に及ぼす影響

3.1. 緒言

前章において、ガラクトサミンによって誘導される肝障害モデルラットを用いたが、その肝障害誘導メカニズムにはいくつかの説があるものの、ガラクトサミンによって腸管の透過性が増加することにより、腸内細菌によって産生されたエンドトキシンである LPS が血中へ移行し、Kupffer 細胞を活性化し、TNF- α の産生が誘導され、肝細胞のアポトーシスが誘導されると考えられている (Stachlewitz et al., 1999)。アルコール摂取によって引き起こされる肝障害のメカニズムの1つとしても、ガラクトサミン誘導肝障害同様に、LPS を介して TNF- α の産生が誘導され肝障害が引き起こされるということがメカニズムの1つとして考えられている (Enomono et al., 1998)。前章において FCE はガラクトサミン誘導肝障害ラットにおいて、AST および ALT 値の上昇を抑制し、肝障害を抑制する効果を有することが示唆された。また、出血性生ショックによって誘導される肝障害ラットにおいても、FCE によって TNF- α の産生が抑制されているという報告もある (Lee et al., 2012)。アルコールによって引き起こされる初期の病変は脂肪肝である。アルコールは、sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1 を介して、fatty acid syntase (FAS) や stearyl-CoA desaturase (SCD) などの脂肪酸合成関連酵素遺伝子の発現を促進することが知られている (You et al., 2002; Yin et al., 2007)。

シジミは、食用としてだけではなく、民間療法、生薬としても用いられてきた。生薬について総合的に記載されたものの中で最も古い書物である本草綱目 (李) には、シジミは「暴熱を去り、目を明にし、小便を利し、熱気、脚気、湿毒を下し、酒毒目黄を解す。浸した汁を服すれば消渴を治す」とある。このようにシジミにはアルコールに対して有効性がある記載があり、加えて、二日酔いのときにシジミ汁が良いなどアルコール代謝に対する効果が伝承的に言われている。しかしながら、アルコール摂取による肝機能障害等に対し、シジミが及ぼす影響について科学的に検討した研究はない。

そこで、我々は、まずアルコール摂取による生体変化に対し FCE がどのような影響を及ぼすのか検討した。特に、アルコール投与により誘導される肝臓脂質の蓄積に及ぼす影響、アルコール投与時の血中アルコール濃度に及ぼす影響についてラットを用いて検討を行った。

3.2. 実験方法

3.2.1. FCE の調製

FCE は、第 2 章 2.2.1. FCE の調製および成分分析に詳細が記載してある方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し殻と肉質部に分けた。肉質部をミートチョッパーで粉碎した後、熱水にて 2 時間攪拌抽出した。抽出液を 80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。

3.2.2. 急性アルコール投与により誘発される脂肪肝に及ぼす影響

3.2.2.1. 実験動物

Wistar 系雄性ラットではエタノールによる肝臓への脂肪の蓄積がされず、Donryu 系ラットではエタノールの急性経口投与によって血清脂質の上昇および肝臓への脂質の蓄積が引き起こされることが報告されている (Mochizuki and Yoshida, 1991)。そのため、4 週齢の Donryu 系雄性ラット (日本エスエルシー(株)：静岡) をアルコール投与により誘導される脂肪肝に対する影響を検討するために用いた。室温 23±1°C、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるために市販固形飼料 (MF：オリエンタル酵母工業(株)) で 2 日間、半合成飼料 (Table 3.1 中の対照食) で 3 日間、予備飼育した後に試験に供した。1 群 5 匹の 2 群とした。試験食を Table 3.1 に示した。対照群は 25% カゼイン食とし、FCE 群は、対照食のショ糖のうち一部を FCE に置き換えた (Table 3.1)。

試験食の投与開始 10 日目に、25% (w/v) エタノール水溶液を 20mL/kgB.W. (エタノールとして 5g/kg BW) となるようにゾンデを用いて強制経口投与した。エタノール投与後、絶食させた。絶食開始から 16 時間後にエーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血した後、肝臓を得た。

Table 3.1 Compositions of diets for the animal experiment of the effect of freshwater clam extract (FCE) on fatty liver in rats induced by alcohol.

	Control	FCE
	<i>g/kg</i>	
Casein	250.0	250.0
Sucrose	465.0	445.0
Dextrin	200.0	200.0
Cellulose	30.0	30.0
Soy bean oil	10.0	10.0
AIN-76 mineral mixture	35.0	35.0
AIN-76 vitamin mixture	10.0	10.0
FCE	—	20.0

3.2.2.2. 生化学分析

採血後、血液を室温に 30 分間放置した後、遠心分離 (1,500×g, 10 分間) することによって血清を得た。血清中 AST、ALT、LD、ALP 活性、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸を市販キットを用いて測定した。血清中 AST、ALT、LD、ALP 活性の測定キットとして、それぞれデタミナーAST II、デタミナーALT II、デタミナーLD、デタミナーALP (すべて協和メディックス(株))を用いた。血清中の中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸をそれぞれ TG-EN カイノス (カイノス(株))、T-CHO カイノス (カイノス(株))、リン脂質-C テストワコー (和光純薬(株))、NEFA 試薬 B (シスメックス国際(株)) を用いて測定した。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

3.2.3. アルコール投与時の血中アルコール濃度に及ぼす影響

3.2.3.1. 実験動物

5 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 23±1°C、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるために市販固形飼料 (5L37: 日本エスエルシー(株)) で 3 日間、半合成飼料 (Table 3.2

中の対照食) で4日間、予備飼育した後に試験に供した。1群6匹の2群とした。試験食を Table 3.2 に示した。対照群は20%カゼイン食とし、FCE群は、対照食のタンパク質を全てFCEのタンパク質で置き換えて、タンパク質の割合を対照食と等しくした飼料とした。カゼイン中のタンパク質が82.65%であったので、対照食である20%カゼイン食の飼料中のタンパク質は16.53%となる。FCEのタンパク質が57.0% (Table 2.2) であるため、飼料中にFCEを29%混合した (Table 3.2)。

Table 3.2 Compositions of diets for the animal experiment of the effect of freshwater clam extract (FCE) on alcohol metabolism in rats administered with ethanol.

	Control	FCE
	<i>g/kg</i>	
Casein	200.0	—
Corn starch	437.0	390.0
Sucrose	218.0	195.0
Cellulose	50.0	50.0
Corn oil	50.0	30.0
AIN-93G mineral mixture	35.0	35.0
AIN-93 vitamin mixture	10.0	10.0
FCE	—	290.0

試験食の投与開始13日目に絶食させ、絶食15時間後に、20% (w/v) エタノール水溶液を10mL/kgB.W. (エタノールとして2g/kg BW) となるようにゾンデを用いて強制経口投与した。エタノール投与1時間後から11時間後まで1時間毎に尾静脈から採血し、血中エタノール濃度の測定に用いた。採血終了後、エーテル麻酔下で開腹し、肝臓及び各脂肪組織を得た。

3.2.3.2. 生化学分析

ヘパリン処理した毛細管によって採血した44.7 μ Lの血漿に0.4mLの0.33mol/L過塩素酸水溶液を加え、遠心分離(1,500 \times g, 2分間)して上清を用いた。Fキットエタノール(J.K.インターナショナル製)を用いてエタノール濃度を測定した。エタノール投与後の血中エタノール濃度-時間曲線下面積(area under the ethanol concentration-time curve: AUC)を台形法によって算出した。

3.2.4. 統計解析

動物実験において2群間の統計的有意差の検定は、Studentの*t*-検定により行った ($p < 0.05$ or

0.01)。

3.3. 結果

3.3.1 急性アルコール投与により誘発される脂肪肝に及ぼす影響

ラットの初体重、終体重、飼料摂取量、肝臓重量を Table 3.3 に示した。終体重、飼料摂取量および肝臓重量は2群間で差は見られなかった。

血清パラメーターおよび肝臓脂質を Table 3.3 に示した。肝障害の指標である血清中 AST、ALT および LD 活性は、2群間で差が見られなかった。また、胆汁鬱滞の指標である ALP 活性も2群間で差は見られなかった。

Table 3.3 Effect of freshwater clam extract (FCE) on food intake, body weight, relative liver weight, serum parameter and hepatic lipids in rats administered with ethanol¹

	Control	FCE ²
Initial body weight (g)	142 ± 2	142 ± 2
Final body weight (g)	221 ± 2	223 ± 4
Food intake (g for 10 days)	210 ± 6	211 ± 6
Liver weight (g/100g of body weight)	4.84 ± 0.18	4.49 ± 0.10
Serum		
AST (IU/L)	136.6 ± 16.6	126.4 ± 10.3
ALT (IU/L)	26.6 ± 1.4	25.2 ± 2.7
LD (IU/L)	1985 ± 522	1608 ± 255
ALP (IU/L)	840 ± 52	834 ± 52
Triacylglycerol (mg/dL)	61.0 ± 20.1	60.2 ± 6.2
Total cholesterol (mg/dL)	108.2 ± 3.8	106.2 ± 2.5
Phospholipids (mg/dL)	191.2 ± 6.5	191.6 ± 3.3
Free fatty acid (mEq/L)	0.98 ± 0.09	1.00 ± 0.08
Liver		
Total lipids (mg/g liver)	122.2 ± 14.8	93.7 ± 7.8
Triacylglycerol (mg/g liver)	93.0 ± 16.7	57.7 ± 9.1
Cholesterol (mg/g liver)	5.23 ± 0.21	4.19 ± 0.17**
Phospholipids (mg/g liver)	27.4 ± 0.6	27.6 ± 0.6

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed by Student's t test. ** Significantly different from each of control ($p < 0.05$ and < 0.01).

² FCE: Freshwater clam extract

血清脂質（総コレステロール、中性脂肪、リン脂質および遊離脂肪酸）については、2群間で有意な差は見られなかった。有意差はみられなかったものの肝臓総脂質および中性脂肪は、それぞれ FCE 群は対照群の 76.7% ($p = 0.127$)、62.0% ($p = 0.101$)と低値を示す傾向にあった。肝臓中コレステロールは FCE 群において対照群と比べ有意に低値を示した (Table 3.3)。

3.3.2. 血中エタノール濃度に及ぼす影響

ラットの初体重、終体重、飼料摂取量、組織重量を Table 3.4 に示した。終体重、飼料摂取量は 2 群間で差は見られなかった。終体重に有意差は見られなかったものの、体重増加量は、対照群と比較して FCE 群で有意に高値を示した (対照群 : 63.7 ± 2.5 g for 13 days、FCE 群 : 71.3 ± 1.9 g for 13 days、 $p < 0.05$)。また、対照群と比較して FCE 群の肝臓の重量は有意に増加し、各脂肪組織（副腎丸周囲、腎周囲および腹部）重量は有意に減少した。

Table 3.4 Effect of freshwater clam extract (FCE) on food intake, body weight, relative organ weight in rats for 14 days¹

	Control	FCE ²
Initial body weight (g)	141 ± 2	141 ± 2
Final body weight (g)	205 ± 4	213 ± 5
Food intake (g for 13days)	210 ± 5	220 ± 4
Relative organ weight (g/100g of body weight)		
Liver	3.19 ± 0.03	3.37 ± 0.03**
Adipose tissue		
Epididymal	1.67 ± 0.06	1.47 ± 0.05*
Perirenal	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.02*
Abdominal	0.75 ± 0.03	0.60 ± 0.06*

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed by Student's t test. *,** Significantly different from each of control ($p < 0.05$ and < 0.01).

² FCE: Freshwater clam extract

試験食での飼育開始後 13 日目にエタノールを強制胃内投与した後の血中エタノール濃度の経時変化を Fig. 3.1 に示した。投与 2 時間後には FCE 群で対照群と比較して有意に血中エタノール濃度が高値を示したが、その後、投与 5 時間後以降は血中エタノールが消失するまで、測定時全てにおいて、対照群と比較して FCE 群が有意に低い値を示した。また、FCE 群ではエタノール投与後 10 時間後には血中エタノールが消失した。しかし、対照群では、血中エタノールが 11 時間後においても検出された。また、血中エタノール濃度の AUC は対照群と比較して、FCE 群で有意に低値を示した。

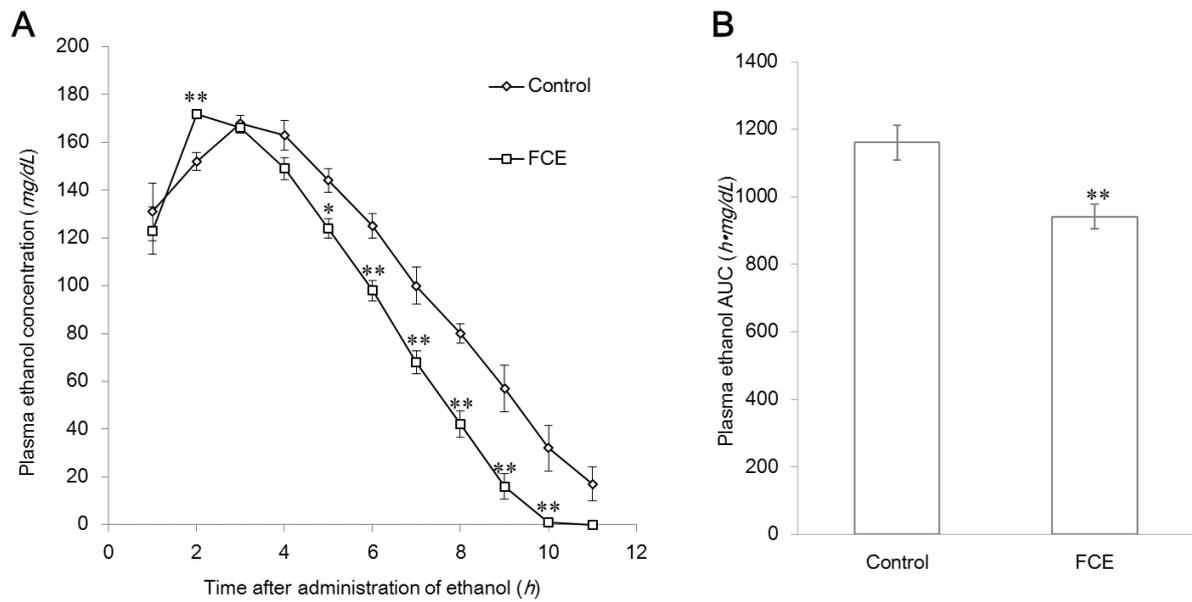


Figure 3.1 Effect of freshwater clam extract (FCE) on (A) plasma ethanol concentration and (B) area under the plasma ethanol concentration-time curve in rats administered with ethanol.

Each data are shown as mean \pm SEM for 6 rats in each dietary group. *, ** The statistical differences among the values were analyzed by Student's t test. *, ** Significantly different from each of control ($p < 0.05$ and < 0.01). FCE: freshwater clam extract.

3.4 考察

本章の研究において、FCE を投与することで、エタノールを急性経口投与したラットの肝臓脂質の蓄積が低値を示す傾向にあり、肝臓コレステロール値が有意に低値を示した。このことから、FCE はエタノールによって誘導される肝臓脂質の蓄積を抑制する可能性が示唆された。また、FCE を投与することで、エタノールを急性経口投与したラットにおいて血中エタノール濃度の低下速度を速めること、血中エタノールの AUC が減少することが確認された。このことから、FCE はエタノール代謝促進効果があるものと考えられた。

エタノールの摂取は脂肪酸・中性脂肪合成系の転写因子である SREBP1 を介して、肝臓の脂肪酸の蓄積を促進することが報告されている (You et al., 2002; Yin et al., 2007)。エタノール投与モデルではないが、我々は、FCE が健常ラットにおいて FAS や SCD などの脂肪酸合成系遺伝子の発現を、SREBP1 を介して抑制している可能性を示した (Laurent et al., 2013)。

一般的にシジミには、タウリンやオルニチンなどの遊離アミノ酸が多く含まれているとされている。タウリンおよびオルニチンについては、脂質代謝改善効果が報告されている (Kerai et al., 1998; Cantafora et al., 1986; Choi et al., 2006; Hunold, 1973; Wotzka & Weber, 1972; Melzer et al., 1969)。FCE 中のアミノ酸分析の結果、タウリンは 69mg/100g、オルニチンは 51mg/100g であった (Table 2.3)。本章では 2 つの独立した動物実験を行っており、エタノール急性経口投与によって誘導される脂肪肝に対する検討においては、飼料への FCE の添加量は、2%とし、一方でエタノール急性経口投与ラットにおけるエタノール代謝の検討においては、飼料への FCE の添加量が 29%としている。これらのことから算出すると、飼料 100g 中のタウリン量は、1.38mg または 20.01mg、オルニチン量は、1.02mg または 14.79mg であり、非常に少ない量しか含まれていない。そのため、FCE のエタノールによって誘導される脂肪肝に対する抑制効果およびエタノール代謝促進効果におけるタウリンおよびオルニチンの寄与は低いものと考えられる。

武内らは、セタシジミを水溶性画分とヘキサソ可溶性画分に分け、効果は低いものの、水溶性画分とヘキサソ可溶性画分の併用によって、エタノールによって誘導される脂肪肝に対する有効性を示唆する結果を示している (武内ら, 1981a)。また、武内らは、セタシジミ中の生理活性物質を探索した結果として、2-Octadecenoic acid の α,α' -および α,β -diglyceride であることを示している (武内ら, 1981b)。本節で使用した FCE はタイワンシジミを熱水で抽出し粉末化したものであるが、一般成分分析の結果から、粗脂肪が約 7%と多く含まれていた (Table 2.2)。そのため、FCE のアルコールに対する脂肪肝予防効果も、2-Octadecenoic acid の diglyceride である可能性が考えられる。FCE の脂質に含まれる脂肪酸組成について分析を行った (Table 4.2.2)。脂肪酸分析は、mono, di, triglyceride を加水分解して脂肪酸エステルとして分析している。しかしながら、外部標準として

は、食品に含まれる一般的な脂肪酸を対象とした Spelco® 37 FAME mix (Cat. No.47885-U, Sigma-Aldrich, Inc.) を使用している。そのため、2-Octadecenoic acid は分析対象の脂肪酸に含まれておらず、FCE 中にどの程度含まれているかは不明である。

今後、FCE のエタノール代謝促進効果およびエタノールによって引き起こされる肝臓への脂肪蓄積の抑制効果について、活性化化合物およびその作用メカニズムについて詳細な検討が必要であると考えられる。

第4章

タイワンシジミ抽出物が食餌性高コレステロール血症に及ぼす影響およびその活性化合物の探索

第1節

タイワンシジミ抽出物が食餌性高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響

4.1.1. 緒言

アルコールの摂取は肝臓からの very low-density lipoprotein (VLDL) の分泌を抑制することが報告されており (Venkatesan et al., 1988)、コレステロール恒常性が破綻し、肝臓コレステロールの蓄積、高コレステロール血症を誘導することが報告されている (Wang et al., 2010)。第3章において、我々はアルコール投与によって引き起こされる肝臓への脂肪蓄積に対する FCE の効果を検討した。その結果、FCE による肝臓コレステロールの低下作用が見られた。この結果から、FCE は肝臓におけるコレステロールを含む脂質代謝を促進する可能性が考えられた。

いくつかの貝類が有するコレステロール低下作用について報告されている (Iritani et al., 1979a; Lin et al., 1984; Tanaka et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Yanagita et al., 1991; Childs et al., 1987; Vanouny et al., 1981)。ヤマトシジミは高コレステロール食を摂食させたラットの脂質代謝を促進することが報告されている (Iritani et al., 1979b; Iritani et al., 1980)。入谷らは、可食部 (Iritani et al., 1979b) および可食部から抽出した中性脂肪 (Iritani et al., 1980) を用いて、ヤマトシジミに血清および肝臓コレステロールおよび中性脂肪を低下させる効果があることを報告している。特に、ヤマトシジミに含まれるステロール (24-メチレンコレステロールおよび β -シトステロール) がコレステロール吸収を阻害する可能性を示している (Iritani et al., 1979b)。しかしながら、シジミが胆汁酸代謝に及ぼす影響に関する研究は多くない。

そこで、我々は、FCE が有するコレステロール低下作用について、一般的に広く用いられている高コレステロール血症モデルであり高 VLDL 血症を示す高コレステロール食を与えたラットを用いて検討を行った。

4.1.2. 実験方法

4.1.2.1. 試料の調製

FCE は、第 2 章 2.2.1. FCE の調製および成分分析に詳細記載の方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し開口させ肉質部を取り出した。肉質部をミートチョッパーで粉碎し、熱水にて 2 時間攪拌抽出した後、80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。

4.1.2.2. 実験動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 23±1℃、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (5L37 : 日本エスエルシー(株)) で 3 日間、20% カゼイン食の半合成飼料で 4 日間飼育した後に試験に供した。1 群 6 匹の 4 群とした。試験食を Table 4.1.1 に示した。対照群は 20% カゼイン食に 0.5% コレステロールと 0.25% コール酸ナトリウムを添加した高コレステロール食群とし、FCE 群は、3%、15%、30% の FCE を添加し、高コレステロール食のカゼイン及びショ糖で置き換えた。全ての飼料中のタンパク質は同量となるようにした。

Table 4.1.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the cholesterol-lowering effect of freshwater clam extract (FCE) in rats fed a high-cholesterol diet.

	Control	3% FCE	15% FCE	30% FCE
	<i>g/kg</i>			
Casein	200.0	180.0	100.0	—
Sucrose	637.5	627.5	587.5	537.5
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0
Lard	100.0	100.0	100.0	100.0
AIN-76 mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-76 vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0
Cholesterol	5.0	5.0	5.0	5.0
Sodium cholate	2.5	2.5	2.5	2.5
FCE	—	30.0	150.0	300.0

試験食の投与開始 14 日目の 18:00 から 4 時間絶食した。22:00 にエーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血した後、肝臓を得た。肝臓は直ちに凍結して、分析まで冷凍保管した。また、試験食投与の最後の 3 日間に糞を採取した。

4.1.2.3. 生化学分析

採血後、血液を室温に 30 分間放置した後、遠心分離 (1,500×g, 10 分間) することによって血清を得た。血清中 AST、ALT、ALP 活性、直接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸は以下の市販キットを用いて測定した。AST、ALT、ALP 活性の測定に、それぞれデタミナーAST II、デタミナーALT II、デタミナーALP (すべて協和メディックス(株))を用いた。直接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸の測定には、イアトロ LQ-BIL (三菱化学メディエンス(株))、TG-EN カイノス (カイノス(株))、T-CHO カイノス (カイノス(株))、リン脂質-C テストワコー (和光純薬(株))、NEFA 試薬 B (シスメックス国際(株))を用いた。血清中 LDL コレステロールは、血清をアガロースゲル電気泳動で分画し、その後、酵素法によって染色して測定した。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

採取した糞を、凍結真空乾燥した。乾燥した糞を中性ステロールおよび胆汁酸の分析に用いた。中性ステロールは Delaney らの方法 (2003) により抽出し、TMS 化した。内部標準として 5 α -コレスタンを用いた。TMS 化したサンプルを GC/MS (GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー(株)) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度: 300°C、ディテクタ温度: 230°C、カラム: 30m×0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー(株))、カラム温度: 245°C で 2 分間保持、その後 300°C まで 2°C/分 で昇温させた。胆汁酸は、Sheltawy および Lowsky の方法 (1975) により酵素法で測定し、リトコール酸を標準として用いた。

肝臓中 cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1)、liver X receptor (LXR)、small heterodimer partner (SHP)、hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4)、apolipoprotein (apo) A-I および apoE mRNA 量をノーザンブロット法で測定した。Chomczynski および Sacchi の方法 (1987) で肝臓中 RNA を抽出した。20 μ g の RNA をノーザンブロット法による分析に用いた。Megaprime DNA ラベリングシステム (アマシャム(株)) でラット CYP7A1、ラット LXR、ラット SHP、ラット HNF-4、ラット apoA-I およびマウス apoE の cDNA を標識し、ハイブリダイゼーションを行い、イメージアナライザー (BAS 2000, 富士フィルム(株))を用いて測定した。apoE mRNA 量はこの動物モデルでは変化しないことが分かっている (Oda et al., 1995; Yoshida et al., 1996)。そのため apo E mRNA を内部標準として用いた。

4.1.2.4. 統計解析

一元配置分散分析法を用いて有意差が見られた場合に、Tukey (1949) の多重分析により群間の有意差検定を行った。

4.1.3. 結果

ラットの初体重、終体重、飼料摂取量、肝臓重量を Table 4.1.2 に示した。飼料摂取量および肝臓重量は 4 群間で差は見られなかった。しかし終体重は 15%および 30%FCE 群において対照群に比べ有意に増加した。

胆汁鬱滞の指標となる血清中直接ビリルビン量、ALP 活性について Table 4.1.2 に示した。直接ビリルビンおよび ALP 活性は、15%、30%FCE 群において対照群と比較して有意に低値を示した。肝障害の指標となる AST 及び ALT 活性については 4 群間で差がなかった (Table 4.1.2)。

Table 4.1.2 Effect of freshwater clam extract (FCE) on food intake, body weight, relative liver weight, serum parameter and hepatic lipids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Control	3%FCE ²	15%FCE	30%FCE
Initial body weight (g)	109 ± 1	109 ± 1	109 ± 1	109 ± 1
Final body weight (g)	182 ± 3 ^a	188 ± 1 ^{ab}	194 ± 3 ^b	193 ± 2 ^b
Food intake (g for 14 days)	201 ± 5	199 ± 2	213 ± 5	212 ± 4
Liver (g/100g of body weight)	4.88 ± 0.09	5.14 ± 0.05	5.12 ± 0.15	4.81 ± 0.07
Serum				
Direct bilirubin (mg/dL)	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^{ab}	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
AST (IU/L)	97.7 ± 7.0	98.2 ± 12.2	86.3 ± 4.1	80.0 ± 3.8
ALT (IU/L)	53.3 ± 4.2	53.0 ± 5.1	45.5 ± 3.5	44.0 ± 3.2
ALP (IU/L)	2429 ± 61 ^c	2283 ± 87 ^c	2003 ± 43 ^b	1636 ± 28 ^a
Triacylglycerol (mg/dL)	11.2 ± 1.5 ^a	20.0 ± 2.6 ^{ab}	32.0 ± 4.2 ^{bc}	42.8 ± 5.2 ^c
Total cholesterol (mg/dL)	395.0 ± 14.7 ^c	369.8 ± 17.2 ^c	173.0 ± 8.7 ^b	102.5 ± 3.0 ^a
LDL-cholesterol (mg/dL)	323.5 ± 12.4 ^c	295.5 ± 15.2 ^c	117.8 ± 6.4 ^b	50.7 ± 2.1 ^a
Phospholipids (mg/dL)	173.5 ± 6.9 ^b	179.3 ± 5.3 ^b	136.5 ± 6.6 ^a	120.8 ± 4.5 ^a
Free fatty acid (mEq/L)	1.42 ± 0.07 ^b	1.59 ± 0.06 ^b	1.02 ± 0.08 ^a	0.86 ± 0.06 ^a
Liver				
Total lipids (mg/g liver)	183.2 ± 3.4 ^b	174.7 ± 8.6 ^b	168.6 ± 2.6 ^b	139.0 ± 6.8 ^a
Triacylglycerol (mg/g liver)	64.6 ± 2.5	63.8 ± 7.1	74.7 ± 3.7	60.9 ± 4.6
Cholesterol (mg/g liver)	19.68 ± 1.99 ^b	15.26 ± 0.81 ^a	13.68 ± 0.42 ^a	11.91 ± 0.33 ^a
Phospholipids (mg/g liver)	26.4 ± 0.9 ^{ab}	26.9 ± 0.5 ^a	25.4 ± 0.6 ^{ab}	24.2 ± 0.6 ^b

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way analysis of variance (ANOVA) and then by Tukey's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

血清脂質量を Table 4.1.2 に示した。血清総コレステロール、LDL コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸は 3%FCE 群では対照と比較して差は見られなかったが、15%および 30%FCE 群では、

対照群と比較して有意に低値を示した。また、血清中性脂肪は、15%および30%FCE群において、有意に高値を示した。

肝臓脂質量を Table 4.1.2 に示した。肝臓総脂質は、対照群と比較して30%FCE群のみで有意に低値を示し、3%および15%FCE群では有意差は見られなかった。肝臓中性脂肪において、群間差は見られなかった。肝臓コレステロールは全てのFCE投与群において、対照群と比較して有意に低値を示した。肝臓リン脂質はFCE投与群において、対照群と比較すると有意差は見られなかった。

3日間の糞の排泄量および中性ステロール(コレステロール、コプロスタノールおよびコプロスタノンの合計)排泄量および胆汁酸排泄量を Table 4.1.3 に示した。糞の排泄量は飼料中へのFCE含有量依存的に有意に増加した。中性ステロールおよび胆汁酸は3%FCE群では対照群と有意差がなかったが、15%および30%FCE群では対照群と比較して有意に排泄量が増加した。

Table 4.1.3 Effect of freshwater clam extract (FCE) on fecal dry weight, neutral sterol and bile acids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Control	3%FCE ²	15%FCE	30%FCE
Fecal dry weight (g/3 d)	0.78 ± 0.08 ^a	1.25 ± 0.03 ^b	2.39 ± 0.09 ^c	3.53 ± 0.12 ^d
Cholesterol (μmol/3 d)	7.96 ± 1.18 ^a	10.6 ± 1.9 ^a	123 ± 12 ^b	174 ± 18 ^c
Coprostanol (μmol/3 d)	2.06 ± 0.75 ^a	5.68 ± 2.36 ^{ab}	1.96 ± 0.74 ^a	8.64 ± 0.77 ^b
Coprostanone (μmol/3 d)	0 ^a	0.218 ± 0.102 ^{ab}	0.0900 ± 0.0573 ^{ab}	0.341 ± 0.071 ^b
Total neutral sterols ³ (μmol/3 d)	10.0 ± 0.9 ^a	16.5 ± 1.0 ^a	125 ± 12 ^b	183 ± 17 ^c
Total bile acids (μmol/3 d)	241 ± 28 ^a	333 ± 29 ^a	441 ± 17 ^b	597 ± 22 ^c

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Tukey's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

³ Total neutral sterols = cholesterol + coprostanol + coprostanone.

また、糞中への植物ステロールの排泄量と飼料中のFCE含量の相関を Fig. 4.1.1 に示した。全ての植物ステロールにおいてR²が0.85以上であり、飼料中のFCE含量と強い相関を示した。そのため、糞中の植物ステロールはFCE由来である可能性を確認するため、FCE中の植物ステロール量を測定した。その結果を Table 2.4 および Fig. 2.1 に示した。ブラシカステロール、カンペステロール、スティグマステロールおよびβ-シトステロールの4種類の植物ステロールがFCE中に含まれていた。

コレステロール異化代謝の律速酵素であるCYP7A1のmRNA量は対照群と比較して15%FCE群で有意差はないものの高値を示す傾向にあり、30%FCE群で有意に高値を示した (Fig. 4.1.2)。CYP7A1の負の調節因子であるSHPのmRNA量は全ての群間で差が見られなかった。CYP7A1

の正の調節因子である HNF-4 および LXR mRNA 量を Fig. 4.1.2 に示した。HNF-4 mRNA 量は FCE の飼料への添加量依存的に増加し、15%および 30%FCE 群で有意に高値をしめした。一方で、LXR mRNA 量は群間で有意な差は見られなかった。また、apoA-I mRNA 量も群間で有意な差がみられなかった (Fig. 4.1.2)。

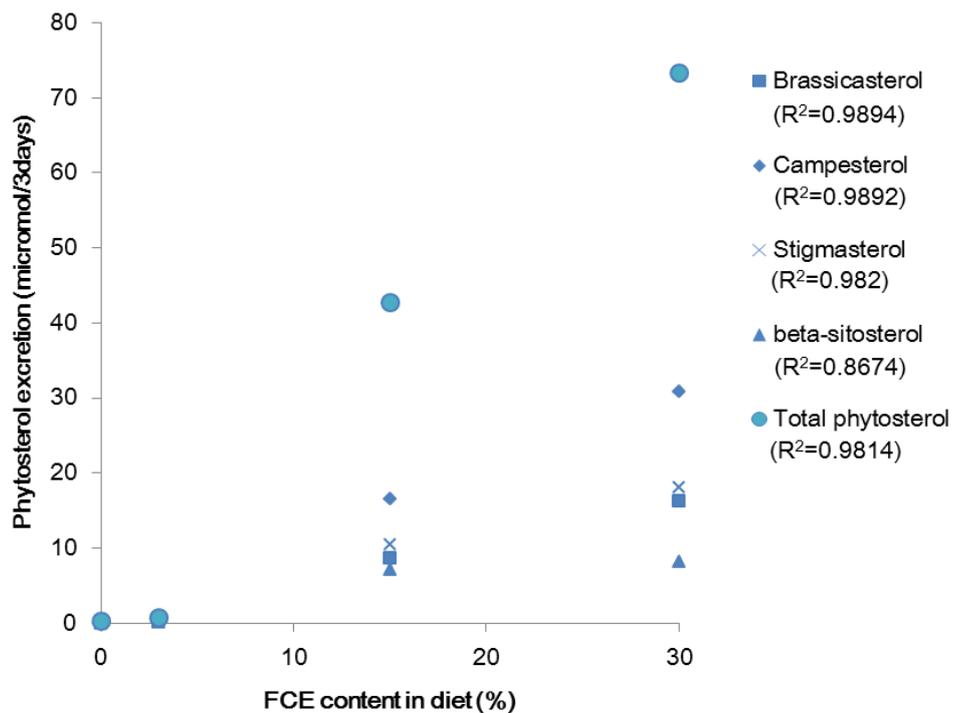


Figure 4.1.1 Correlation between freshwater clam extract (FCE) content in diet and fecal excretion of phytosterols in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days.

Each value represents the mean for the 6 rats in each dietary group. Total phytosterols = brassicasterol + campesterol + stigmasterol + β -sitosterol.

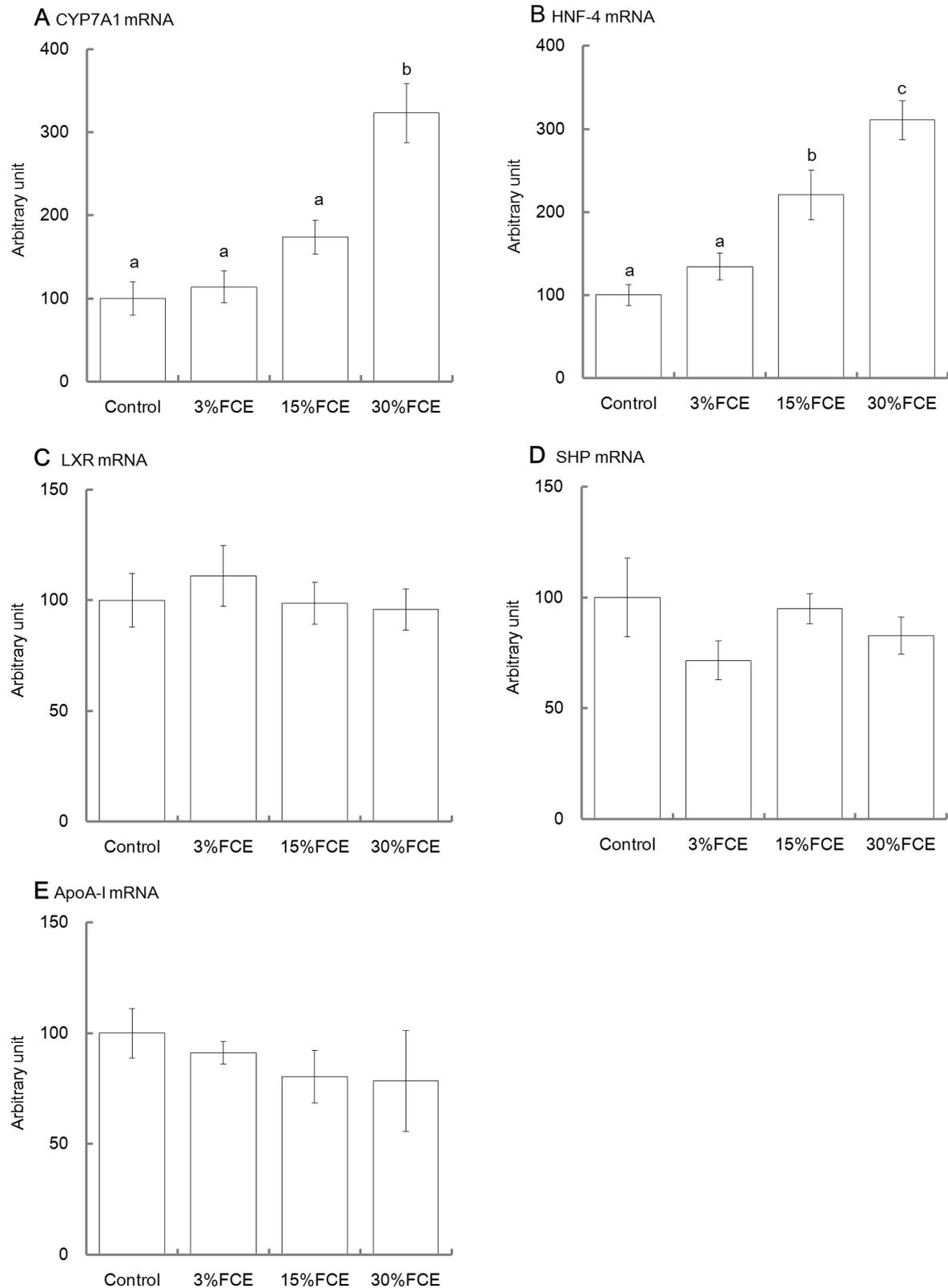


Figure 4.1.2 Effect of freshwater clam extract (FCE) on hepatic (A) CYP7A1, (B) HNF-4, (C) LXR, (D) SHP and (E) ApoA-I mRNA in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Tukey's multiple-range test. In each graph, different letters (a,b,c) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). FCE: Freshwater clam extract

4.1.4. 考察

Iritani ら(1979b)は高コレステロール食を摂食させたラットにおいてシジミを投与するとコレステロールレベルが低下することを示している。我々は、本節において高コレステロール食を摂食させたラットに対し FCE が血中および肝臓コレステロールレベルを低下させることを明らかにした。Iritani ら(1979b)はまた、シジミ中にコレステロールの吸収を阻害するいくつかのステロールが含まれていることを示している。それゆえ、Iritani らは、シジミのコレステロール低下作用のメカニズムはコレステロール吸収の拮抗阻害 (1979b) による可能性を示唆している。FCE 群において糞中の植物ステロール排泄量は、投与量依存的に増加した (Fig. 4.1.1)。また、糞中中性ステロール排泄量も、FCE 投与量依存的に増加した (Table 4.1.3)。しかしながら、FCE 中の植物ステロールが、血清および肝臓コレステロールレベルを低下させるに十分な量を含んでいるか否かは明らかではなかった。Sugano ら (1976) は高コレステロール食によって誘導した高コレステロール血症モデルラットにおける植物ステロールの投与量依存性の検討を行っている。Sugano ら (1976) の研究結果に基づくと、本節において用いた 30%FCE 食は肝臓コレステロールレベルを低下させる量は含んでいるものの、血清コレステロールレベルを低下させる量ではなかった。加えて、3%および 15%FCE 食には、血清および肝臓コレステロールレベルどちらにおいても低下させるには十分な量が含まれていなかった。このことから、FCE に含まれる植物ステロールのコレステロール低下作用は強くない可能性が示唆された。しかしながら、FCE を含む飼料を投与することにより、ラットにおいて糞中への中性ステロール排泄量は、劇的に増加した (Table 4.1.3)。これらの結果から、FCE 中には植物ステロール以外にも、糞中中性ステロール排泄促進作用を持つ成分が存在する可能性が考えられた。

本節の研究において、FCE 群では中性ステロールのみならず、糞中への胆汁酸排泄量も増加した (Table 4.1.3)。植物ステロールが、糞中への胆汁酸排泄を促進することは知られていない (Subbiah, 1973; Raicht et al., 1975; Sugano et al., 1976)。FCE は、コレステロール低下作用に寄与している胆汁酸代謝に影響を及ぼしていると考えられた。Tanaka ら (2003) は、カキが糞中への中性ステロールおよび胆汁酸排泄を促進することを報告している。カキのコレステロール低下作用は、腸管における胆汁酸ミセル形成の阻害によると考えられている (Tanaka et al., 2003)。我々は、本節において外因性高コレステロール血症モデルにおいて、FCE によって胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 遺伝子が増加することを明らかにした (Fig. 4.1.2)。このことは、FCE による血清コレステロール低下作用の要因の 1 つであるかもしれない。いくつかの転写因子が CYP7A1 の転写調節に重要な役割を果たしていることが報告されている (Chiang, 2002)。CYP7A1 遺伝子の発現は SHP を介して胆汁酸によって、負の調節を受け、一方で HNF-4 や LXR は正に調節している

(Chiang, 2002)。FCE 投与群における CYP7A1 遺伝子発現の誘導は、SHP mRNA レベルの変動を介さず起きていた (Fig. 4.1.2)。加えて、本節において我々は、CYP7A1 遺伝子の発現がどのように誘導されているのかを明らかにするために、HNF-4 および LXR の mRNA レベルを測定した (Fig. 4.1.2)。Direct repeat (DR) 4 に結合し CYP7A1 遺伝子の転写を促進することが報告されている LXR (Lehmann et al., 1997) の遺伝子発現は、FCE によって変動しなかった。HNF-4 遺伝子は、外因性高コレステロール血症モデルにおいて FCE によって増加した (Fig. 4.1.2)。HNF-4 は胆汁酸応答領域 (BARE) -II に存在する DR1 シーケンスに結合して、CYP7A1 プロモーター活性を促進する (Crestani et al., 1998; Stroup and Chiang, 2000)。FCE による CYP7A1 遺伝子の発現誘導は、HNF-4 遺伝子発現の誘導を介している可能性が考えられた。HNF-4 はまた、HDL の主要なアポリポタンパク質である apoA-I も調節している (Harnish et al., 1996)。しかしながら、本節の研究において、HNF-4 遺伝子の発現は上昇したものの、apoA-I mRNA 量に対する FCE の影響はなかった (Fig. 4.1.2)。これらの結果から、CYP7A1 遺伝子の発現を誘導する他のメカニズムが存在する可能性が考えられた。そのため、さらに他のメカニズムを検討する必要がある。

本節において、FCE はコレステロール低下作用を示すことを明らかにした。また、そのメカニズムとして FCE 中に含まれるいくつかの植物ステロールによるコレステロール吸収の拮抗阻害のみならず、他の成分によるコレステロール排泄および異化代謝の促進も考えられた。特に、コレステロールの胆汁酸への異化代謝は CYP7A1 の誘導を介していると考えられた。

第2節

タイワンシジミ抽出物の脂質成分および分離タンパク質成分が食餌性高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響

4.2.1. 緒言

本章第1節において、FCEは高コレステロール食を摂食させたラットに対し、強いコレステロール低下作用を示すことを明らかにした (Table 4.1.2)。また FCE のコレステロール低下作用の作用メカニズムとして、糞中への中性ステロール及び胆汁酸の排泄の増加および肝臓の CYP7A1 遺伝子の発現促進の可能性を示した (Table 4.1.3, Fig. 4.1.2)。しかしながら、FCE のコレステロール低下作用について説明できる成分の特定には至っていない。

貝類はいくつかの植物ステロールや貝類特有のステロールを含むことが報告されている (Iritani et al., 1979b; Kritchevsky et al., 1967; Vahouny et al., 1981)。これらのステロールは腸管においてコレステロール吸収を阻害することが良く知られている (Iritani et al., 1979b; Vahouny et al., 1981; Sugano et al., 1976; Uchida et al., 1984; Plösch et al., 2006)。加えて、入谷ら (1976b) は、ヤマトシジミのコレステロール低下作用が、コレステロール吸収を阻害する植物ステロールに由来する可能性を示唆している。しかしながら、前節で示したように、他の植物ステロールのコレステロール低下作用に関する研究の結果と比較すると、FCE のコレステロール低下作用を説明するのに十分な植物ステロールは含まれていなかった (Table 2.4)。さらに、作用メカニズムとしても植物ステロールだけでは十分な説明をすることが出来なかった。我々は、FCE は糞中への胆汁酸排泄量を促進し、また CYP7A1 遺伝子の発現を促進することを明らかにしている (Table 4.1.3, Fig. 4.1.2)。しかしながら、植物ステロールは胆汁酸排泄および CYP7A1 遺伝子の発現には影響しないとされている (Uchida et al., 1984; Plösch et al., 2006)。

また、入谷ら (1980) は、ヤマトシジミの中性脂肪がコレステロール低下作用を示すことも示している。そのヤマトシジミ中の中性脂肪のコレステロール低下作用を示す成分について多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の可能性を示している (Iritani et al., 1980)。しかしながら PUFA の作用メカニズムは不明な点も多い。Morise ら (2004) はハムスターにおいて PUFA を多く含む亜麻仁油は、飽和脂肪酸と比較して CYP7A1 活性および遺伝子発現が上昇させることを報告している。一方で、De Schrijver ら (1992) はラットにおいて n-3 系 PUFA の多い魚油食が、牛脂食と比較して糞中への中性ステロールの排泄量は増加させるものの、胆汁酸排泄には影響しないことを示している。さらに、Høstmark ら (1989) は、様々な脂質が糞中への中性ステロールと胆汁酸への排泄に及ぼ

す影響を検討した結果、PUFA は影響を及ぼさないことを報告している。それ故、コレステロール低下作用について、FCE 中の脂質成分について不明な点が多い。

FCE は比較的、タンパク質を多く含んでいる (Table 2.2)。試験食中のタンパク質の質と量は、コレステロール代謝の重要な要因の 1 つである。いくつかの植物から調製されたタンパク質はヒトおよび実験動物においてコレステロール低下作用を示すことが報告されている (Roy & Schneeman, 1981; Tanaka et al., 1984; Kayashita et al., 1997; Wong et al., 1998; Higaki et al., 2006)。特に、大豆タンパク質のコレステロール低下作用は良く知られている (Roy & Schneeman, 1981; Tanaka et al., 1984; Wong et al., 1998; Higaki et al., 2006)。しかしながら、タンパク質の由来が植物であるか動物であるかは重要ではない (Oda, 2006)。Higaki ら (2006) は、大豆タンパク質は疎水性アミノ酸が多く、胆汁酸と疎水結合することを示し得ている。このように FCE タンパク質は大豆タンパク質と同様な作用メカニズムでコレステロール低下作用を示す可能性も考えられる。

本研究においては、FCE のコレステロール低下作用について、主要構成成分である脂質および分離タンパク質画分のどちらがコレステロール低下作用を示すのか検討を行った。

4.2.2. 実験方法

4.2.2.1. FCE 脂質画分/分離タンパク質画分の調製および成分分析

FCE は、第 2 章 (2.2.1. FCE の調製および成分分析) に記載の方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し開口させ肉質部を取り出した。肉質部を粉碎し、肉質部の 2 倍量の加水をし 2 時間加熱攪拌抽出した後、80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。

FCE を 5 倍量のクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) で一晩攪拌抽出し、濾過した。更に残渣に同様の溶媒を加え更に抽出、濾過した。クロロホルム：メタノール抽出物をロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮・乾固し FCE 脂質画分を得た。FCE 脂質画分の収率は、FCE の 18% であった。FCE 脂質画分の脂肪酸組成は大分大学全学研究推進機構実験実習機器部門へ委託した。脂質画分をメチルエステル化して、GC/MS にて分析した。トリコサノン酸を内部標準として用いた。また外部標準として Spelco® 37 FAME mix (Cat. No.47885-U, Sigma-Aldrich, Inc.) を使用した。

FCE をクロロホルム：メタノールで抽出した後の残渣を室温で風乾した。乾燥した残渣を 4 倍量の 8mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) に懸濁した。主な炭水化物であるグリコーゲンを分解するため、 β -アミラーゼ (EC 3.2.1.2, 723 nkat/mg, type II-B, from barley; Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA) を酵素量：基質量比率が 1:1000 となるように加え、室温で 2 時間インキュベーションした。15 分間 沸騰した水浴中で加熱して酵素を失活させた。室温までさました後、-20°C に冷却したアセトンを 3 倍量加え、一晩 -20°C で放置して高分子を沈殿させた。沈殿を濾過し室温で風乾し、FCE 分離タンパク質画分を得た。FCE 分離タンパク質画分の収率は、FCE の 71% であった。FCE 分離タンパク質の粗タンパク質をケルダール法で分析した。

4.2.2.2. 実験動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 23±1°C、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期を 20:00-8:00、暗期を 8:00-20:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (5L37：日本エスエルシー(株)) で 3 日間、20% カゼイン食の半合成飼料で 4 日間飼育した後に試験に供した。1 群 6 匹の 5 群とした。試験食を Table 4.2.1 に示した。基本食群は 20% カゼイン食にとした。対照群は 20% カゼイン食に 0.5% コレステロールと 0.25% コール酸ナトリウムを添加した高コレステロール食とした。FCE 群の飼料は

高コレステロール食に、タンパク質源を全て FCE となるように加え、カゼイン、ラード、ショ糖で置き換えた。また、脂質画分および分離タンパク質画分は、収率から FCE 群の飼料に含まれるそれぞれの脂質画分および分離タンパク質画分量と同じになるように飼料への添加量を決定した。全ての飼料はタンパク質および脂質量が同じになるようにした。

試験食の投与開始 14 日目の 6:00 から 4 時間絶食した。10:00 より断頭により採血した後、肝臓および脂肪組織を得た。肝臓は直ちに凍結して、分析まで冷凍保管した。また、試験食投与の最後の 3 日間に糞を採取した。

Table 4.2.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the cholesterol-lowering effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction in rats fed a high-cholesterol diet.

	Cholesterol free diet	High-cholesterol diet			
		Control	FCE	Fat fraction of FCE	FCE protein isolate fraction
			<i>g/kg</i>		
Casein	200.0	200.0	—	200.0	38.8
Sucrose	645.0	637.5	598.5	637.5	591.7
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Lard	100.0	100.0	47.5	47.5	100.0
AIN-93G mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-93 vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cholesterol	—	5.0	5.0	5.0	5.0
Sodium cholate	—	2.5	2.5	2.5	2.5
FCE	—	—	291.5	—	—
Fat fraction of FCE	—	—	—	52.5	—
FCE protein isolate fraction	—	—	—	—	207.0

4.2.2.3. 生化学分析

採血後、血液を室温に 30 分間放置した後、遠心分離 (1,500×g, 10 分間) することによって血清を得た。血清中 AST、ALT、ALP 活性、直接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸、アディポネクチンを市販キット (デタミナーAST II、デタミナーALT II、デタミナーALP、(すべて協和メディックス株)、イアトロ LQ-BIL (三菱化学メディエンス株)、TG-EN カイノス (カイノス株)、T-CHO カイノス (カイノス株)、リン脂質-C テストワコー (和光純薬株)、NEFA 試薬 B (シスメックス国際株)、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬株))

を用いて測定した。LDL コレステロールは、血清をアガロースゲル電気泳動で分画し、その後、酵素法によって染色して測定した。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

糞中ステロールは、採取した糞を、凍結真空乾燥し中性ステロールおよび胆汁酸の分析に用いた。中性ステロールは Delaney らの方法 (2003) により抽出し、TMS 化した。内部標準として 5 α -コレストランを用いた。TMS 化したサンプルを GC/MS (GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー(株)) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度 : 300°C、ディテクタ温度 : 230°C、カラム : 30m \times 0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー(株))、カラム温度 : 245°C で 2 分間保持、その後 300°C まで 2°C/分 で昇温させた。胆汁酸は、Sheltawy および Lowsky の方法 (1975) により酵素法で測定し、リトコール酸を標準として用いた。また、糞中の疎水性物質に結合している胆汁酸量も測定した。糞を 5mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 回抽出した後、残渣を 75% エタノールで抽出した。75% エタノールで抽出された胆汁酸を同様に酵素法により測定し、疎水性物質結合胆汁酸とした。

肝臓の CYP7A1、ATP-binding cassette (ABC) G5 および apoE mRNA 量をノーザンブロット法で測定した。Chomczynski および Sacchi の方法 (1987) で肝臓中 RNA を抽出し、20 μ g の RNA をノーザンブロット法による分析に用いた。Megaprime DNA ラベリングシステム (アマシャム(株)) でラット CYP7A1、ラット ABCG5、およびマウス apoE の cDNA を標識し、ハイブリダイゼーションを行い、イメージアナライザー (BAS 2000, 富士フイルム(株))を用いて測定した。apoE mRNA 量はこの動物モデルでは変化しないことが分かっている (Oda et al., 1995; Yoshida et al., 1996)。そのため apo E mRNA を内部標準として用いた。

4.2.2.4. 統計解析

一元配置分散分析法を用いて有意差が見られた場合に、Duncan (1955) の多重分析により群間の有意差検定を行った。

4.2.3. 結果

FCE 脂質画分の脂肪酸組成を Table 4.2.2 に示した。FCE 脂質画分の主要な脂肪酸はパルミチン酸 (16:0) であり、FCE 脂質画分 100g 中に 18.2%含まれていた。ラード、コーン油、魚油との比較をおこなったが、多価不飽和脂肪酸は、少なかった。FCE 分離タンパク質画分の粗タンパク質は 70.7%であった。

Table 4.2.2 Fatty acids composition of in the fat fraction of freshwater clam extract (FCE), lard, corn oil and fish oil.

Fatty acid	Fat fraction of FCE ¹	Lard ²	Com oil ²	Fish oil ³
	(g/100g)			
C14:0	1.5	1.9		5.0
C14:1		0.3		0.1
C15:0	0.3			0.4
C15:1		0.1		
C16:0	18.2	25.3	10.5	19.5
C16:1	6.3	3.5		6.0
C16:2				0.8
C16:4				0.8
C17:0	1.3	0.5		1.1
C17:1	1.2	0.4		
C18:0	3.9	11.5	2.0	4.5
C18:1(n-9)	2.4	40.5	32.5	16.0
C18:1(n-7)				2.8
C18:2(n-6)	0.9	9.3	47.3	20.5
C18:3(n-3)	1.7	0.7	1.4	2.5
C18:4(n-3)				1.9
C20:0	0.5	0.2		
C20:1(n-9)	0.5	0.6		0.9
C20:4(n-6)	0.6	0.3		0.4
C20:5(n-3)				9.0
C22:5(n-3)				1.0
C22:6(n-3)	0.7			6.0
C24:1(n-9)	0.4			
PUFAs	4.3	10.3	48.7	42.9
MUFAs	10.4	45.4	32.5	25.8

¹ Fatty acids in fat fraction of FCE were analyzed by GC/MS. Quantification of each sterols were calculated by ratio of the peak area of each fatty acid to that of internal standard (tricosanoic acid). Spelco® 37 FAME mix (Cat. No.47885-U, Sigma-Aldrich, Inc.) was used as external standard.

² The data concerning lard and corn oil were quoted from the *Standard Tables of Food Composition in Japan*, 4th ed.(1982).

³ The data concerning fish oil was published in De Schrijver et al. (1992).

ラットの初体重、終体重、飼料摂取量、肝臓および脂肪組織重量を Table 4.2.3 に示した。終体

重は5群間で差は見られなかった。しかし飼料摂取量はFCE群において対照群に比べ有意に増加した。肝臓重量は、基本食群と比較して、高コレステロール食である対照群で有意に高値を示した。FCE群および分離タンパク質画分群は、対照群と比較して有意に低値を示したが、脂質画分群は、対照群と差が見られなかった。副睾丸周囲脂肪組織は基本食群と比較して、対照群で有意に低値を示した。また、腎周囲脂肪組織および腹部脂肪組織では、基本食群と対照群で差は見られなかった。FCE群およびその画分群(脂質画分、分離タンパク質画分)では対照群と差が見られなかった。

胆汁鬱滞の指標となる直接ビリルビンおよびALPについてTable 4.2.3に示した。直接ビリルビンおよびALPにおいて、基本食群と比較して対照群で有意に高値を示した。しかし、FCE群、脂質画分群および分離タンパク質画分群においては、対照群と比較して有意に低値を示した。

肝障害の指標となる血清AST及びALTをTable 4.2.3に示した。ASTは5群間で差がなかったが、ALTは基本食群と比較して、対照食群で有意に高値を示した。FCE群および分離タンパク質画分群は対照群と比較して有意差がなかったが、脂質画分群は有意に低値を示した。

血清脂質(中性脂肪、総コレステロール、LDLコレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸)をTable 4.2.3に示した。血清中性脂肪は基本食群と比較し対照群で有意に低値を示した。FCE群および脂質画分では対照群と比較し、有意に高値を示したが、分離タンパク質画分では対照群と差が見られなかった。血清総コレステロール、LDLコレステロール、リン脂質および遊離脂肪酸は基本食群と比較し、対照群で有意に高値を示した。しかしFCE群、脂質画分群および分離タンパク質画分群では、対照群と比較し有意に低値を示した。

血清アディポネクチン濃度は、基本食群と比較し対照群で有意に低値を示した。FCE群では対照群と比較し有意に高値を示したが、脂質画分群および分離タンパク質画分群では対照群と比較し差が見られなかった(Table 4.2.3)。

肝臓脂質(総脂質、中性脂肪、コレステロール、リン脂質)をTable 4.2.3に示した。肝臓総脂質、中性脂肪、コレステロールは基本食群と比較し、対照群で有意に高値を示した。肝臓総脂質、中性脂肪は、FCE群および脂質画分および分離タンパク質画分で対照群と比較し有意に低値を示した。肝臓コレステロールはFCE群および脂質画分群で対照群と比較し有意に低値を示したが、分離タンパク質画分群では対照群と比較し低値を示す傾向があるものの有意差がなかった。リン脂質は基本食群と対照群に差がなく、また対照群とFCE群および脂質画分/分離タンパク質画分で有意差がなかった。

Table 4.2.3 Effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on food intake, body weight, relative organ weight, serum parameter and hepatic lipids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Cholesterol free diet	High-cholesterol diet			
		Control	FCE ²	Fat fraction of FCE ²	FCE protein isolate fraction ²
Initial body weight (g)	108 ± 2	108 ± 2	108 ± 2	108 ± 2	108 ± 2
Final body weight (g)	176 ± 4	178 ± 4	184 ± 4	176 ± 3	183 ± 3
Food intake (g for 14 days)	185 ± 3 ^a	187 ± 5 ^a	207 ± 4 ^b	185 ± 2 ^a	201 ± 5 ^{ab}
Relative organ weights (g/100g of body weight)					
Liver	4.34 ± 0.07 ^a	5.18 ± 0.08 ^c	4.78 ± 0.05 ^b	5.07 ± 0.05 ^c	4.84 ± 0.07 ^b
Adipose tissue					
Epididymal	1.92 ± 0.09 ^b	1.31 ± 0.08 ^a	1.51 ± 0.09 ^a	1.46 ± 0.08 ^a	1.35 ± 0.08 ^a
Perirenal	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Abdominal	1.29 ± 0.07 ^b	1.01 ± 0.10 ^{ab}	1.12 ± 0.08 ^{ab}	0.86 ± 0.10 ^a	0.99 ± 0.10 ^{ab}
Serum					
Direct bilirubin (mg/dL)	0.01 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
AST (IU/L)	186 ± 13	199 ± 12	231 ± 21	220 ± 13	236 ± 22
ALT (IU/L)	55.7 ± 4.9 ^a	79.3 ± 8.0 ^b	67.5 ± 6.5 ^{ab}	58.5 ± 3.5 ^a	70.0 ± 6.2 ^{ab}
ALP (IU/L)	1435 ± 41 ^a	2323 ± 79 ^d	1566 ± 47 ^{ab}	1667 ± 66 ^b	1885 ± 58 ^c
Triacylglycerol (mg/dL)	51.7 ± 4.8 ^b	17.3 ± 1.9 ^a	46.2 ± 10.5 ^b	47.7 ± 12.6 ^b	13.2 ± 1.9 ^a
Total cholesterol (mg/dL)	93.3 ± 4.7 ^a	447 ± 36 ^c	107 ± 4 ^a	145 ± 7 ^a	273 ± 25 ^b
LDL-cholesterol (mg/dL)	12.5 ± 0.8 ^a	350 ± 30 ^d	54.0 ± 3.8 ^{ab}	82.7 ± 5.6 ^b	203 ± 21 ^c
Phospholipids (mg/dL)	167 ± 6 ^c	189 ± 11 ^d	122 ± 2 ^a	139 ± 6 ^{ab}	146 ± 6 ^b
Free fatty acid (mEq/L)	0.99 ± 0.03 ^a	1.44 ± 0.05 ^c	0.99 ± 0.05 ^{ab}	1.17 ± 0.05 ^b	1.17 ± 0.07 ^b
Adiponectin (mg/L)	2.99 ± 0.12 ^b	2.59 ± 0.08 ^a	3.74 ± 0.07 ^c	2.52 ± 0.12 ^a	2.12 ± 0.11 ^a
Liver					
Total lipids (mg/g liver)	81.9 ± 6.8 ^a	173 ± 5 ^d	126 ± 2 ^b	114 ± 4 ^b	156 ± 4 ^c
Triacylglycerol (mg/g liver)	29.3 ± 3.4 ^a	52.8 ± 5.7 ^c	31.0 ± 1.7 ^a	30.1 ± 1.0 ^a	42.8 ± 2.7 ^b
Cholesterol (mg/g liver)	4.08 ± 0.19 ^a	21.9 ± 2.0 ^c	14.4 ± 0.7 ^b	15.2 ± 0.7 ^b	18.8 ± 1.1 ^c
Phospholipids (mg/g liver)	24.3 ± 0.3 ^a	26.1 ± 1.0 ^{ab}	25.9 ± 0.4 ^{ab}	26.6 ± 0.6 ^b	24.3 ± 0.8 ^a

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

試験終了前3日間の糞の排泄量と糞中ステロール量を Table 4.2.4 に示した。糞の乾燥重量は対照群と基本食群で有意差が見られなかった。FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群では対照群と比較して有意に増加した。対照群はコレステロールの添加により基本食群と比較して中性ステロールの糞中への排泄量が有意に増加した。FCE 群および脂質画分群の糞への中性ステロール排泄量 (コレステロール、コプロスタノールおよびコプロスタノンの合計) は対照群と比較して、さらに増加した。

Table 4.2.4 Effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on fecal dry weight, neutral sterol and bile acids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Cholesterol free diet	High-cholesterol diet			
		Control	FCE ²	Fat fraction of FCE ²	FCE protein isolate fraction ²
Fecal dry weight (g/3 d)	0.94 ± 0.07 ^a	0.94 ± 0.08 ^a	3.7 ± 0.1 ^d	1.6 ± 0.0 ^b	2.7 ± 0.1 ^c
Cholesterol (μmol/3 d)	4.80 ± 0.96 ^a	72.9 ± 11.5 ^b	381 ± 24 ^d	302 ± 16 ^c	113 ± 7 ^b
Coprostanol (μmol/3 d)	21.6 ± 1.5 ^d	12.3 ± 1.2 ^c	1.29 ± 0.87 ^{ab}	4.61 ± 1.84 ^b	0.09 ± 0.04 ^a
Coprostanone (μmol/3 d)	0.84 ± 0.10 ^a	0.73 ± 0.16 ^a	2.99 ± 1.98 ^a	10.5 ± 4.0 ^b	0.71 ± 0.48 ^a
Total neutral sterols ³ (μmol/3 d)	27.3 ± 2.0 ^a	85.9 ± 11.4 ^b	386 ± 26 ^d	317 ± 18 ^c	114 ± 7 ^b
Total bile acids (μmol/3 d)	20.4 ± 3.4 ^a	154 ± 12 ^b	325 ± 20 ^d	287 ± 10 ^c	282 ± 7 ^c
Bile acids binding to hydrophobic substance ⁴ (μmol/3 d)	11.9 ± 2.0 ^a	89.3 ± 7.7 ^b	134 ± 16 ^c	114 ± 8 ^{bc}	99 ± 10.5 ^b

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

³ Total neutral sterols = cholesterol + coprostanol + coprostanone.

糞への植物ステロール排泄量 (ブラシカステロール、カンペステロール、スティグマステロールおよびβ-シトステロール量の合計) もまた、FCE 群および脂質画分群で対照群と比較して有意に増加した (Table 4.2.5)。しかしながら、分離タンパク質画分は糞中中性ステロールおよび植物ステロールの糞中への排泄量に影響しなかった (Table 4.2.4 および 4.2.5)。胆汁酸の糞中への排泄量は、基本食群と比較して対照群で有意に増加した (Table 4.2.4)。FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群で対照群と比較して糞中胆汁酸排泄量は有意に増加した。FCE に含まれる疎水性物質に胆汁酸が結合しているか否かを検討するために、糞をまずリン酸緩衝液で洗浄した後、残渣を 75%エタノールで抽出し、75%エタノールで抽出された胆汁酸量を測定し、糞中疎水性物質結合胆汁酸量とした。FCE 群では、対照群と比較して糞中疎水性物質結合胆汁酸量が有意に増加した。しかしながら、脂質画分群および分離タンパク質画分群では、対照群と比較して有意な差が見られなかった (Table 4.2.4)。

肝臓 CYP7A1 mRNA 量と ABCG5 mRNA 量を Fig. 4.2.1 に示した。コレステロールから胆汁酸への代謝における律速酵素である CYP7A1 の mRNA 量は FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群において、対照群と比較して有意に増加した (Fig. 4.2.1)。また、ABCG5 は主に肝臓と腸管で発現し、肝臓から胆汁中へコレステロール排泄において重要な役割を果たしている。肝臓 ABCG5 の mRNA 量は対照群で基本食群と比較して有意に増加した。さらに、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群では対照群と比較して有意に ABCG5 mRNA 量が増加した (Fig. 4.2.1)。

Table 4.2.5 Effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on fecal dry weight, neutral sterol and bile acids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Cholesterol free diet	High-cholesterol diet			
		Control	FCE ²	Fat fraction of FCE ²	FCE protein isolate fraction ²
Brassicasterol ($\mu\text{mol}/3\text{ d}$)	0 ^a	0 ^a	31.00 \pm 2.1 ^c	23.7 \pm 1.1 ^b	0 ^a
Campesterol ($\mu\text{mol}/3\text{ d}$)	0.30 \pm 0.11 ^a	0.83 \pm 0.13 ^a	48.9 \pm 3.8 ^c	38.5 \pm 2.4 ^a	1.01 \pm 0.11 ^a
Stigmasterol ($\mu\text{mol}/3\text{ d}$)	0 ^a	0 ^a	24.1 \pm 1.9 ^c	18.9 \pm 1.1 ^b	0 ^a
β -sitosterol ($\mu\text{mol}/3\text{ d}$)	0.490 \pm 0.13 ^a	2.690 \pm 0.61 ^a	19.90 \pm 1.7 ^b	17.70 \pm 1.2 ^b	2.08 \pm 0.11 ^a
Total phytosterols ³ ($\mu\text{mol}/3\text{ d}$)	0.780 \pm 0.22 ^a	3.520 \pm 0.74 ^a	124.0 \pm 9 ^c	98.8 \pm 5.8 ^b	3.1 \pm 0.21 ^a

¹ Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

³ Total phytosterols = brassicasterol + campesterol + stigmasterol + β -sitosterol.

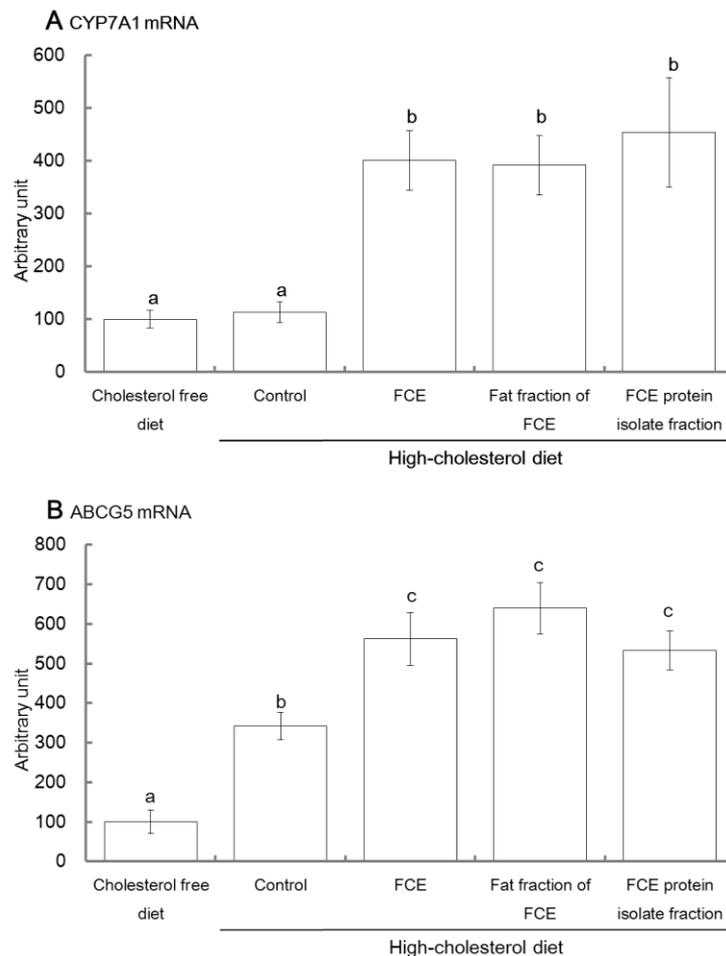


Figure 4.2.1 Effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on hepatic (A)CYP7A1 and (B)ABCG5 mRNA in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. In each graph, different letters (a,b,c) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). FCE: Freshwater clam extract

4.2.4 考察

前節において、我々は FCE が高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットに対し、コレステロール低下作用を示すことを明らかにした (Table 4.1.2)。FCE のコレステロール低下作用は、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸排泄促進 (Table 4.1.3)、また肝臓 CYP7A1 遺伝子の発現促進を介しているメカニズムの可能性が示唆された (Fig. 4.1.2)。しかしながら、そのコレステロール低下作用が、FCE 中のどのような成分によって引き起こされるのかは明らかとなっていない。本節においては、FCE の主要構成成分である脂質およびタンパク質に着目して、その脂質画分または分離タンパク質画分がコレステロール低下作用を示すかどうかを高コレステロール食によって誘導した高コレステロール血症モデルラットを用いて検討した。その結果、脂質画分および分離タンパク質画分ともに、有意に血清および肝臓コレステロール濃度を低下させた (Table 4.2.3)。また、脂質画分の方が分離タンパク質画分より強いコレステロール低下作用を示すことが明らかとなった。

Iritani らはシジミ中に含まれる植物ステロールおよび多価不飽和脂肪酸がコレステロール低下作用を示す可能性を示唆している (Iritani et al., 1979b; Iritani et al., 1980)。Sugano ら (1976) は高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットを用いて、植物ステロールのコレステロール低下作用の投与量依存性について検討を行っている。その結果、0.1%植物ステロール+1%コレステロール食では、植物ステロールを含まない 1%コレステロール食と血清コレステロール濃度に有意差が見られないことが示されている (Sugano et al., 1976)。FCE 群および脂質画分群の飼料に含まれる FCE 由来の総植物ステロール量は 0.04%以下であった (Table 2.4)。そのため、本節の研究において用いた FCE 中の植物ステロール量では、FCE のコレステロール低下作用の効果の全てを説明するには十分ではないと思われた。また、FCE 中の多価不飽和脂肪酸量は、ラードと比較して同程度であり、またコーン油や魚油より低い値を示した (Table 4.2.2)。さらに、FCE のコレステロール低下作用を植物ステロールと多価不飽和脂肪酸で説明する場合、いくつかの研究において、本節における研究結果と矛盾する結果が示されている。Jia ら (2007) は、ハムスターにおいてコレステロールを含まない飼料と比較して、0.25%コレステロール食は肝臓 ABCG5 遺伝子の発現を促進し、一方で、高コレステロール食+1%植物ステロール食では肝臓 ABCG5 遺伝子の発現が促進されないことを示している。残念なことに、多価不飽和脂肪酸が肝臓 ABCG5 または G8 遺伝子に及ぼす影響を検討したものはほとんど見られない。さらに、先行研究において植物ステロールや多価不飽和脂肪酸は糞中への胆汁酸排泄量を促進しないことが示されている (Uchida et al., 1984; Plsöch et al., 2006; De Schrijver et al., 1992; Høstmark et al., 1989)。それ故、植物ステロールおよび多価不飽和脂肪酸は、FCE の糞中中性ステロールおよび胆汁酸排泄促

進作用において中心的に作用している化合物ではないと考えられた。以上のことから、FCEには植物ステロールおよび多価不飽和脂肪酸以外に強いコレステロール低下作用を示す化合物の存在が示唆された。

本章第3節で詳細は述べるが、FCE脂質画分をTLCプレート上に展開すると様々な化合物が含まれることが分かる (Fig. 4.3.1)。Maokaら (2005) はシジミ中から複数の新規カロテノイドの存在を報告している。また、Maokaら (2005) はシジミ中の主要なカロテノイドであるルテインが、シジミの餌中に含まれることも示している。本節においては、FCE中のカロテノイドやその他の脂溶性化合物がどのような成分であるかについての検討は行っていないが、脂質画分に含まれる未知の脂溶性化合物の可能性が考えられた。

Ikedaら (2009) は大豆タンパク質が肝臓 ABCG5 および G8 遺伝子発現を促進し、胆汁中へのコレステロール排泄を促進するが、糞中への中性ステロール排泄には影響を及ぼさないことを示している。FCE分離タンパク質画分においても、Ikedaら (2009) の報告同様に、ABCG5 遺伝子の発現を誘導するものの、糞中中性ステロール排泄量には影響を及ぼさなかった (Fig. 4.2.1, Table 4.2.4)。Higakiら (2006) は胆汁酸が大豆タンパク質中のペプチドに、結合して、糞中へ排泄されている可能性を示唆している。FCE群およびその分離タンパク質画分群において、糞の排泄量が、対照群と比較して有意に増加した (Table 4.2.4)。このことは、FCEが難消化性タンパク質を含んでいる可能性を示している。しかしながら、分離タンパク質画分群のラットの排泄した糞中における疎水性物質に結合している胆汁酸量は増加しなかった (Table 4.2.4)。FCEによって肝臓 CYP7A1 遺伝子発現は促進されたが、farnesoid X receptor (FXR) を介した CYP7A1 の負の転写因子である SHP 遺伝子の発現には影響を及ぼさなかった (Lu et al., 2000; Goodwin et al., 2000) (Fig. 4.1.2)。それ故、これらの結果から、分離タンパク質画分に含まれる疎水性物質が糞中への胆汁酸排泄の促進や血清コレステロール低下に作用しているとは考えられなかった。一方で、タンパク質のアミノ酸組成は、コレステロール代謝において重要な役割を果たしている (Oda, 2006)。FCE中のグリシン量はカゼインと比較して約2~3倍含まれており、また含硫アミノ酸量はFCEとカゼインにおいて差がなかった (Table 2.3)。グリシンや含硫アミノ酸は、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットにおいて血漿コレステロールレベルを低下させることが報告されている (Sugiyama et al., 1985; Oda, 2006)。しかしながら、我々はFCE中のタンパク質がどのようにコレステロール低下作用を示すのか明らかにすることは出来ていない。FCE中のアミノ酸組成や未知の生理活性ペプチドがコレステロール低下作用を示している可能性も考えられる。

本節において、我々はFCE脂質画分および分離タンパク質画分がコレステロール低下作用を有することを明らかにした。加えて、本節で得られた結果から、FCEはメタボリックシンドローム、

肝障害および胆汁鬱滞に対しても有用な効果を示す可能性が示唆された。FCE 脂質画分によって肝障害の指標である血清 ALT 活性が抑制された。胆汁鬱滞の指標である血清直接ビリルビンおよび ALP 活性は高コレステロール食によって上昇したが、FCE の混餌投与によって上昇が抑制された。メタボリックシンドロームは、肥満に由来する疾病であり、一般的にインスリン抵抗性と慢性的な血漿遊離脂肪酸レベルの上昇を伴うことが知られている (Lam et al., 2002)。本節において、FCE および脂質画分、分離タンパク質画分を摂食したラットにおいて血清遊離脂肪酸レベルは低下することを示した (Table 4.2.3)。さらに、FCE によって血清アディポネクチンレベルが上昇した (Table 4.2.3)。これらの結果は、FCE がメタボリックシンドロームや生活習慣病に対して有益な効果を有することを示唆している。

本節において、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分はコレステロール低下作用を示すことが明らかとなった。脂質画分と分離タンパク質画分の混合物である FCE は、強いコレステロール低下作用を示した。さらに、FCE のコレステロール低下作用は、ABCG5 および CYP7A1 の遺伝子発現の変動を介していることが明らかとなった。しかしながら、一方でこれらの遺伝子の発現が FCE およびその成分によって、どのように制御されているのかという部分は明らかとなっていない。近年、コレステロール代謝を制御しているいくつかの microRNA が報告されている (Esau et al., 2006; Takagi et al., 2010)。そのため、転写因子の分析や microRNA マイクロアレイ解析は、FCE や FCE 脂質画分/分離タンパク質画分が高コレステロール食を摂食したラットにおいてどのように作用しているのかを明らかにするのに有用であると思われる。一方で、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸排泄に対する FCE 脂質画分と分離タンパク質画分の影響は異なっていた。そのため、これら 2 つの画分による作用メカニズムは、異なっていると思われる。現在、我々はマイクロアレイを行い、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分がどのように作用しているのかの検討を行っている。さらに、FCE 脂質画分が分離タンパク質画分より強いコレステロール低下作用を示したので、FCE 中の脂溶性成分に焦点を絞り、活性化合物の同定を行うことが望まれる。

第3節

食餌性高コレステロール血症モデルラットを用いたタイワンシジミ抽出物の脂質画分中の活性化合物の探索

4.3.1. 緒言

本章第2節において、タイワンシジミ抽出物 (FCE) は肝臓の ABCG5 および CYP7A1 遺伝子発現の上昇を介したコレステロール低下作用を示すことを明らかにした (Fig. 4.2.1)。また、FCE のコレステロール低下作用は、その主要な成分である脂質画分および分離タンパク質画分にどちらにも由来していることを明らかにした (Table 4.2.3)。また、FCE の脂質画分は分離タンパク質画分よりも強いコレステロール低下作用を示した。

本節においては、FCE の脂質画分中のいかなる成分がコレステロール低下作用を示すのかを探索することを目的とした。FCE の脂質画分は、肝臓の ABCG5 および CYP7A1 遺伝子の発現を上昇させることが明らかになっている (Fig. 4.2.1)。さらに、FCE の脂質画分は、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄を促進することが明らかになっている (Table 4.2.4)。入谷らはヤマトシジミのコレステロール低下作用は、主に植物ステロールおよび PUFA に由来しているとしている (Iritani et al., 1979b; Iritani et al., 1980)。しかしながら、我々のこれまでの研究において、FCE 脂質画分中の植物ステロールおよび PUFA の量では、FCE 脂質画分のコレステロール低下作用の強さを説明することは出来なかった。加えて、FCE 脂質画分による CYP7A1 遺伝子の発現上昇や糞中への胆汁酸排泄の促進効果については、植物ステロールや PUFA の存在では説明することが出来ない。それ故、FCE の脂質画分中には植物ステロールや PUFA 以外にコレステロール低下作用を示す成分があることが考えられる。薄層クロマトグラフィーで FCE の脂質画分を分析すると、様々な成分が含まれていることが分かる。近年、Maoka ら (2005) は、シジミから 43 種類のカロテノイドを単離し、さらにその中のいくつかが新規のカロテノイドであることを報告している。

本節においては、FCE 中のコレステロール低下作用を示す化合物の探索の一環として、強いコレステロール低下作用を示した FCE の脂質画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 9 つの画分に分けた。それらの画分について、ラットを用いてコレステロール低下作用を検討した。

4.3.2. 実験方法

4.3.2.1. 試料の調製

FCE は、第 2 章 (2.2.1. FCE の調製および成分分析) に詳細を記載した方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し開口させ肉質部を取り出した。肉質部を粉碎し、肉質部の 2 倍量の加水をし 2 時間加熱攪拌抽出した後、80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。FCE 脂質画分は第 4 章 第 2 節(4.2.2.1. FCE 脂質画分/分離タンパク質画分の調製および成分分析) に記載の方法で得た。FCE をクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) で攪拌抽出し、濾過した。更に残渣に同様の溶媒を加え抽出、濾過した。濾液をロータリーエバポレーターで濃縮・乾固し FCE 脂質画分を得た。FCE を本節における FCE 脂質画分の収率は 25.1%であった。

脂質画分を n-ヘキサンに溶解し、可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (移動相：n-ヘキサン-酢酸エチル；10:0→0:10, クロロホルム:メタノール；10:0→5:5) により 8 画分に分画した (画分 1-8)。n-ヘキサン不溶部は画分 9 とした。全ての画分を減圧乾燥して、FCE からの収率を求めた。収率および各画分を薄層クロマトグラフィーにより展開した結果を Fig. 4.3.1 に示した。

4.3.2.2. 実験動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 23±1°C、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期を 20:00-8:00、暗期を 8:00-20:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (5L37：日本エスエルシー(株)) で 4 日間、20% カゼイン食の半合成飼料で 3 日間飼育した後に試験に供した。1 群 6 匹の 11 群とした。試験食を Table 4.3.1 に示した。基本食群は 20%カゼイン食にとした。対照群は 20%カゼイン食に 0.5%コレステロールと 0.25%コール酸ナトリウムを添加した高コレステロール食とした。FCE 脂質画分およびそのサブ画分 (Fr. 1-9) は収率から算出して 30%FCE に含まれる量を飼料にロードと置き換えて添加した。全ての飼料はタンパク質および脂質量が同じになるようにした。試験食の投与開始 14 日目の 6:00 から 4 時間絶食した。10:00 より断頭により採血した後、肝臓を得た。肝臓は直ちに凍結して、分析まで冷凍保管した。また、試験食投与の最後の 3 日間に糞を採取した。

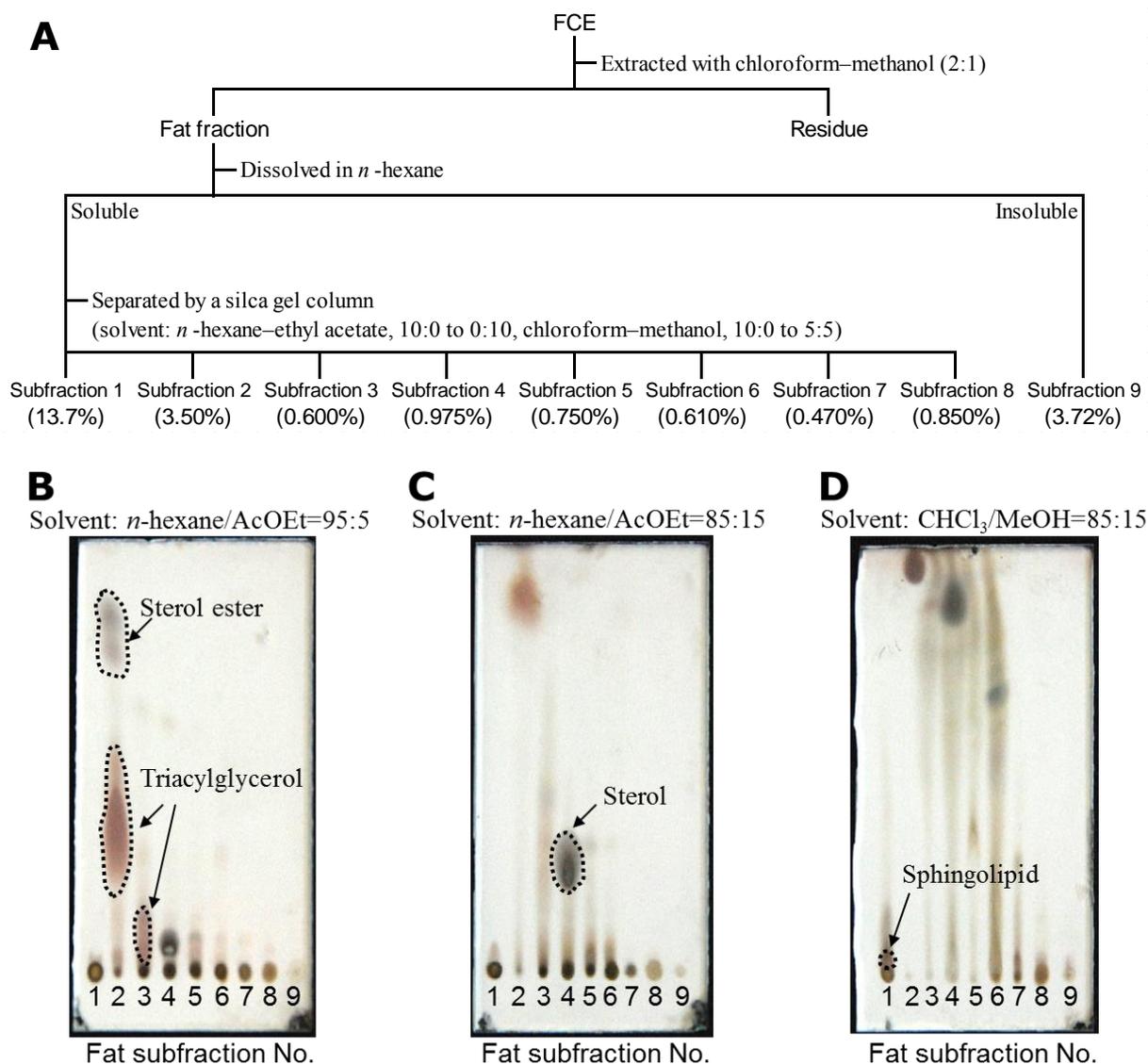


Figure 4.3.1 Preparation scheme and TLC analysis of fat subfraction of freshwater clam extract (FCE).

FCE was extracted two times with a chloroform–methanol (2:1). (A) The evaporated chloroform–methanol extract was used as the fat fraction of FCE. The fat fraction was suspended in *n*-hexane. The soluble part in *n*-hexane was separated into eight subfractions (fat subfraction 1–8) by silica gel column chromatography (solvent: *n*-hexane–ethyl acetate, 10:0 to 0:10, chloroform–methanol, 10:0 to 5:5). The insoluble part was designated as fat subfraction 9. The yields of each fat subfraction of FCE are shown in parentheses under the fraction names. TLC plates containing fat subfraction 1–9 separated by silica gel column chromatography. The developing solvents of each plate were as follows: (B) *n*-hexane/ethyl acetate (95:5), (C) *n*-hexane/ethyl acetate (85:15), or (D) chloroform/methanol (85:15).

Table 4.3.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the cholesterol-lowering effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) in rats fed a high-cholesterol diet.

	Casein	Sucrose	Corn oil	lard	AIN-93G mineral mixture	AIN-93G vitamin mixture	Cholesterol	Sodium cholate	Experimental substance
Cholesterol free diet	200.0	645.0	10.0	100.0	35.0	10.0	—	—	—
High-cholesterol diet									
Control	200.0	637.5	10.0	100.0	35.0	10.0	5.0	2.5	—
Fat fraction	200.0	637.5	10.0	24.6	35.0	10.0	5.0	2.5	75.4
Fat subfraction 1	200.0	637.5	10.0	59.0	35.0	10.0	5.0	2.5	41.0
Fat subfraction 2	200.0	637.5	10.0	89.5	35.0	10.0	5.0	2.5	10.5
Fat subfraction 3	200.0	637.5	10.0	98.2	35.0	10.0	5.0	2.5	1.8
Fat subfraction 4	200.0	637.5	10.0	97.1	35.0	10.0	5.0	2.5	2.9
Fat subfraction 5	200.0	637.5	10.0	97.7	35.0	10.0	5.0	2.5	2.3
Fat subfraction 6	200.0	637.5	10.0	98.2	35.0	10.0	5.0	2.5	1.8
Fat subfraction 7	200.0	637.5	10.0	98.6	35.0	10.0	5.0	2.5	1.4
Fat subfraction 8	200.0	637.5	10.0	97.4	35.0	10.0	5.0	2.5	2.6
Fat subfraction 9	200.0	637.5	10.0	88.8	35.0	10.0	5.0	2.5	11.2

4.3.2.3. 生化学分析

血清中 AST、ALT、ALP、leucine aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1) 活性、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸を市販キットで測定した。測定キットは、デタミナーAST II、デタミナーALT II、デタミナーLAP (すべて協和メディックス株)、TG-EN カイノス、T-CHO カイノス (どちらもカイノス株)、リン脂質-C テストワコー (和光純薬株)、NEFA 試薬 B (シスメックス国際株)を用いた。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

採取した糞を凍結真空乾燥し中性ステロールおよび胆汁酸の分析に用いた。中性ステロールは Delaney らの方法 (2003) により抽出し、TMS 化した。内部標準として 5 α -コレスタンを用いた。TMS 化したサンプルを GC/MS (GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー株) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度:300 $^{\circ}$ C、ディテクタ温度:230 $^{\circ}$ C、カラム:30m \times 0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー株)、カラム温度:245 $^{\circ}$ Cで2分間保持、その後300 $^{\circ}$ Cまで2 $^{\circ}$ C/分で昇温させた。胆汁酸は、Sheltawy および Lowsky の方法 (1975) により酵素法で測定し、リトコール酸を標準として用いた。

肝臓の CYP7A1、ABCG5、SHP および FXR mRNA 量を測定した。CYP7A1、ABCG5 および apoE mRNA 量をノーザンブロット法で、SHP、FXR および apoE mRNA 量を定量リアルタイム PCR 法により測定した。Chomczynski および Sacchi の方法 (1987) で肝臓中 RNA を抽出した。20 μ g の RNA をノーザンブロット法またはリアルタイム PCR 法による分析に用いた。ノーザンブロット法による分析は以下のように行った。Megaprime DNA ラベリングシステム (アマシャム株) でラット CYP7A1、ラット ABCG5 およびマウス apoE の cDNA を標識し、ハイブリダイゼーションを

行い、イメージアナライザー (BAS 2000, 富士フイルム株)を用いて測定した。定量リアルタイム PCR 法による SHP、FXR mRNA 量の測定は以下のように行った。High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Inc.) を用いて cDNA クローンを合成した。用いたプライマーは以下の通りである。

Rat SHP forward primer, 5'-CAGCTTGGATTTCCTCGGTTT-3'; rat SHP reverse primer, 5'-GTCTGGAGGAATTCTGCCCTG-3'; rat FXR forward primer, 5'-AGCCACAGATCTCCTCCTCG-3'; rat FXR reverse primer, 5'-ACAGGCATCTCGGATACCTCA-3'; rat apo E forward primer, 5'-TGAACCGCTTCTGGGATTAC-3'; rat apo E reverse primer, 5'-TGTGTGACTTGGGAGCTCTG-3'

PCR 反応は StepOne real time PCR system (Applied Biosystems, Inc.) で行い検量線法によって mRNA 量を算出した。apoE mRNA 量はこの動物モデルでは変化しないことが分かっている (Oda et al., 1995; Yoshida et al., 1996)。そのため apo E mRNA は内部標準として用いた。

4.3.2.4 統計解析

一元配置分散分析法を用いて有意差が見られた場合に、Duncan (1955) の多重分析により群間の有意差検定を行った。

4.3.3. 結果

ラットの体重、飼料摂取量、肝臓重量を Table 4.3.2 に示した。体重および飼料摂取量は全ての群において差は見られなかった。肝臓重量は基本食群と比較して、対照群で有意に増加した。画分 7 群で対照群と比較して有意な肝臓重量の増加が見られたが、その他の画分群では対照群と有意差は見られなかった。

Table 4.3.2 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on body weight, food intake and relative liver weight in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Body wt (g)		Food intake (g for 14 d)	Relative liver wt (g/100 g body wt)
	Initial	Final		
Cholesterol-free diet	106 ± 2	174 ± 3	174 ± 2	4.02 ± 0.12 ^a
High-cholesterol diet				
Control	106 ± 2	174 ± 3	177 ± 2	4.92 ± 0.08 ^{bc}
Fat fraction	106 ± 2	179 ± 4	184 ± 4	5.01 ± 0.08 ^{bcd}
Fat subfraction 1	106 ± 2	177 ± 3	183 ± 3	4.78 ± 0.08 ^b
Fat subfraction 2	106 ± 2	177 ± 4	176 ± 4	5.05 ± 0.11 ^{bcd}
Fat subfraction 3	106 ± 1	178 ± 2	178 ± 3	5.03 ± 0.09 ^{bcd}
Fat subfraction 4	106 ± 1	179 ± 3	182 ± 4	5.17 ± 0.10 ^{cd}
Fat subfraction 5	106 ± 1	179 ± 1	182 ± 3	5.22 ± 0.12 ^{cd}
Fat subfraction 6	106 ± 1	175 ± 3	178 ± 3	5.08 ± 0.08 ^{bcd}
Fat subfraction 7	106 ± 1	180 ± 3	184 ± 3	5.29 ± 0.04 ^d
Fat subfraction 8	106 ± 1	179 ± 2	180 ± 3	5.15 ± 0.07 ^{cd}
Fat subfraction 9	106 ± 1	177 ± 3	176 ± 4	5.20 ± 0.17 ^{cd}

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

血清 AST 活性は全ての群間で差が見られなかった (Table 4.3.3)。ALT 活性は、基本食群と比較して対照群で高値を示さなかったものの、画分 1 および画分 2 群においては対照群と比較して有意に低値を示した。胆汁鬱滞の指標である血清 ALP および LAP 活性は基本食群と比較して対照群で有意に高値を示したが、脂質画分群では、対照群と比較して有意に低値を示した。また、画分 1 群では ALP 活性は対照群と比較して有意に低値を示し、画分 9 群では有意に高値を示した (Table 4.3.3)。

血清中性脂肪は基本食群と比較して、対照群で有意に低値を示した (Table 4.3.4)。一方で、脂質画分、画分 1 および画分 2 群では対照群と比較して血清中性脂肪は有意に高値を示した。血清総コレステロールは基本食群と比較して、対照群で有意に高値を示した (Table 4.3.4)。しかし、脂質画分、画分 1、画分 2 および画分 4 群で対照群と比較して有意に低値を示した。画分 1 および画分 2 群は、画分 4 群と比較して、さらに低値を示した (Table 4.3.4)。一方で、画分 9 群は対

Table 4.3.3 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on serum deviation enzyme activities in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Serum			
	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	LAP (IU/L)
Cholesterol-free diet	218 ± 13	55.5 ± 2.4 ^{abc}	1500 ± 53 ^a	58.7 ± 1.1 ^a
High-cholesterol diet				
Control	233 ± 18	69.2 ± 7.0 ^{bcd}	2181 ± 98 ^{cd}	64.8 ± 1.5 ^c
Fat fraction	215 ± 6	55.2 ± 2.5 ^{ab}	1738 ± 81 ^b	60.5 ± 1.5 ^{ab}
Fat subfraction 1	220 ± 12	51.8 ± 3.1 ^a	1892 ± 70 ^b	61.7 ± 1.4 ^{abc}
Fat subfraction 2	222 ± 12	51.5 ± 1.9 ^a	2095 ± 49 ^c	62.7 ± 1.1 ^{bc}
Fat subfraction 3	232 ± 30	56.0 ± 5.4 ^{abc}	2371 ± 102 ^{de}	61.8 ± 1.1 ^{abc}
Fat subfraction 4	203 ± 12	59.0 ± 2.4 ^{abcd}	2178 ± 55 ^{cd}	61.2 ± 0.9 ^{abc}
Fat subfraction 5	232 ± 11	64.3 ± 5.3 ^{abcd}	2297 ± 89 ^{cd}	62.5 ± 1.4 ^{bc}
Fat subfraction 6	218 ± 20	65.2 ± 5.2 ^{abcd}	2163 ± 34 ^{cd}	61.7 ± 0.2 ^{abc}
Fat subfraction 7	256 ± 26	73.5 ± 2.9 ^d	2365 ± 68 ^{de}	63.3 ± 0.7 ^{bc}
Fat subfraction 8	228 ± 6	70.3 ± 3.0 ^{cd}	2142 ± 54 ^{cd}	63.2 ± 0.5 ^{bc}
Fat subfraction 9	235 ± 17	73.5 ± 8.7 ^d	2453 ± 73 ^e	64.2 ± 1.2 ^{bc}

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

Table 4.3.4 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on serum lipids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Serum			
	Triacylglycerol (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Phospholipids (mg/dL)	Free fatty acid (mEq/L)
Cholesterol-free diet	53.0 ± 8.8 ^e	79.8 ± 1.8 ^a	146 ± 6 ^a	1.29 ± 0.07 ^a
High-cholesterol diet				
Control	11.5 ± 1.9 ^{ab}	434 ± 23 ^{efg}	189 ± 5 ^b	1.62 ± 0.07 ^{bcd}
Fat fraction	39.3 ± 3.5 ^d	151 ± 8 ^b	138 ± 4 ^a	1.32 ± 0.06 ^a
Fat subfraction 1	27.7 ± 4.0 ^c	194 ± 12 ^{bc}	142 ± 5 ^a	1.43 ± 0.13 ^{ab}
Fat subfraction 2	29.0 ± 3.5 ^c	218 ± 10 ^c	147 ± 6 ^a	1.40 ± 0.05 ^{ab}
Fat subfraction 3	12.7 ± 1.6 ^{ab}	389 ± 24 ^{de}	181 ± 6 ^b	1.81 ± 0.15 ^d
Fat subfraction 4	21.3 ± 3.5 ^{bc}	366 ± 19 ^d	186 ± 7 ^b	1.50 ± 0.07 ^{abc}
Fat subfraction 5	13.0 ± 1.1 ^{ab}	418 ± 18 ^{def}	195 ± 7 ^b	1.71 ± 0.05 ^{cd}
Fat subfraction 6	14.2 ± 0.8 ^{ab}	406 ± 9 ^{def}	185 ± 3 ^b	1.79 ± 0.05 ^d
Fat subfraction 7	11.7 ± 1.2 ^{ab}	461 ± 32 ^{fg}	198 ± 7 ^b	1.63 ± 0.05 ^{bcd}
Fat subfraction 8	9.50 ± 1.41 ^a	485 ± 29 ^g	200 ± 8 ^b	1.74 ± 0.06 ^{cd}
Fat subfraction 9	12.2 ± 2.4 ^{ab}	540 ± 20 ^h	219 ± 9 ^c	1.78 ± 0.08 ^d

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d,e,f,g,h) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

照群と比較し、有意に高値を示した。その他の画分群では対照群と比較して有意な差は見られなかった。血清リン脂質は対照群において基本食群と比較して有意に増加した。一方で脂質画分、

画分 1 および画分 2 群では対照群と比較して有意に低値を示した。また画分 9 群では対照群と比較して有意に高値を示した。血清遊離脂肪酸は対照群で基本食群と比較し有意に高値を示したが、脂質画分群では、対照群と比較して有意に低値を示した (Table 4.3.4)。

肝臓脂質 (総脂質、中性脂肪、コレステロール、リン脂質) を Table 4.3.5 に示した。分析した全ての肝臓脂質の指標 (総脂質、中性脂肪、コレステロール、リン脂質) においてにおいて、基本食群と比較して対照群で有意に高値を示した。肝臓総脂質では、脂質画分および画分 1 群で対照群と比較して有意に低値を示した。肝臓中性脂肪では脂質画分、画分 1、画分 2 および画分 3 群で対照群と比較して有意に低値を示した。肝臓コレステロールは、脂質画分、画分 1 および画分 2 群で対照群と比較して有意に低値を示した。肝臓リン脂質は画分 1、画分 2、画分 4 および画分 7 群で対照群と比較して有意に低値を示した (Table 4.3.5)。

Table 4.3.5 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on hepatic lipids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Liver			
	Total lipid (mg/g liver)	Triacylglycerol (mg/g liver)	Cholesterol (mg/g liver)	Phospholipids (mg/g liver)
Cholesterol-free diet	71.3 ± 5.1 ^a	20.9 ± 3.2 ^a	4.20 ± 0.07 ^a	24.4 ± 0.3 ^a
High-cholesterol diet				
Control	176 ± 2 ^{cd}	50.1 ± 2.0 ^{ef}	18.3 ± 0.5 ^{de}	28.9 ± 0.6 ^c
Fat fraction	121 ± 3 ^b	26.0 ± 1.5 ^a	14.0 ± 0.4 ^b	27.2 ± 0.4 ^{bc}
Fat subfraction 1	127 ± 3 ^b	27.0 ± 1.3 ^a	14.8 ± 0.5 ^{bc}	26.6 ± 0.3 ^b
Fat subfraction 2	166 ± 4 ^c	33.7 ± 1.7 ^b	14.4 ± 0.4 ^b	26.6 ± 0.4 ^b
Fat subfraction 3	176 ± 4 ^{cd}	40.5 ± 0.8 ^c	17.1 ± 0.5 ^{de}	27.2 ± 0.4 ^{bc}
Fat subfraction 4	184 ± 5 ^d	49.2 ± 2.2 ^{def}	17.8 ± 0.6 ^{de}	26.7 ± 1.0 ^b
Fat subfraction 5	187 ± 7 ^d	48.8 ± 2.4 ^{def}	16.5 ± 0.5 ^{cd}	27.8 ± 0.8 ^{bc}
Fat subfraction 6	167 ± 3 ^c	43.0 ± 1.5 ^{cd}	18.4 ± 0.5 ^{de}	27.2 ± 0.4 ^{bc}
Fat subfraction 7	185 ± 4 ^d	46.2 ± 2.8 ^{cde}	18.8 ± 1.0 ^e	26.8 ± 0.7 ^b
Fat subfraction 8	189 ± 1 ^d	53.9 ± 2.0 ^f	17.2 ± 0.8 ^{de}	27.2 ± 0.6 ^{bc}
Fat subfraction 9	185 ± 5 ^d	50.3 ± 2.6 ^{ef}	17.8 ± 1.0 ^{de}	27.6 ± 0.7 ^{bc}

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d,e,f) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

糞中ステロール (中性ステロールおよび胆汁酸) の排泄量を Table 4.3.6 に示した。中性ステロールは、コレステロール、コプロスタノールおよびコプロスタノンの合計とした。中性ステロールおよび胆汁酸排泄量は、基本食群において対照群において有意に増加した。中性ステロール排泄量は脂質画分および画分 4 群で対照群と比較して有意な増加が見られた。一方で胆汁酸排泄量は、脂質画分群のみで対照群と比較して有意に増加した (Table 4.3.6)。

Table 4.3.6 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on fecal neutral sterols and bile acids in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

	Fecal	
	Neutral sterols [†] ($\mu\text{mol}/3\text{d}$)	Bile acids ($\mu\text{mol}/3\text{d}$)
Cholesterol-free diet	38.0 \pm 1.3 ^a	19.0 \pm 4.5 ^a
High-cholesterol diet		
Control	221 \pm 13 ^{cd}	180 \pm 12 ^{bc}
Fat fraction	347 \pm 7 ^f	245 \pm 8 ^d
Fat subfraction 1	209 \pm 18 ^{bcd}	165 \pm 25 ^b
Fat subfraction 2	215 \pm 9 ^{cd}	182 \pm 10 ^{bc}
Fat subfraction 3	181 \pm 13 ^{bc}	169 \pm 11 ^b
Fat subfraction 4	289 \pm 12 ^e	213 \pm 12 ^{cd}
Fat subfraction 5	173 \pm 20 ^b	161 \pm 11 ^b
Fat subfraction 6	228 \pm 15 ^d	174 \pm 11 ^{bc}
Fat subfraction 7	220 \pm 16 ^{cd}	174 \pm 12 ^{bc}
Fat subfraction 8	184 \pm 9 ^{bc}	155 \pm 11 ^b
Fat subfraction 9	212 \pm 12 ^{bcd}	178 \pm 11 ^{bc}

¹ Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d,e,f) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

肝臓の CYP7A1、FXR、SHP および ABCG5 mRNA 量を Fig. 4.3.2 に示した。肝臓においてコレステロールから胆汁酸への異化代謝の律速酵素である CYP7A1 の mRNA 量は基本食群と対照群で差がなかったものの、脂質画分、画分 1 および画分 2 群で対照群と比較して有意に高値を示した (Fig. 4.3.2)。CYP7A1 の重要な転写因子である FXR と SHP を測定したが、FXR および SHP mRNA 量に有意な変化は見られなかった。ABCG5 mRNA 量は基本食群に比べ、対照群で有意に高値を示した。しかしながら脂質画分およびその他の画分において対照群と比較して ABCG5 の有意な差は見られなかった (Fig. 4.3.2)。

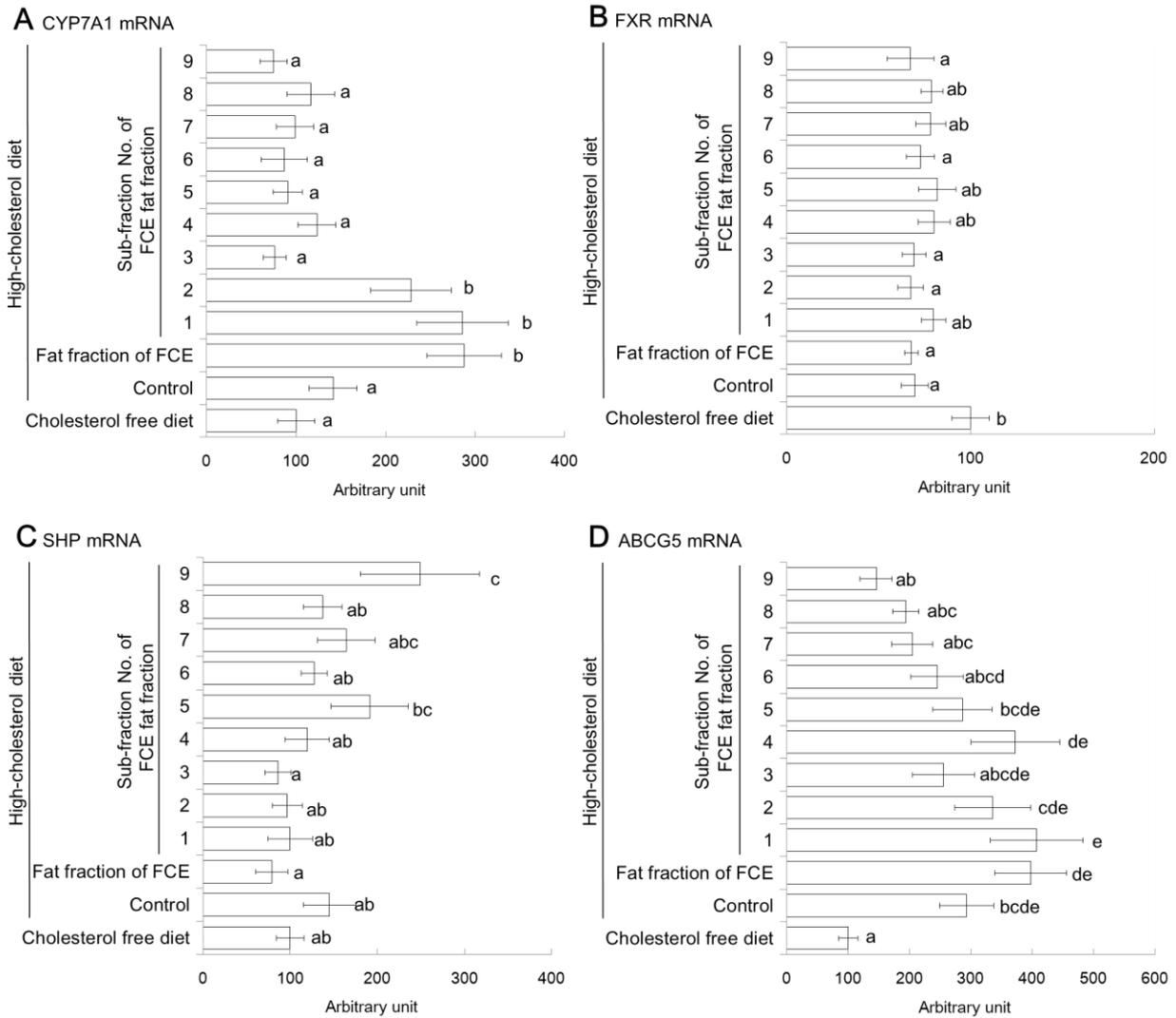


Figure 4.3.2 Effect of fat sub-fraction of freshwater clam extract (FCE) on hepatic mRNA in rats fed a high-cholesterol diet for 14 days¹

Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Duncan's multiple-range test. In each graph, different letters (a,b,c,d,e) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). FCE: Freshwater clam extract

4.3.4. 考察

本章前節において、我々は高コレステロール食によって誘導された高コレステロール血症モデルラットに対し、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分がコレステロール低下作用を示すことを明らかにした。また、FCE 脂質画分は、分離タンパク質画分より強いコレステロール低下作用を示した (Table 4.2.3)。FCE 脂質画分のコレステロール低下作用は、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄促進や肝臓 CYP7A1 および ABCG5 遺伝子発現の促進など、これらの単独もしくは複合的な作用メカニズムによることが示唆された (Table 4.2.4, Fig. 4.2.1)。本節においてもまた、FCE 脂質画分は外因性高コレステロール血症モデルラットの血中コレステロールを低下させることを確認した (Table 4.3.4)。しかしながら、これまで詳細なメカニズムおよびどのような脂溶性成分によってコレステロール低下作用を示すのかは明らかとなっていなかった。本節において、FCE の作用が、どのような成分に由来するのか明らかにするため、FCE 脂質画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 9 つの画分 (画分 1~9) に分画し、それぞれの画分がコレステロール代謝に及ぼす影響を検討した (Fig. 4.3.1)。

画分 1 は、強いコレステロール低下作用を示した (Table 4.3.4)。画分 1 のコレステロール低下作用は肝臓 CYP7A1 遺伝子の発現促進を介していた (Fig. 4.3.2)。しかしながら、画分 1 は糞中への胆汁酸排泄量には影響を及ぼさなかった (Table 4.3.6)。画分 1 はシリカゲルカラムクロマトグラフィーでは保持時間が短く、低極性溶媒によって溶出した。このことは、画分 1 に含まれる成分が低極性化合物であることを示していると思われる。しかしながら、画分 1 を TLC 上に低極性溶媒を用いて展開すると、低い Rf 値であり極性化合物の性質を示した (Fig. 4.3.1)。これらの 2 つの相反する結果 (シリカゲルカラムクロマトグラフィーと TLC の結果) は、画分 1 が両親媒性であることを示している。以上のことから、画分 1 に含まれる化合物は、低極性溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離した際には、逆ミセルを形成して、一方で TLC プレート上では展開する前に逆ミセルが壊れたことが予想される。TLC 分析の結果では、画分 1 はスフィンゴ脂質であった。Duivenvoorden ら (2006) は、APOE*3Leiden マウスにおいてスフィンゴ脂質の投与が血漿コレステロールレベルを低下させることを示している。また、その作用メカニズムとして腸管におけるコレステロール吸収の阻害が示されている (Duivenvoorden et al., 2006)。しかしながら、食餌性スフィンゴ脂質が CYP7A1 遺伝子の発現を減少させることも示している (Duivenvoorden et al., 2006)。

画分 2 も画分 1 同様に、強いコレステロール低下作用を示した (Table 4.3.4)。画分 2 には中性脂肪およびステロールエステルが含まれることが明らかとなった (Fig. 4.3.1)。画分 2 および画分 3 は、中性脂肪が豊富な画分であったが、極性が異なり、画分 2 の方が画分 3 より低極性であっ

た (Fig. 4.3.1)。それ故、画分 2 は画分 3 と比較して、より飽和度が高く、脂肪酸の炭素鎖も長いことが予想された。前節において、FCE 脂質画分とラードの脂肪酸組成を分析した結果において明確な差異は見られなかった (Table 4.2.2)。外部標準として、一般的な食品の脂肪酸組成の分析に適した Spelco®37 FAME mix (Cat. No.47885-U, Sigma-Aldrich, Inc.) を用いて分析を行った。それ故、画分 2 では外部標準に含まれていない未知の脂肪酸がコレステロール低下作用を示している可能性があると思われる。GC/MSによる分析で画分 2 には微量の植物ステロールが含まれていた。しかしながら、画分 2 に含まれている植物ステロールは画分 4 に含まれている植物ステロールの 1/30 の量であり、画分 2 のコレステロール低下作用の強さを説明するには少なすぎると考えられた。そのため、画分 2 に含まれる植物ステロールの影響は小さいものと考えられた。

Iritani ら (1979b) はシジミのコレステロール低下作用が植物ステロールによるものであることを示している。しかしながら、我々の研究に用いた FCE に含まれる植物ステロールの量では、FCE のコレステロール低下作用を十分に説明することは出来ないと思われる。FCE 中の植物ステロールの大部分が画分 4 に分画され、弱いコレステロール低下作用を示した (Table 4.3.4)。FCE 中の植物ステロールは FCE によるコレステロール低下作用に寄与しているものの、植物ステロールで FCE 脂質画分のコレステロール低下作用を説明することは出来ないと思われた (Sugano et al., 1976)。画分 4 のみで糞中への中性ステロール排泄量が増加した (Table 4.3.6)。そのため、FCE 脂質画分による糞中への中性ステロール排泄促進効果は、植物ステロールが主に寄与しているものと思われる。これらの結果から、糞中への中性ステロールの排泄促進は、FCE 脂質画分によるコレステロール低下作用において、主要な作用メカニズムではないと考えられた。Maoka ら (2005) はシジミ中に含まれるいくつかの新規カロテノイドについて報告している。いくつかのカロテノイドがコレステロール低下作用を示すことが報告されている (Fuhrman et al., 1997)。しかしながら、カロテノイドは分解しやすい性質をもつため、本節の研究において、我々はカロテノイドを単離することが出来なかった。

我々は、本節において、FCE 脂質画分は、コレステロール低下作用だけではなく、胆汁鬱滞およびメタボリックシンドロームに対しても有用な効果を示すことを明らかにした。食餌性コレステロールによる胆汁鬱滞の指標の上昇を、FCE 脂質画分は抑制した (Table 4.3.3, Table 4.3.4)。メタボリックシンドロームは通常、インスリン抵抗性および血漿遊離脂肪酸濃度の上昇を伴うことが知られている (Lam, et al., 2002)。本研究において、血中インスリン濃度は測定していないが、ラットにおいて高コレステロール食によって誘導される血清遊離脂肪酸濃度の上昇を、FCE 脂質画分は抑制することが明らかとなった (Table 4.3.4)。それ故、FCE は生活習慣病に対して様々な有用な効果を有する可能性が示唆された。

本節において、コレステロール低下作用が見られた画分 1 および画分 2 に含まれるスフィンゴ

脂質、中性脂肪およびステロールエステルなどの脂質成分は、これまでに明らかとなっているこれらの脂質成分とは異なったメカニズムによってコレステロール低下作用を示している可能性がある。また、本節において、我々はコレステロール低下作用を示す化合物を単離・同定するには至らなかった。それ故、画分1および画分2に含まれるコレステロール低下作用を示す化合物を単離・同定し、その化合物の体内動態について更なる研究を実施する必要がある。

第4節

小括

本章において、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルを用いて、FCE のコレステロール低下作用を検討し、またその生理活性物質の探索を行った。その結果、FCE には強いコレステロール低下作用があることが明らかとなった。FCE の生理活性物質を探索するため、その脂質画分および分離タンパク質画分のコレステロール低下作用を検討し、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分どちらにもコレステロール低下作用があることを明らかにした。特に強いコレステロール低下作用を示した FCE 脂質画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、それぞれの画分のコレステロール低下作用を検討した結果、スフィンゴ脂質を含む画分、トリアシルグリセロール、ステロールエステルを含む画分に強いコレステロール低下作用が見られた。特にスフィンゴ脂質を含む画分 1 に強い活性がみられ、CYP7A1 遺伝子の発現が誘導されていた。このことから、FCE の生理活性物質はスフィンゴ脂質である可能性が示唆され、その作用機序としては、肝臓におけるコレステロールから胆汁酸への異化代謝を促進することで、コレステロール低下作用を示すことが考えられた。貝類のスフィンゴ脂質としては、セタシジミに含まれているセラミド 2-アミノエチルホスホネートをはじめとして、C-P 結合を有する他の高等動物にはない特異的な構造を持つ化合物が発見されている。スフィンゴリン脂質は貝類の最も特徴的な成分であるとされている (林, 1971)。Maoka ら (2005) は、シジミの種類によって含まれるカロテノイドの種類が異なることを報告している。種特有の代謝経路に加え、餌となる藻類の種類などによる影響等が関係していると考えられる。これらのことから、本章においてコレステロール低下作用のあったスフィンゴ脂質を含む画分から新規化合物が発見される可能性も十分に考えられる。今後、更なる研究によって、FCE 中のコレステロール低下作用を有する化合物を単離・同定することが望まれる。

加えて、本章においては十分な検討はできなかったものの、FCE 分離タンパク質画分にも強いコレステロール低下作用が見られた。単なるアミノ酸組成だけでは、十分な説明ができないため、ペプチド等の影響も考えられる。カゼインなどの動物性タンパク質や大豆などの植物性タンパク質がコレステロール代謝に及ぼす影響は報告があるが、魚介類等の水産物のタンパク質がコレステロール代謝に及ぼす影響については研究報告が少ない。今後、FCE 分離タンパク質画分と同等のアミノ酸組成を遊離アミノ酸で構成して投与する、他のタンパク質源と作用機序の比較の検討を行うなどによって詳細を明らかにすることが望まれる。

また、本章において用いた動物モデルは高コレステロール食を投与することによる外因性高コ

レステロール血症モデルである。このモデルは高 VLDL 血症モデルとして非常に有用なモデルである。しかしながら、この高 VLDL 血症モデルは、過剰な食餌性コレステロールによって肝臓におけるコレステロール合成は完全に阻害されている (Dietschy & Siperstein, 1967)。臨床において、高コレステロール血症は外因性および内因性コレステロールどちらにも起因している。そのため、我々は外因性のみならず内因性高コレステロール血症モデルにおいても評価することが重要であると考えている。例えば生体異物によって誘導される内因性高コレステロール血症モデルなどがあると考えられる。最終的には、FCE 中のコレステロール低下作用を示す成分を同定し、内因性および外因性高コレステロール血症モデルどちらにおいても、その効果を確認することが必要であると考えている。

第5章

タイワンシジミ抽出物が生体異物により誘導される 肝障害および高コレステロール血症に及ぼす影響

第1節

タイワンシジミ抽出物がクロレトン誘導 高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響

5.1.1. 緒言

第4章において我々は FCE が高コレステロール食を摂食した高コレステロール血症モデルラットに対し、コレステロール低下作用を示すことを明らかにした。高コレステロール食を摂食させて、高コレステロール血症を引き起こす動物モデルは広く用いられている (Iritani et al., 1979b; Iritani et al., 1980; Xu et al., 2000; Asahina et al., 2005)。しかしながら、このモデルは、過剰な外因性（食餌性）のコレステロールによって、コレステロール合成が阻害されている (Dietschy & Siperstein, 1967)。臨床において、高コレステロール血症の進展には、コレステロール合成が大きな影響を及ぼしている場合がある。そのため、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルだけの検討では、必ずしもコレステロール代謝の研究において十分であるとは言えない。

クロレトン、ペントバビタール、polychlorinated biphenyl (PCB)、butylated hydroxytoluene (BHT)、dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) などの生体異物を投与すると、HDL-コレステロールおよび apoA-I の上昇を伴う高コレステロール血症を引き起こすことが報告されている (Oda et al., 1990; Oda & Yoshida, 1994)。また生体異物の投与は、i) 肝臓への脂肪の蓄積 (Kato et al., 1980; Oda et al., 1994)、ii) 肝臓での薬物代謝酵素の活性化 (Poland et al., 1982)、iii) 尿および組織中のアスコルビン酸濃度の上昇 (Kato et al., 1980; Horio & Yoshida, 1982) などを引き起こすことが報告されている。生体異物によって引き起こされる高コレステロール血症は、主に HMG-CoA レダクターゼの活性化および遺伝子発現の誘導によって引き起こされる (Kato et al., 1980; Nagaoka, et al., 1986)。また生体異物は脂肪酸合成酵素の遺伝子発現を誘導することによって、脂肪肝を引き起こす (Oda et al., 1999)。それ故、生体異物によって誘導される高コレステロール血症は、ヒトにおける内因性高コレステロール血症の良いモデルと考えられる。本章にお

いては、生体異物の1つであるクロレトンを投与することによって引き起こされる、高コレステロール血症および脂肪肝のモデルを用いて FCE の効果を検討した。

5.1.2. 実験方法

5.1.2.1. 試料の調製

FCE は、第 2 章 (2.2.1. FCE の調製および成分分析) に詳細を記載した方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し殻を開口させ肉質部を取り出した。肉質部を粉碎し、肉質部の 2 倍量の加水をし 2 時間加熱攪拌抽出した後、80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。

5.1.2.2. 実験動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期 8:00-20:00、暗期 20:00-8:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (5L37: 日本エスエルシー(株)) で 5 日間、20% カゼイン食の半合成飼料で 4 日間飼育した後に試験に供した。1 群 6 匹の 4 群とした。試験食を Table 5.1.1 に示した。基本食群は 20% カゼイン食にとした。

Table 5.1.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the cholesterol-lowering effect of freshwater clam extract (FCE) in rats fed a chloretone diet.

	Control group	FCE group	Chloretone group	Chloretone+ FCE group
	<i>g/kg</i>			
Casein	200.0	—	200.0	200.0
Sucrose	235.0	202.0	234.0	201.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0
α -Corn starch	470.0	403.0	468.0	401.0
AIN-76 mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-76 vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0
Chlorate	—	—	3.0	3.0
FCE	—	300.0	—	300.0

FCE 群は、タンパク質源を全て FCE として、カゼイン、ショ糖、 α -コーンスターチで置き換え

た。クロレトン群は基本食群に 0.3%クロレトンを添加しショ糖、 α -コーンスターチで置き換えた。クロレトン+FCE 群はクロレトン食のタンパク質源を全て FCE として、カゼイン、ショ糖、 α -コーンスターチで置き換えた。全ての飼料はタンパク質量が同じになるようにした。

試験食の投与開始 14 日目の 18:00 から 4 時間絶食した。22:00 にエーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血した後、肝臓を得た。肝臓は直ちに凍結して、分析まで冷凍保管した。また、試験食投与の最後の 3 日間に糞を採取した。

5.1.2.3. 生化学分析

血清中 AST、ALT、ALP および LAP 活性、直接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸を市販キットで測定した。市販キットはデタミナー AST II、デタミナー ALT II、デタミナー ALP、デタミナー LAP (すべて協和メディックス(株))、イアトロ LQ-BIL (三菱化学メディエンス(株))、TG-EN カイノス (カイノス(株))、T-CHO カイノス (カイノス(株))、HDL-コレステロールテストワコー (和光純薬(株))、リン脂質-C テストワコー (和光純薬(株))、NEFA 試薬 B (シスメックス国際(株))を用いた。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

採取した糞を、凍結真空乾燥し、中性ステロールおよび胆汁酸の分析に用いた。中性ステロールは Delaney らの方法 (2003) により抽出し、TMS 化した。内部標準として 5 α -コレスタンをを用いた。TMS 化したサンプルを GC/MS (GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー(株)) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度：300°C、ディテクタ温度：230°C、カラム：30m \times 0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー(株))、カラム温度：245°C で 2 分間保持、その後 300°C まで 2°C/分で昇温させた。胆汁酸は、Sheltawy および Lowsky の方法 (1975) により酵素法で測定し、リトコール酸を標準として用いた。

肝臓中 cytochrome P450 (CYP) 1A1/1A2、CYP2B1/2B2、hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) レダクターゼ、CYP7A1、LXR、SHP、HNF-4、apoA-I および apoE mRNA 量をノーザンブロット法で測定した。Megaprime DNA ラベリングシステム (アマシャム(株)) でラット CYP2B1、ラット CYP1A2、ハムスター HMG-CoA レダクターゼ、ラット CYP7A1、ラット LXR、ラット SHP、ラット HNF-4、ラット apoA-I およびマウス apoE の cDNA を標識し、ハイブリダイゼーションを行い、イメージアナライザー (BAS 2000, 富士フィルム(株))を用いて測定した。apoE mRNA 量はこの動物モデルでは変化しないことが分かっている (Oda et al., 1995; Yoshida et al., 1996)。そのため apo E mRNA を内部標準として用いた。

5.1.2.4. 統計解析

二元配置分散分析法を用いて相互作用 (クロレトン×FCE) に有意差が見られた場合に、t検定を行い群間の有意差検定を行った。

5.1.3. 結果

ラットの飼料摂取量、体重、肝臓重量を Table 5.1.2 に示した。終体重はクロレトンおよび FCE の影響は見られなかったが、相互作用が見られ、クロレトン群において対照群と比較して有意に高値を示した。飼料摂取量はクロレトン、FCE および相互作用による影響が見られ、クロレトン群において対照群と比較して有意に高値を示し、一方でクロレトン+FCE 群でクロレトン群と比較して有意に低値を示した。肝臓重量はクロレトンにより高値を示し ($p < 0.01$)、一方で FCE により低値を示した ($p < 0.01$)。

胆汁鬱滞の指標となる直接ビリルビン、ALP、LAP について Table 5.1.2 に示した。直接ビリルビンはクロレトンによる影響はなかったが、FCE により増加した ($p < 0.05$)。ALP はクロレトンにより低下し ($p < 0.01$)、FCE によっても低下した ($p < 0.01$)。LAP はクロレトンの影響が見られ、また相互作用も見られた。LAP は、クロレトン群では有意に対照群と比較し有意に高値を示したが、クロレトン+FCE 群ではクロレトン群と比較して有意に低値を示した。

肝障害の指標となる AST および ALT は、クロレトン、FCE および相互作用による影響が見られた (Table 5.1.2)。AST および ALT はクロレトン群で対照群と比較して有意に高値を示したが、クロレトン+FCE 群でクロレトン群と比較して有意に低値を示した。

血清脂質 (中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸) を Table 5.1.2 に示した。血清中性脂肪はクロレトン、FCE および相互作用による影響は見られなかった。血清総コレステロール、HDL コレステロールおよびリン脂質についてはクロレトンにより有意に高値を示した ($p < 0.01$) が、一方で FCE により有意に低値を示した ($p < 0.01$)。血清遊離脂肪酸は、クロレトンによる影響はなかったが、FCE により有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

肝臓脂質 (総脂質、中性脂肪、コレステロール、リン脂質) を Table 5.1.2 に示した。肝臓総脂質および中性脂肪はクロレトンにより、特に増加し、クロレトン群において対照群と比較して有意に高値を示した。しかしながら、肝臓総脂質および中性脂肪はクロレトン+FCE 群ではクロレトン群と比較して、有意に低値を示した。肝臓コレステロールにおいても、クロレトン群において対照群と比較して有意に高値を示したものの、クロレトン+FCE 群ではクロレトン群と比較して有意に低値を示した。さらに、リン脂質もまた、同様にクロレトン群において対照群と比較して有意に高値を示し、クロレトン+FCE 群ではクロレトン群と比較して有意に低値を示した。また肝臓中性脂肪とコレステロールは、FCE 群は対照群と比較して有意に低値を示した。

Table 5.1.2 Effect of freshwater clam extract (FCE) on food intake, body weight, relative liver weight, serum parameter and hepatic lipids in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹

	Control group ²	FCE group ²	Chloretone group ²	Chloretone+ FCE group ²	ANOVA		
					C ³	F ³	I ³
Initial body weight (g)	105 ± 1	105 ± 1	105 ± 1	105 ± 1	NS	NS	NS
Final body weight (g)	182 ± 2	187 ± 2	191 ± 3**	185 ± 2	NS	NS	0.05
Food intake (g for 14d)	224 ± 5	215 ± 3	290 ± 15**	228 ± 9 ^{##}	0.01	0.01	0.05
Relative liver weight (g/100g of body weight)	4.37 ± 0.16	4.11 ± 0.09	6.26 ± 0.12	5.61 ± 0.14	0.01	0.01	NS
Serum							
Direct bilirubin (mg/dL)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	NS	0.05	NS
AST (IU/L)	93.5 ± 6.3	80.8 ± 6.1	256.5 ± 57.2**	58.2 ± 1.7 ^{##}	0.01	0.05	0.01
ALT (IU/L)	48.8 ± 5.2	34.7 ± 2.9	129.3 ± 24.3**	33.5 ± 2.8 ^{##}	0.01	0.01	0.01
ALP (IU/L)	1365 ± 51	1207 ± 43	1289 ± 25	980 ± 35	0.01	0.01	NS
LAP (IU/L)	135.0 ± 1.1	135.3 ± 2.6	144.0 ± 3.7*	127.8 ± 1.0 ^{##}	0.01	NS	0.01
Triacylglycerol (mg/dL)	43.2 ± 6.5	33.2 ± 2.6	29.3 ± 2.0	36.8 ± 5.6	NS	NS	NS
Total cholesterol (mg/dL)	126.2 ± 5.6	60.7 ± 2.2	184.7 ± 8.4	107.3 ± 6.7	0.01	0.01	NS
HDL- cholesterol (mg/dL)	91.8 ± 3.0	50.8 ± 1.7	128.0 ± 4.2	83.0 ± 4.8	0.01	0.01	NS
Phospholipids (mg/dL)	204.2 ± 11.6	109.2 ± 2.4	268.5 ± 10.9	173.2 ± 9.7	0.01	0.01	NS
Free fatty acid (mEq/L)	1.03 ± 0.07	0.76 ± 0.04	1.08 ± 0.03	0.77 ± 0.03	NS	0.01	NS
Liver							
Total lipids (mg/g liver)	74.8 ± 10.2	56.3 ± 1.1	206.1 ± 11.8**	64.0 ± 0.9 ^{##}	0.01	0.01	0.01
Triacylglycerol (mg/g liver)	43.8 ± 14.5	15.7 ± 1.2*	169.8 ± 10.0**	14.0 ± 0.8 ^{##}	0.01	0.01	0.01
Cholesterol (mg/g liver)	3.62 ± 0.26	3.05 ± 0.07*	6.01 ± 0.23**	3.22 ± 0.1 ^{##}	0.01	0.01	0.01
Phospholipids (mg/g liver)	23.7 ± 0.7	24.1 ± 0.2	27.1 ± 0.6**	29.9 ± 0.3 ^{##}	0.01	0.01	0.05

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed two-way ANOVA. When the interaction (chloretone × FCE) was significant, Student's t test was performed. NS, not significant ($p > 0.05$). * and ** indicate that these values differed significantly at $p < 0.05$ or < 0.01 from the values of the control group. # and ## indicate that these values differed significantly at $p < 0.05$ or < 0.01 from the values of the chloretone group.

² Control group, basal diet; FCE group, FCE-supplemented basal diet; chloretone group, chloretone-supplemented basal diet; chloretone + FCE group, chloretone and FCE-supplemented basal diet FCE: Freshwater clam extract

³ C, Chloretone; F, FCE; I, Interaction

糞中への中性ステロール (コレステロール、コプロスタノールおよびコプロスタノンの合計) および胆汁酸排泄量を Table 5.1.3 に示した。糞中中性ステロール排泄量は対照群とクロレトン群で差が見られなかった。一方で、FCE 群は対照群と比較して、また FCE+クロレトン群はクロレトン群と比較して糞中中性ステロールは有意に増加した。また糞中胆汁酸排泄量はクロレトンによる影響はなかったが、FCE により増加した ($p < 0.01$)。

また、糞中への植物ステロールの排泄量 (ブラシカステロール、カンペステロール、スティグ

マステロールおよびβ-シトステロール) は、クロレトンによる影響はなかったが、FCE により有意に増加した ($p < 0.01$, Table 5.1.4)。

Table 5.1.3 Effect of freshwater clam extract (FCE) on fecal dry weight, neutral sterol and bile acids in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹

	Control group ²	FCE group ²	Chloretone group ²	Chloretone+FCE group ²	ANOVA		
					C ³	F ³	I ³
Feces dry weight (g/3 d)	1.24 ± 0.06	3.67 ± 0.09	1.24 ± 0.08	4.25 ± 0.29	NS	0.01	NS
Cholesterol (μmol/3 d)	0.81 ± 0.15	25.0 ± 5.7	1.31 ± 0.17	23.1 ± 4.5	NS	0.01	NS
Coprostanol (μmol/3 d)	4.49 ± 0.38	13.8 ± 3.5	7.00 ± 1.13	42.6 ± 10.5 ^{###}	0.05	0.01	0.05
Coprostanone (μmol/3 d)	0	7.45 ± 1.73	0	9.42 ± 2.10	NS	0.01	NS
Total neutral sterols ⁴ (μmol/3 d)	5.30 ± 0.51	46.2 ± 3.8 ^{**}	8.31 ± 1.27	75.2 ± 10.4 ^{###}	0.01	0.01	0.05
Total bile acids (μmol/3 d)	37.5 ± 2.6	303 ± 36	42.9 ± 3.7	275 ± 32	NS	0.01	NS

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed two-way ANOVA. When the interaction (chloretone × FCE) was significant, Student's t test was performed. NS, not significant ($p > 0.05$). ** indicates that these values differed significantly at $p < 0.01$ from the values of the control group. ### indicates that these values differed significantly at $p < 0.01$ from the values of the chloretone group.

² Control group, basal diet; FCE group, FCE-supplemented basal diet; chloretone group, chloretone-supplemented basal diet; chloretone + FCE group, chloretone and FCE-supplemented basal diet FCE: Freshwater clam extract

³ C, Chloretone; F, FCE; I, Interaction

⁴ Total neutral sterols, cholesterol + coprostanol + coprostanone.

Table 5.1.4 Effect of freshwater clam extract (FCE) on fecal phytosterol in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹

	Control group ²	FCE group ²	Chloretone group ²	Chloretone+FCE group ²	ANOVA		
					C ³	F ³	I ³
Brassicasterol (μmol/3 d)	0	9.41 ± 1.83	0	8.00 ± 1.23	NS	0.01	NS
Campesterol (μmol/3 d)	0.398 ± 0.060	17.3 ± 3.8	0.573 ± 0.098	15.3 ± 2.5	NS	0.01	NS
Stigmasterol (μmol/3 d)	0	8.76 ± 1.50	0	8.10 ± 0.92	NS	0.01	NS
β-sitosterol (μmol/3 d)	0.758 ± 0.136	9.94 ± 2.20	1.27 ± 0.23	9.06 ± 1.47	NS	0.01	NS
Total phytosterols ⁴ (μmol/3 d)	1.16 ± 0.19	45.4 ± 9.3	1.85 ± 0.33	40.5 ± 6.1	NS	0.01	NS

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed two-way ANOVA. When the interaction (chloretone × FCE) was significant, Student's t test was performed. NS, not significant ($p > 0.05$).

² Control group, basal diet; FCE group, FCE-supplemented basal diet; chloretone group, chloretone-supplemented basal diet; chloretone + FCE group, chloretone and FCE-supplemented basal diet FCE: Freshwater clam extract

³ C, Chloretone; F, FCE; I, Interaction

⁴ Total phytosterols, brassicasterol + campesterol + stigmasterol + β-sitosterol.

肝臓の CYP1A1/1A2、CYP2B1/2B2、HMG-CoA レダクターゼ、CYP7A1、LXR、HNF-4、SHP および ApoA-I mRNA 量を Fig. 5.1.1 に示した。CYP1A1/1A2 mRNA 量はクロレトンによる影響は

なかったものの、FCEにより有意に増加した ($p < 0.01$)。CYP2B1/2B2 mRNA量はクロレトンにより有意に増加した ($p < 0.01$) が、FCEによる影響はなかった。クロレトンにより HMG-CoA レダクターゼ mRNA 量が増加傾向を示したものの有意な差は見られなかった。また、FCEによる影響もなかった。CYP7A1 mRNA はクロレトンによる影響はなかったが、FCEにより有意に増加した ($p < 0.01$, Fig. 5.1.1)。CYP7A1 の転写因子である LXR、HNF-4 および SHP mRNA 量を測定している。クロレトンは SHP mRNA 量を有意に増加させた ($p < 0.05$) が、LXR および HNF-4 mRNA 量には影響しなかった。また、FCEは LXR、HNF-4 および SHP mRNA 量のいずれに対しても影響しなかった。Apo A-I mRNA 量はクロレトンによる影響は見られなかったものの、FCEにより有意に減少した ($p < 0.01$, Fig. 5.1.1)。

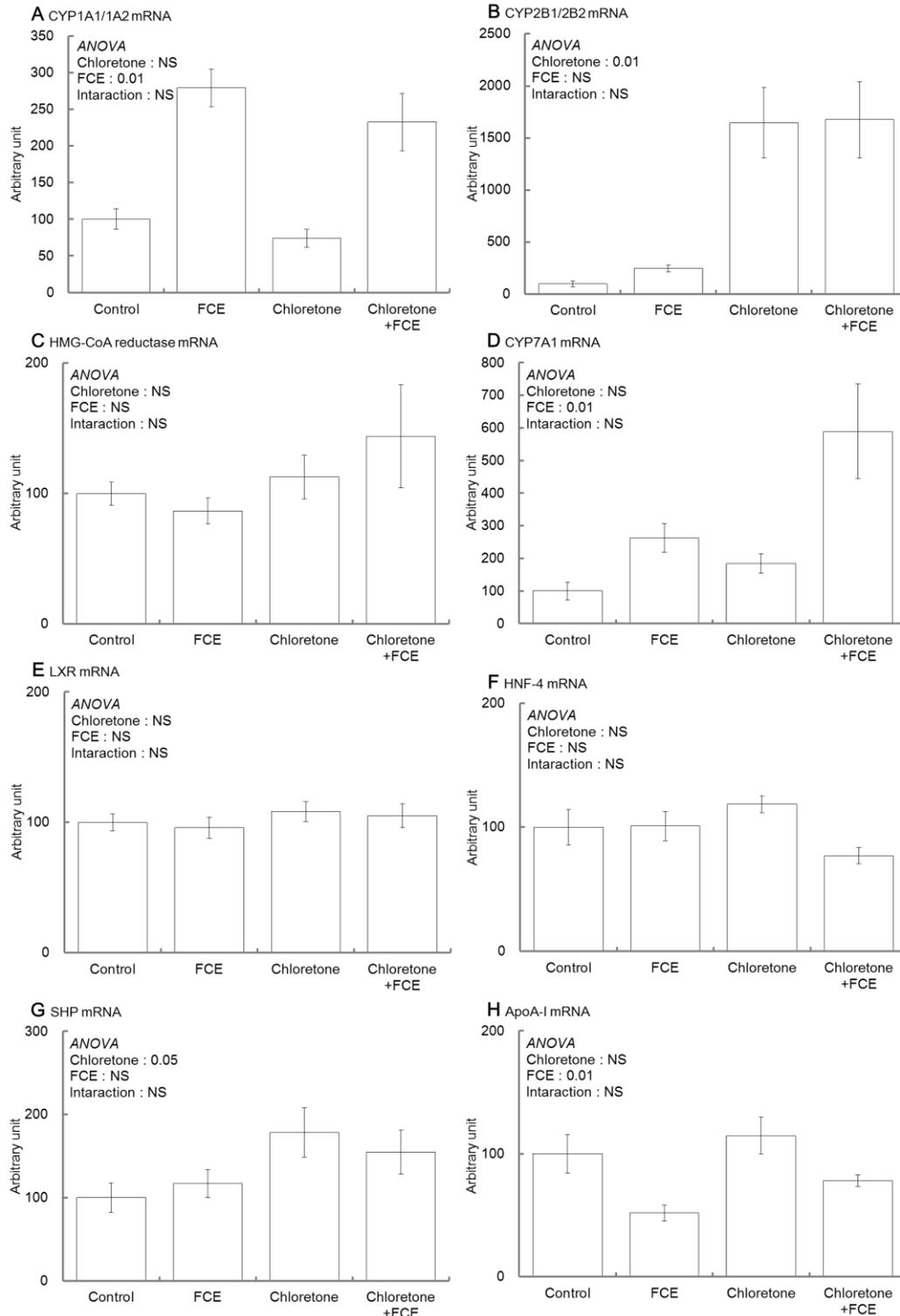


Figure 5.1.1 Effect of freshwater clam extract (FCE) on hepatic (A) CYP1A1/1A2 (B) CYP2B1/2B2, (C) HMG-CoA reductase, (D) CYP7A1, (E) LXR, (F) HNF-4, (G) SHP and (H) apoA-I mRNA in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹.

Each value represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed two-way ANOVA. . When the interaction (chloretone \times FCE) was significant, Student's t test was performed. NS, not significant ($p > 0.05$). Control group, basal diet; FCE group, FCE-supplemented basal diet; chloretone group, chloretone-supplemented basal diet; chloretone + FCE group, chloretone and FCE-supplemented basal diet.

5.1.4. 考察

先行研究により、シジミは高コレステロール食によって誘導された高コレステロール血症モデルラットに対しコレステロール低下作用を示すことが報告されている (Iritani et al., 1979b; Iritani et al., 1980)。シジミによるコレステロール低下作用は主に、シジミに含まれる植物ステロールによるコレステロール吸収阻害によると考えられていた (Iritani et al., 1979b)。しかしながら、我々は前章において高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症ラットに対する FCE のコレステロール低下作用は、CYP7A1 遺伝子の誘導を介したコレステロールから胆汁酸への異化代謝促進作用による可能性を示した。

クロレトンなどの生体異物は、血清および肝臓コレステロールレベルを増加させることが知られている (Kato et al., 1980; Nagaoka, et al., 1986; Oda et al., 1999)。生体異物によって誘導される高コレステロール血症は、HMG-CoA レダクターゼ活性 (Kato et al., 1980; Nagaoka, et al., 1986) およびその遺伝子発現 (Oda et al., 1999) が促進されることに伴う、肝臓におけるコレステロール合成の促進によって誘導される。本節において、クロレトンによってラットの血清および肝臓コレステロールは上昇し、先行研究と同様の結果を示した (Table 5.1.2, Kato et al., 1980; Nagaoka, et al., 1986; Oda et al., 1999)。しかしながら、肝臓 HMG-CoA レダクターゼの遺伝子発現はクロレトンによって促進される傾向にあったものの、有意差は見られなかった (Fig. 5.1.1)。また、HMG-CoA レダクターゼ活性は測定していないものの、血清および肝臓コレステロール濃度はクロレトンによって増加した (Table 5.1.2)。本節における研究では、全てのラットはコレステロールを含まない飼料を摂取している。それ故、クロレトンの投与によってラットの肝臓においてコレステロール合成が促進され、高コレステロール血症が誘導されたものと考えられる。

我々は前章において、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットに対する FCE のコレステロール低下作用は、CYP7A1 遺伝子の発現促進を介したコレステロールから胆汁酸への異化代謝の促進による可能性を示した。また、高コレステロール食による高コレステロール血症モデルにおいては、FCE の CYP7A1 遺伝子の誘導には HNF-4 が関与している可能性を示した (Fig. 4.1.2)。しかしながら、本節においてクロレトンによって誘導される高コレステロール血症モデルラットにおいて FCE は CYP7A1 遺伝子を誘導したが、HNF-4 遺伝子には影響を及ぼさなかった (Fig. 5.1.1)。

生体異物を投与すると高 α リポタンパク血症および apoA-I の増加が誘導されることが知られている (Oda et al., 1990; Oda & Yoshida 1994)。生体異物は apoA-I と HDL コレステロールの過剰産生を誘導することが示されている (Oda & Yoshida 1994)。Walsh ら (1989)はヒト apoA-I 遺伝子を有する遺伝子改変マウスにおいて、HDL コレステロールと apoA-I レベルが相関関係を有すること

を示している。Sorci-Thomas ら (1989) は血清 apoA-I 濃度と肝臓 apoA-I 濃度に正の相関関係があることを示している。以上のことから、本節において、FCE による総コレステロールおよび HDL コレステロール低下作用は、apoA-I 遺伝子の発現抑制を介している可能性が考えられる。

生体異物の投与は、脂肪肝を引き起こすことが知られている。Hitomi ら (1993) は PCB によって誘導される脂肪肝は、malic enzyme (ME)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) などの nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 産生酵素の誘導を介して起こることを示している。本節において FCE はクロレトンによって引き起こされる肝臓への脂質蓄積を抑制した (Table 5.1.2)。DNA マイクロアレイによる分析では FCE は健常ラットにおいて ME および G6PD 遺伝子の発現を抑制することが明らかとなっている (Laurent et al., 2013)。クロレトンを摂取したラットにおいても、これらの遺伝子発現が抑制されている可能性が考えられた。

本節において FCE は高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症に対してのみならず、生体異物によって誘導される高 α リポタンパク血症を伴うことが特徴である高コレステロール血症モデルに対してもコレステロール低下作用を示すことが明らかとなった。さらに、FCE は生体異物によって誘導される脂肪肝に対しても改善効果を示すことが明らかとなった。これら FCE の作用は、CYP7A1、apoA-I、ME および G6PD などの脂質代謝に関連する遺伝子の変化を介したものである可能性が示唆された。しかしながら、FCE 中のいかなる成分が作用して、これらの有益な作用を示すのかは、未知であり、更なる研究の必要がある。

第2節

タイワンシジミ抽出物の脂質画分および分離タンパク質画分が クロレトン誘導高コレステロール血症モデルラットに及ぼす影響

5.2.1. 緒言

クロレトンなどの生体異物を投与すると、HDL-コレステロールおよびアポ A-I の上昇を伴う高コレステロール血症を引き起こすことが報告されている (Oda et al., 1990; Oda & Yoshida, 1994)。本章第1節において我々は FCE が生体異物であるクロレトンを摂食したラットに対し、コレステロール低下作用を示すことを明らかにした。

また生体異物の投与は、i) 肝臓への脂肪の蓄積 (Kato et al., 1980; Oda et al., 1994)、ii) 肝臓での薬物代謝酵素の活性化 (Poland et al., 1982)、iii) 脂質過酸化の促進 (Kato et al., 1981; Oda et al., 1987)、iv) 肝障害 (Sturgill & Lambert, 1997) などを引き起こすことが報告されている。生体異物によって引き起こされる脂肪肝は、脂肪酸合成酵素遺伝子の発現を促進することによると考えられる (Hitomi et al., 1993)。生体異物の投与は脂肪肝と慢性的な肝障害を引き起こす (Oda et al., 1987)。それ故、生体異物投与による肝障害モデルは遺伝子改変やアルコール摂取を伴わない肝障害モデルとして適している。前節において、FCE はクロレトンによって誘導される脂肪肝および血清トランスアミナーゼの上昇を抑制することを示した。また、第2章において FCE はガラクトサミンによって誘導される急性肝障害に対し抑制効果を示すことを明らかにした。また、出血性ショック (Peng et al., 2008) や四塩化炭素 (Hsu et al., 2010) によって誘導される肝障害に対しても、FCE は抑制効果を示すことが報告されている。

それ故、本節では、FCE およびその主要な構成成分である脂質画分および分離タンパク質画分が、クロレトンによって誘導される脂肪肝および肝障害に対して、どのような効果を示すのか詳細に検討することを目的とした。また、併せて、コレステロール代謝に及ぼす影響についても検討を行った。

5.2.2. 実験方法

5.2.2.1. 試料の調製

FCE は、第 2 章 (2.2.1. FCE の調製および成分分析) に詳細を記載した方法で調製した。タイワンシジミ (*C. fluminea*) を蒸煮し殻を開口させ肉質部を取り出した。肉質部を粉碎し、肉質部の 2 倍量の加水をし 2 時間加熱攪拌抽出した後、80 メッシュの濾布で濾過した。濾液を噴霧乾燥し、FCE を得た。FCE 脂質画分および分離タンパク質画分は第 4 章 第 2 節 (4.2.2.1. FCE 脂質画分/分離タンパク質画分の調製および成分分析) に詳細を記載した方法で調製した。FCE をクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) で一晚攪拌抽出し、濾過した。残渣に同様の溶媒を加え更に抽出、濾過した。濾液を減圧下で濃縮・乾固し FCE 脂質画分を得た。脂質画分調製後の残渣を風乾し、乾燥した残渣を、 β -アミラーゼで処理した後、沸騰した水浴中で酵素失活させた。室温までさました後、冷却したアセトンで 3 倍量加え、高分子を沈殿させた。沈殿を濾過し室温で風乾し、分離タンパク質画分を得た。FCE 脂質画分および分離タンパク質画分の収率は、それぞれ FCE の 21% および 71% であった。

5.2.2.2. 実験動物

4 週齢の Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー(株) (静岡) より購入した。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクルの動物飼育室で、1 匹ずつステンレスケージに入れ飼育した。飼育期間中、飼料および水道水は自由摂取とした。明暗サイクルは、明期を 20:00-8:00、暗期を 8:00-20:00 とした。本動物実験は国立大学法人大分大学にて国立大学法人大分大学動物実験規定に従い大分大学動物実験委員会の承認を得て行った。

馴化させるための予備飼育として市販固形飼料 (5L37：日本エスエルシー(株)) で 2 日間、20% カゼイン食の半合成飼料で 3 日間飼育した後に試験に供した。1 群 6 匹の 5 群とした。試験食を Table 5.2.1 に示した。

基本食群は 20% カゼイン食にとした。対照群は、基本食群に 0.3% クロレトンを添加しショ糖、 α -コーンスターチで置き換えたクロレトン食とした。FCE 群はクロレトン食のタンパク質源を全て FCE として、カゼイン、ショ糖、 α -コーンスターチ、コーン油で置き換えた。また、脂質画分群および分離タンパク質画分群の、それぞれの画分の飼料添加量は、収率から FCE 群の飼料に含まれるそれぞれの画分量と同じになるように決定した。全ての飼料はタンパク質および脂質量が同じになるようにした。

試験食の投与開始 14 日目の 6:00 から 4 時間絶食した。10:00 より断頭により採血した後、肝臓を得た。肝臓は直ちに凍結して、分析まで冷凍保管した。また、試験食投与の最後の 3 日間に糞

を採取した。

Table 5.2.1 Compositions of each diet for the animal experiment regarded with the lipid-lowering and hepato-protective effect of freshwater clam extract (FCE), fat fraction of FCE and FCE protein isolate fraction in rats fed a chloretone diet.

	Basal diet	Chloretone diet			
		Control	FCE	Fat fraction of FCE	FCE protein isolate fraction
			<i>g/kg</i>		
Casein	200.0	200.0	—	200.0	—
Sucrose	228.3	227.3	217.6	227.3	213.0
α -Corn starch	456.7	454.7	435.1	454.7	426.0
Corn oil	70.0	70.0	9.5	9.5	70.0
AIN-93G mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-93 vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Chloretone	—	3.0	3.0	3.0	3.0
FCE	—	—	289.8	—	—
Fat fraction of FCE	—	—	—	60.5	—
FCE protein isolate fraction	—	—	—	—	243.0

5.2.2.3. 生化学分析

血清中 AST、ALT、ALP および LAP 活性、直接ビリルビン、中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸を市販のキットを用いて測定した(それぞれデタミナーAST II、デタミナーALT II、デタミナーALP、デタミナーLAP (すべて協和メディックス株)、イアトロ LQ-BIL (三菱化学メディエンス株)、TG-EN カイノス、T-CHO カイノス (どちらもカイノス株)、HDL-コレステロールテストワコー、リン脂質-C テストワコー (どちらも和光純薬株)、NEFA 試薬 B (シスメックス国際株))。

肝臓脂質は Folch らの方法 (1957) により抽出した後、重量法で総脂質量を測定した。肝臓中性脂肪、コレステロール、リン脂質は血清脂質同様に市販のキットで測定した。

採取した糞を、凍結真空乾燥し、中性ステロールおよび胆汁酸の分析に用いた。中性ステロールは Delaney らの方法 (2003) により抽出し、TMS 化した。内部標準として 5 α -コlestタンを用いた。TMS 化したサンプルを GC/MS (GC6890/5973MSD, アジレント・テクノロジー株) によって分析した。GC/MS の分析条件は以下の通りである。インジェクタ温度：300°C、ディテクタ温度：230°C、カラム：30m×0.25mm HP-5ms (アジレント・テクノロジー株)、カラム温度：245°C で 2 分間保持、その後 300°C まで 2°C/分で昇温させた。胆汁酸は、Sheltawy および Lowsky の方法 (1975) により酵素法で測定し、リトコール酸を標準として用いた。糞中ステロールの測定は基本的実験方法 7.4.3 に記載の方法で行った。

Chomczynski および Sacchi の方法 (1987) で肝臓中 RNA を抽出した。20 μ g の RNA をノーザン

ブロット法またはリアルタイム PCR 法による分析に用いた。肝臓中 CYP1A1/1A2、CYP2B1/2B2 および apoE mRNA 量をノーザンブロット法で、FAS、fatty acid desaturase (FADS) 1、ME、CYP7A1、ABCG5 mRNA 量はリアルタイム PCR 法で分析した。ノーザンブロット法による CYP2B1/2B2、CYP1A1/1A2 および apoE mRNA 量は以下の方法で行った。Megaprime DNA ラベリングシステム (アマシャム株) でラット CYP2B1、ラット CYP1A2 およびマウス apoE の cDNA を標識し、ハイブリダイゼーションを行い、イメージアナライザー (BAS 2000, 富士フィルム株)を用いて測定した。apoE mRNA 量はこの動物モデルでは変化しないことが分かっている (Oda et al., 1995; Yoshida et al., 1996)。そのため apo E mRNA を内部標準として用いた。定量リアルタイム PCR 法による FAS、FADS1、ME、CYP7A1、ABCG5 mRNA 量の測定は以下のように行った。High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Inc.) を用いて cDNA クローンを合成した。用いたプライマーは以下の通りである。

Rat FAS forward, 5'-CCAAGCAGGCACACACAATG-3'; rat FAS reverse, 5'-GATACCTCCGTCGACAATAG-3', rat FADS1 forward, 5'-GCTGAAAGGCCTCCTATGTC-3'; rat FADS1 reverse, 5'-TTCCGGTCATGATCAATGTG-3', rat ME forward, 5'-CTTGTTGCCACCCTGCATTG-3'; rat ME reverse, 5'-TAAGCACACTGTAGAAGAGC-3', rat CYP7A1 forward, 5'-TGTGTGAGGGACCAGGTCTCT-3'; rat CYP7A1 reverse, 5'-AGCTCCAAAAGGTTGGAGGA-3', rat ABCG5 forward, 5'-TGTCCTTCAGCGTCAGCAAC-3'; rat ABCG5 reverse, 5'-TCTGGCCACTCTCGATGTAC-3', rat 18s forward, 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'; rat 18s reverse, 5'-TTGGCAAATGCTTTTCGCTC-3'

PCR 反応は StepOne real time PCR system (Applied Biosystems, Inc.) で行い検量線法によって mRNA 量を算出した。FAS、FADS1、ME、CYP7A1、ABCG5 mRNA 量は 18s mRNA 量を内部標準として用いて補正した。

5.2.2.4. 病理組織分析

肝臓組織はホルマリン固定しパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン (H & E) 染色した。また凍結した組織をオイルレッド O 染色した。それぞれの切片を光学顕微鏡下で観察した。

5.2.2.5. 統計解析

一元配置分散分析法を用いて有意差が見られた場合に、Tukey (1949) の多重分析により群間の有意差検定を行った。

5.2.3. 結果

ラットの飼料摂取量、体重、肝臓重量を Table 5.2.2 に示した。体重および飼料摂取量は5群間で有意な差が見られなかった。肝臓重量は対照群において基本食群と比較して有意に高値を示した。肝臓重量はFCE群および分離タンパク質画分群では対照群と比較して有意に低値をしめしたが、一方で脂質画分群では対照群と有意な差が見られなかった。FCEの摂取による効果は見られなかった。しかし体重増加量は15%および30%FCE群においてコントロール群に比べ有意に増加した。

Table 5.2.2 Effect of freshwater clam extract (FCE) and fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on food intake, body weight, relative liver weight, serum parameter and hepatic lipids in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹

	Basal diet	Chloretone diet			
		Control	FCE ²	Fat fraction of FCE ²	FCE protein isolate fraction ²
Initial body weight (g)	89.4 ± 1.6	89.4 ± 1.6	89.4 ± 2.2	89.3 ± 1.9	89.4 ± 2.5
Final body weight (g)	160 ± 4	151 ± 3	153 ± 3	156 ± 4	145 ± 4
Food intake (g for 14 days)	190 ± 5	181 ± 3	193 ± 2	191 ± 5	181 ± 6
Relative liver weight (g/100g of body weight)	4.00 ± 0.09 ^a	6.78 ± 0.23 ^c	5.49 ± 0.03 ^b	6.24 ± 0.16 ^c	5.07 ± 0.11 ^b
Serum					
Direct bilirubin (mg/dL)	0.015 ± 0.002	0.010 ± 0.000	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.002
AST (IU/L)	192 ± 12 ^a	397 ± 78 ^b	171 ± 8 ^a	161 ± 11 ^a	158 ± 8 ^a
ALT (IU/L)	50.0 ± 3.4 ^a	181 ± 43 ^b	52.8 ± 2.9 ^a	54.8 ± 4.9 ^a	56.7 ± 3.7 ^a
ALP (IU/L)	1529 ± 64 ^b	1524 ± 65 ^b	908 ± 31 ^a	937 ± 24 ^a	1080 ± 29 ^a
Triacylglycerol (mg/dL)	34.5 ± 3.6	22.7 ± 2.7	32.7 ± 1.4	28.8 ± 2.5	25.0 ± 6.9
Total cholesterol (mg/dL)	99.0 ± 7.0 ^a	215 ± 6 ^d	114 ± 5 ^{ab}	131 ± 7 ^b	173 ± 11 ^c
HDL-cholesterol (mg/dL)	69.5 ± 4.3 ^a	129 ± 3 ^c	76.8 ± 2.9 ^{ab}	90.7 ± 4.1 ^b	113 ± 7 ^c
Phospholipids (mg/dL)	163 ± 7 ^a	296 ± 10 ^d	184 ± 6 ^{ab}	201 ± 9 ^b	246 ± 11 ^c
Free fatty acid (mEq/L)	1.02 ± 0.05	1.11 ± 0.04	1.07 ± 0.03	0.93 ± 0.05	1.02 ± 0.06
Liver					
Total lipids (mg/g liver)	58.1 ± 2.5 ^a	167 ± 5 ^c	68.4 ± 0.8 ^{ab}	61.0 ± 0.9 ^{ab}	71.8 ± 2.4 ^b
Triacylglycerol (mg/g liver)	18.0 ± 0.8 ^b	55.7 ± 2.1 ^c	15.6 ± 0.5 ^b	9.89 ± 0.54 ^a	17.4 ± 1.8 ^b
Cholesterol (mg/g liver)	3.11 ± 0.10 ^{ab}	4.91 ± 0.15 ^c	2.99 ± 0.07 ^a	3.13 ± 0.11 ^{ab}	3.55 ± 0.16 ^b
Phospholipids (mg/g liver)	23.9 ± 0.3 ^a	28.2 ± 0.5 ^b	29.5 ± 0.3 ^b	28.2 ± 0.5 ^b	29.7 ± 0.6 ^b

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Tukey's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c,d) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

胆汁鬱滞の指標となる直接ビリルビン、ALPについて Table 5.2.2 に示した。直接ビリルビンは、全ての群間で有意差が見られなかった。ALPは基本食群と対照群で有意差は見られなかったもの

の、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群においては対照群と比較して有意に低値を示した。肝障害の指標となる AST 及び ALT については対照群では基本食群と比較して有意に高値を示したが、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群では対照群と比較して有意に低値を示し基本食群と同程度であった (Table 5.2.2)。

血清脂質 (中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸) を Table 5.2.2 に示した。血清総コレステロール、HDL コレステロールおよびリン脂質は対照群において基本食群と比較し有意に高値を示した。血清総コレステロールおよびリン脂質は、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群のすべてにおいて、対照群と比較して有意に低値を示した。HDL-コレステロールは FCE 群および脂質画分群のみで対照群と比較し有意に低値を示したが、分離タンパク質画分群では対照群と差が見られなかった。血清中性脂肪および遊離脂肪酸については群間で差が見られなかった (Table 5.2.2)。

肝臓脂質 (総脂質、中性脂肪、コレステロール、リン脂質) を Table 5.2.2 に示した。肝臓脂質はすべて対照群において、基本食群と比較し有意に高値を示した。肝臓総脂質、中性脂肪およびコレステロールは、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群のすべてにおいて対照群と比較して有意に低値を示した。一方で肝臓リン脂質は FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群において、対照群と差がなかった (Table 5.2.2)。

肝組織の顕微鏡写真を Fig. 5.2.1 (オイルレッド O 染色: (A)-(E), H & E 染色 : (F)-(J)) に示した。オイルレッド O 染色した組織において対照群では脂肪滴が確認された (Fig. 5.2.1(A)-(E))。H & E 染色した組織では対照群において門脈域の空胞の数が基本食群と比較して増加していた。しかし、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群においては、肝組織の空胞の蓄積が明らかに抑制されていた。これらの結果は、肝臓脂質量の蓄積の結果と一致していた (Table 5.2.2)。

糞の排泄量および糞中へのステロール排泄量を Table 5.2.3 に示した。糞の乾燥重量は基本食群および対照群と比較して、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群において有意に高値を示した。糞中への中性ステロール (コレステロール、コプロスタノールおよびコプロスタノンの合計) および胆汁酸の排泄量は、対照群と基本食群に有意差は見られず、クロレトンの影響はなかった。一方で、FCE 群、および脂質画分群においては対照群と比較して、糞中への中性ステロール排泄量が有意に高値を示した。また、糞中への胆汁酸排泄量は、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群において対照群と比較して有意に高値を示した (Table 5.2.3)。

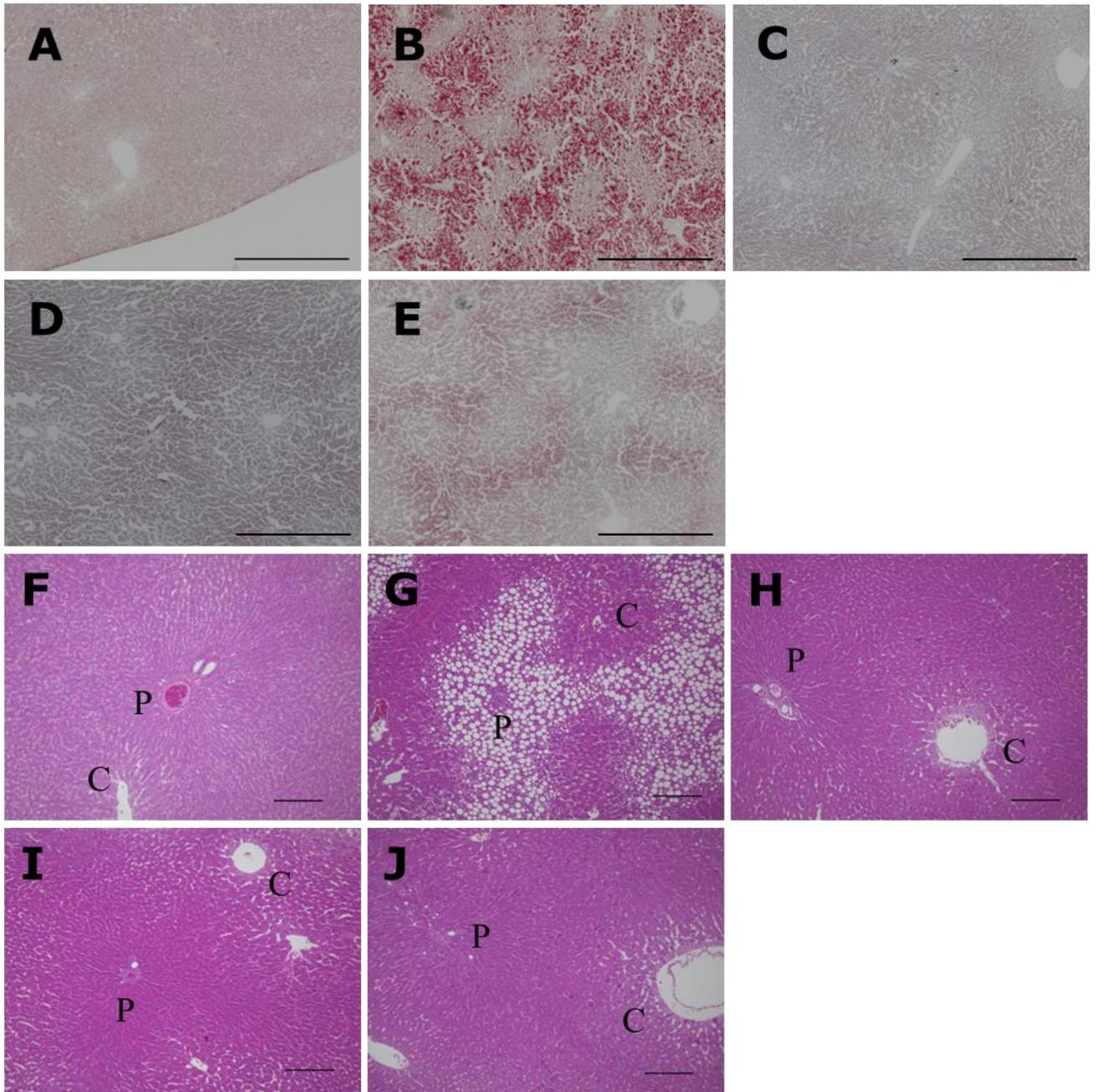


Figure 5.2.1 Histological changes of liver lobes in rats fed a basal, chloretone-containing diet, supplemented with an FCE total, fat fraction of FCE, or FCE protein isolate fraction diet for 14 days.

All images are light micrograph liver sections from rats fed a (A), (F) basal diet; (B), (G) chloretone-containing diet; (C), (H) chloretone-containing diet supplemented with FCE; (D), (I) chloretone-containing diet supplemented with the fat fraction of FCE; (E), (J) diet that contained chloretone supplemented with the FCE protein isolate fraction. In figure (A)–(E), sections were stained with Oil Red-O, and scale bar indicate 500 μm . In figure (F)–(J), sections were stained with H & E, and scale bar indicate 100 μm . P, portal vein; C, central vein.

Table 5.2.3 Effect of freshwater clam extract (FCE) and fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on fecal dry weight, neutral sterols and bile acids in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days¹

	Basal diet	Chloretone diet			
		Control	FCE ²	Fat fraction of FCE ²	FCE protein isolate fraction ²
Feces dry weight (<i>g/3 d</i>)	0.81 ± 0.05 ^a	0.88 ± 0.05 ^a	3.1 ± 0.1 ^d	1.6 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.2 ^c
Total neutral sterols ³ (<i>μmol/3 d</i>)	33.1 ± 0.7 ^a	30.8 ± 3.7 ^a	162 ± 8 ^b	157 ± 12 ^b	37.6 ± 3.3 ^a
Total bile acids (<i>μmol/3 d</i>)	18.7 ± 1.8 ^a	25.3 ± 2.7 ^a	86.0 ± 6.0 ^b	61.8 ± 6.0 ^b	84.6 ± 10.5 ^b

¹ Each value represents the mean ± SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and then by Tukey's multiple-range test. Mean values within a column with different superscript letters (a,b,c) are significantly different ($p < 0.05$).

² FCE: Freshwater clam extract

³ Total neutral sterols means the sum of cholesterol, coprostanol and coprostanone.

FCEによる肝障害および脂肪肝に対する保護作用のメカニズムの一端を解明するため、薬物代謝酵素および脂質代謝に関わる遺伝子発現を測定した。一般的な薬物代謝酵素として CYP1A1/1A2 および CYP2B1/2B2 mRNA 量を Fig. 5.2.2 に示した。FCE 群および脂質画分群では対照群と比較して CYP1A1/1A2 mRNA 量が高値を示す傾向にあった ($p > 0.05$)。一方で対照群と基本食群では CYP1A1/1A2 mRNA 量に有意差はなく、クロレトンの影響はなかった。CYP2B1/2B2 mRNA 量はクロレトンにより誘導され、対照群では基本食群と比較して有意に高値を示した。しかしながら、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群においては CYP2B1/2B2 mRNA 量は対照群と比較して有意差は見られず、影響しなかった。

脂質代謝の重要な酵素である FAS、FADS1 および ME の肝臓中 mRNA 量を Fig. 5.2.2 に示した。FAS および FADS1 mRNA 量は基本食群と比較して対照群において高値を示したものの、有意差はなかった。クロレトンによって誘導される FAS mRNA の発現を FCE および脂質画分は抑制し、基本食群と比較して有意に低値を示した。FADS1 mRNA 量は、対照群と比較して FCE 群において低値を示す傾向にあり、また脂質画分群においては有意に低値を示した。しかしながら分離タンパク質画分は FAS および FADS1 mRNA 量に影響しなかった。肝臓 ME mRNA 量は基本食群と比較して、対照群で有意に高値を示し、クロレトンにより誘導された。一方で、FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群においては対照群と肝臓 ME mRNA 量は有意差がなく、FCE およびその2つの画分による影響はなかった。コレステロールの異化代謝の律速酵素である CYP7A1 の肝臓 mRNA 量について有意差はないものの、対照群と比較して FCE 群、脂質画分群および分離タンパク質画分群において高値を示した。肝臓中 ABCG5 mRNA 量は対照群において、基本食群と比較し有意に低値を示した。脂質画分群の肝臓中 ABCG5 mRNA 量は、対照群と比較して高値を示す傾向があったが、有意差は見られなかった。

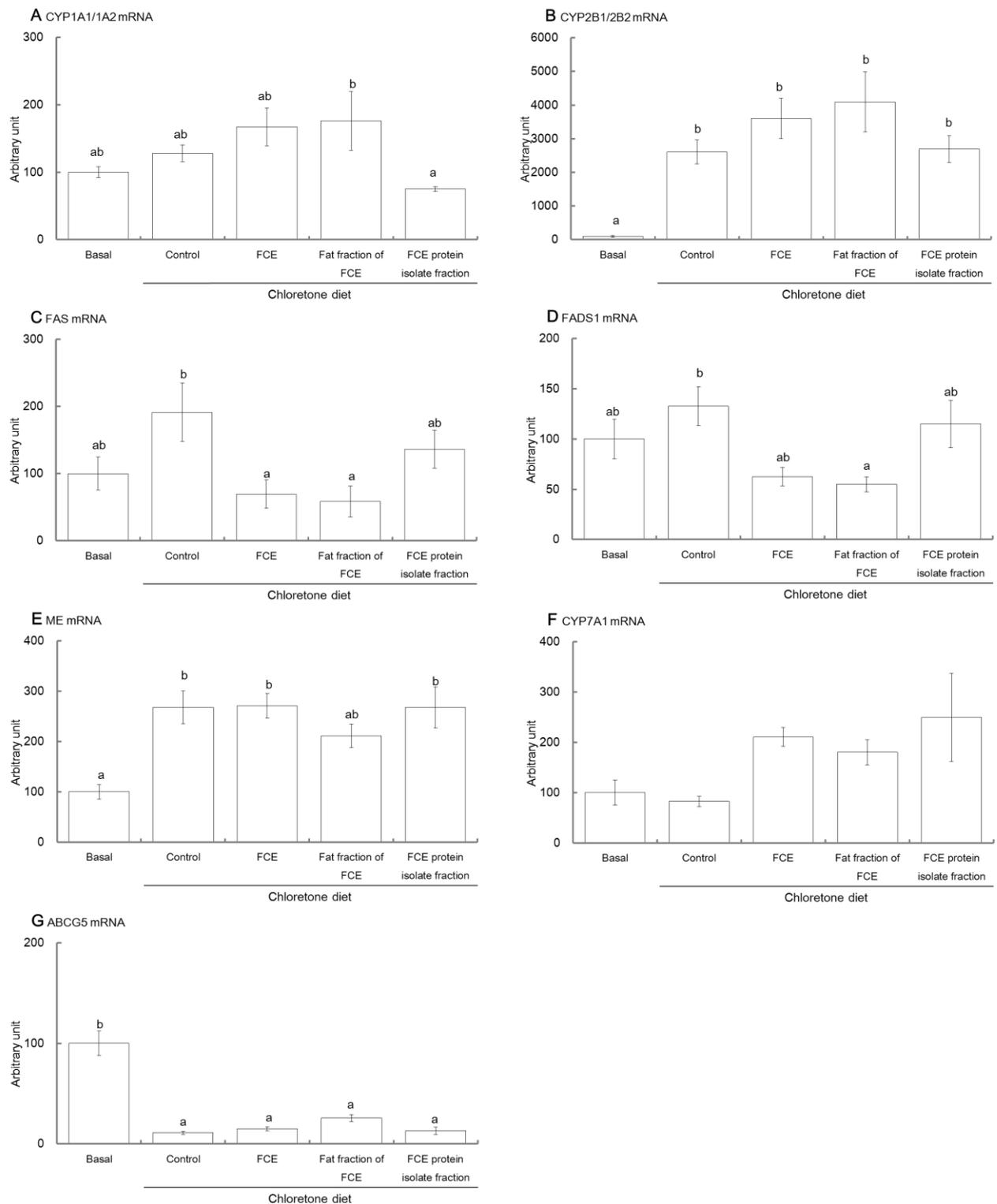


Figure 5.2.2 Effect of freshwater clam extract (FCE) and fat fraction of FCE or FCE protein isolate fraction on hepatic (A) CYP1A1/1A2 (B) CYP2B1/2B2, (C) FAS, (D) FADS1, (E) ME, (F) CYP7A1 and (G) ABCG5 mRNA in rats fed a chloretone-containing diet for 14 days.

¹Data represents the mean \pm SEM for the 6 rats in each dietary group. The statistical differences among the values were analyzed one-way ANOVA and Tukey's multiple range test.

5.2.4. 考察

これまでの研究で、ラットにおいて D-ガラクトサミン (第 2 章)、出血性ショック (Peng et al., 2008) および四塩化炭素 (Hsu et al., 2010) により誘導される肝障害に対し、FCE が肝保護効果を有することが示されている。本節において、我々は FCE およびその主要な画分である脂質画分および分離タンパク質画分が、生体異物としてクロレトンを投与し、肝臓へ脂質が蓄積したラットに対し肝保護作用を示すか否かを検討した。

クロレトンをラットに投与することにより、肝臓への脂質の蓄積が見られた (Table 5.2.2, Fig. 5.2.1)。さらに肝障害の指標である血清トランスアミナーゼ活性の上昇が見られた (Table 5.2.2)。我々は、本研究において、FCE がクロレトンによって誘導される肝臓への脂質の蓄積および肝細胞の障害を改善することを明らかにし、また FCE 脂質画分および分離タンパク質画分も同様の効果を有することを示した (Table 5.2.2, Fig. 5.2.1)。FCE およびその画分 (特に脂質画分) は強い脂質低下作用および肝保護作用を示した (Table 5.2.2, Fig. 5.2.1)。

本章において、FCE およびその画分は肝細胞への脂質 (特に中性脂肪) の蓄積を抑制した (Table 5.2.2, Fig. 5.2.1)。生体異物は、肝臓において特異的に NADPH 産生酵素である G6PD、ME、および 6PGD の誘導を介して、脂肪肝を引き起こすことが示唆されている (Hitomi et al., 1993)。我々は、トランスクリプトミクスによる研究において FCE による肝臓中性脂肪低下作用は、脂肪酸合成およびシグナルに関する遺伝子発現の調節による可能性を示している (Laurent et al., 2013)。さらに、マイクロアレイのネットワーク解析により、脂質代謝の中心的な転写因子の 1 つである SREBP1 が FCE の脂質低下作用に関わっている可能性が示された (Laurent et al., 2013)。加えて、FCE は脂質代謝の重要な酵素をコードしている遺伝子の発現に影響していた (Laurent et al., 2013)。

クロレトン、PCBs、BHT などの生体異物は CYP の発現を誘導することが示されている (Oda & Yoshida, 1994)。CYP はミクロソームの電子伝達系におけるスーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) を産生することが知られている (Zangar et al., 2004)。加えて、生体異物は肝臓の脂質過酸化を引き起こす (Fadhel et al., 2002)。生体異物による肝毒性の主な要因は過剰な脂質過酸化であると考えられている。肝臓 CYP2B1/2B2 遺伝子はクロレトンによって誘導されたが、FCE による影響はなかった (Fig. 5.2.2)。そのため、肝障害や脂肪肝に対する FCE の改善効果は、クロレトンによって誘導される肝臓 CYP2B1/2B2 遺伝子の変化では説明することが出来なかった。Hsu ら (2010) は、四塩化炭素を投与したラットにおいて FCE の経口投与が肝臓の脂質過酸化を抑制することを報告している。一方で、Oda ら (1987) は、PCB を投与したラット高用量のビタミン E を経口投与した場合において肝臓の脂質過酸化は抑制されるものの、PCB によって誘導される肝障害はビタミン E によって改善されないことを報告している。加えて、Gulauert ら (2005)

によって、ラットにおいて飼料中ビタミン E は肝臓中 α -トコフェロール量を上昇させるものの、PCB によって誘導される肝障害に対しては作用しないことも報告されている。それ故、肝臓脂質過酸化は、生体異物による肝障害の原因ではない可能性がある (Oda et al., 1987)。ROS は炎症誘発に関わる遺伝子の発現に関係する核内因子 κ -B (NF- κ B) の発現を誘導することが知られている (Sen & Packer, 1996; Baeuerle & Henkel, 1994)。出血性ショックによって誘導される肝障害モデルラットにおいて、FCE は TNF- α の産生を抑制することで肝障害を抑制することが報告されている (Peng et al., 2008)。また、未発表ではあるが、我々の研究においてもクロレトン誘発肝障害モデルに対する FCE および脂質画分、分離タンパク質画分の影響をトランスクリプトミクスによって検討した結果、クロレトンによって引き起こされる TNF- α mRNA レベルの上昇が FCE および脂質画分、分離タンパク質画分によって有意に抑制されることも明らかにしている。生体異物によって誘導される肝障害モデルラットにおいて、FCE およびその脂質画分および分離タンパク質画分が TNF- α の産生抑制を介して肝障害を改善する可能性が示唆された。

Iritani ら (1980) はヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) から調製した中性脂肪が肝臓 G6PD および ME 量の低下を引き起こすことを示している。Iritani ら (1980) の研究でリノール酸 (C18:2) を多く含むコーンオイルの代わりに用いられたヤマトシジミ中の中性脂肪に含まれる長鎖多価不飽和脂肪酸(C18:4, C20:5 および C22:6)の合計値は全体の脂肪酸の 35%以上であった。Iritani ら (1980) は、これらの長鎖多価不飽和脂肪酸がヤマトシジミ中性脂肪における脂肪酸合成低下作用の活性の主体であるとしている。さらに、n-3 系多価不飽和脂肪酸は、遺伝子改変を伴わない非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットにおいて TNF- α の産生を抑制し、肝障害を抑制することが示されている (Svegliati-Baroni et al., 2006)。本研究において用いた FCE 脂質画分中には対照食の脂質であるコーン油と比較して、オレイン酸およびリノール酸は、それぞれ 1/13 および 1/50 量であった (Table 4.2.2)。一方で FCE 脂質画分に含まれる長鎖多価不飽和脂肪酸も多くはなかった。にもかかわらず、FCE 脂質画分は肝臓脂質の蓄積および肝障害を抑制した。それ故、FCE 脂質画分における活性化合物は長鎖多価不飽和脂肪酸以外の脂溶性化合物の可能性が示唆された。

食餌性タンパク質およびアミノ酸組成は肝臓における脂肪酸合成に影響を及ぼすことが知られている (Iritani et al., 1986; Iritani et al., 1996; Shimizu et al., 2006)。加えて、一部のアミノ酸は肝保護効果があることが報告されている (Komano et al., 2009)。FCE 脂質画分は肝臓への脂質画分の蓄積および肝細胞のダメージを抑制した (Table 5.2.2, Fig. 5.2.1)。前章において、FCE のアミノ酸組成はカゼインとほぼ同じであるが、FCE 中のグリシン量は、カゼインと比較して 2~3 倍量含まれていることを示している (Table 2.3)。いくつかの研究において、食餌性グリシンレベルが脂肪酸合成に影響を及ぼすことが報告されている (Hafidi et al., 2004; Park et al., 1999)。加えて、Stachlewitz ら (1999) はラットにおいて、食餌性グリシンが、D-ガラクトサミンによって誘導さ

れる肝障害に対する保護効果を示している。また、グリシンはクッパー細胞による TNF- α 産生を抑制することが報告されている (Wheeler et al., 1999)。FCE 中のグリシン量で、FCE による脂質代謝促進作用および肝保護作用を説明できるか否かは興味深いところである。Iritani ら (1986) は食餌性の植物由来タンパク質 (小麦グルテンおよび大豆タンパク質) が動物由来タンパク質 (カゼインおよび魚由来タンパク質) と比較して、肝臓への中性脂肪の蓄積を抑制すること、また脂肪酸合成酵素 (G6PD および ME) 活性が高いことを報告している。加えて大豆タンパク質は、カゼインと比較して脂肪性合成酵素の遺伝子発現を誘導することを示している (Irinani et al., 1996)。Ascencio ら (2004) は大豆タンパク質が SREBP1 遺伝子の発現を抑制することで脂肪肝に対する改善作用を有することを示している。大豆タンパク質と同様の組成のアミノ酸混合物は肝臓の G6PD および ME 活性を抑制するが、肝臓への中性脂肪の蓄積には影響しないことが報告されている (Iritani et al., 1986)。それ故、FCE 分離タンパク質画分による肝臓への脂質蓄積は、アミノ酸組成による影響ではなく別のメカニズムによる可能性が考えられる。

本章におけるクロレトンによって引き起こされる肝障害モデルと第 2 章でのガラクトサミン誘導肝障害モデルの違いは、肝臓への脂肪の蓄積である。近年、生活習慣の変化によってメタボリックシンドロームやその肝臓での表現型である NASH や NAFLD が問題となっている。NASH の発症メカニズムとして第一段階として肝臓への脂肪の蓄積、第二段階として酸化ストレスやサイトカインによって炎症が引き起こされる two hit theory が提唱されている (Day et al., 1998)。FCE は単に肝障害を予防するだけでなく、肝細胞への脂肪の蓄積も予防することが明らかとなった。また、FCE の脂質画分および分離タンパク質画分ともに肝臓への脂肪の蓄積を予防する作用があり、FCE には水溶性および脂溶性生物どちらにも活性化合物が含まれている可能性が示唆された。これらの複数の成分が複合体として作用することで、いくつかのメカニズムで生理活性を示していること、また FCE は脂肪性肝炎発症メカニズムの第一段階の肝臓への脂肪の蓄積および第二段階である炎症性サイトカインの抑制等の各段階においても抑制的に作用することで脂肪性肝炎を予防する可能性が示唆された。

本節の研究に用いられたラットは脂肪肝および肝障害のみならず、肝臓においてコレステロール合成が促進されたことにより高コレステロール血症も引き起こしている (Table 5.2.2)。FCE およびその脂質画分、分離タンパク質画分は、クロレトンによって誘導された高コレステロール血症モデルラットにおいて、コレステロール低下作用を示した (Table 5.2.2)。FCE によるコレステロール低下作用のメカニズムはこれまでの研究により、i) 肝臓においてコレステロールから胆汁酸への異化代謝、ii) 肝臓から胆管へのコレステロール排泄の促進、iii) 糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄促進によると考えられる。本節の研究においては、コレステロールから胆汁酸代謝への代謝経路における律速酵素である CYP7A1 遺伝子の発現が誘導される傾向にあった

(Fig. 5.2.2)。FCE 脂質画分と FCE 分離タンパク質画分は、糞中へのステロール排泄において異なる作用を示した (Table 5.2.3)。FCE 脂質画分は、クロレトンによって誘導された高コレステロール血症ラットにおいて、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄を促進した (Table 5.2.3)。一方で、FCE 分離タンパク質画分は、糞中への胆汁酸排泄を促進したものの、中性ステロールの排泄には影響を及ぼさなかった (Table 5.2.3)。本節の結果で得られたクロレトンによって誘導される高コレステロール血症モデルにおける FCE 脂質画分および分離タンパク質画分によるコレステロール低下作用は、全章の高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットにおいても同様であった。加えて、我々の結果は、クロレトンが、肝臓から胆管へのコレステロール輸送において重要な役割を果たしている ABCG5 遺伝子の発現を抑制することを示した (Fig. 5.2.2)。それ故、この ABCG5 遺伝子の発現抑制作用はクロレトンによる高コレステロール血症誘導作用のメカニズムの一部を示している可能性があった。前章において、高コレステロール食によって誘導された高コレステロール血症モデルラットにおいては、ABCG5 遺伝子の発現は FCE の脂質画分および分離タンパク質画分によって抑制された (Fig. 4.2.1)。しかしながら、本節の研究においてクロレトンによって誘導される高コレステロール血症モデルにおいては、FCE の脂質画分および分離タンパク質画分は ABCG5 遺伝子の発現には影響を及ぼさなかった (Fig. 5.2.2)。

本節において、FCE およびその主要な構成成分である脂質画分および分離タンパク質画分は、クロレトンによって誘導される肝臓脂質の蓄積に対し抑制作用を示した (Fig. 5.2.1, Table 5.2.2)。DNA マイクロアレイによる研究によって FCE は、健常ラットの肝臓において脂肪合成にかかわる遺伝子を抑制することが明らかになっている (Laurent et al., 2013)。本研究においても、FCE およびその脂質画分は、肝臓の FAS および FADS1 遺伝子の発現を抑制した (Fig. 5.2.2)。一方で、分離タンパク質画分は、これらの遺伝子には影響を及ぼさなかった (Fig. 5.2.2)。このように FCE 脂質画分と分離タンパク質画分は、異なる遺伝子に作用していると思われる。以上のことから、FCE は複数の活性成分を含み、また複数の作用メカニズムによって作用を示していると考えられた。

第3節

小括

第4章において、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットを用いて FCE のコレステロール低下作用を検討し、さらにその活性化合物の探索を行った。その結果、FCE には強いコレステロール低下作用があること、またその脂質画分および分離タンパク質画分のどちらにも高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症を改善する効果があることが明らかとなった。また、特にその生理活性物質としてスフィンゴ脂質がコレステロール異化代謝を促進することでコレステロール低下作用を示している可能性が示唆された。高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルは高 VLDL 血症を引き起こすモデルとして、広く用いられている動物モデルであるが、食餌由来の過剰な外因性コレステロールによって、肝臓におけるコレステロール合成が阻害されている (Dietschy & Siperstein, 1967)。ヒトにおいては、一般的に、食事由来の外因性コレステロールは体内の約 2 割であり、残りの 8 割は肝臓で合成される内因性コレステロールである。そのため、臨床的には、肝臓で合成される内因性コレステロールの影響について検討することも重要である。生体異物は肝臓でのコレステロール合成を促進することで高コレステロール血症を引き起こすことが知られている。そのため、本章においては、生体異物によって肝臓におけるコレステロール合成が高まった高コレステロール血症モデルラットを用いて、FCE がコレステロール代謝に及ぼす影響について検討を行った。

生体異物としてクロレトンを投与することによって引き起こされる内因性高コレステロールモデルラットに対し、FCE を与えることで FCE のコレステロール低下作用を検討した。FCE は、内因性高コレステロール血症モデルにおいても強いコレステロール低下作用を示した。その作用メカニズムの検討を行ったところ、肝臓 CYP7A1 遺伝子の発現が上昇し、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄量が増加していた。FCE によって肝臓におけるコレステロールの異化代謝が促進されていることから、肝臓でのコレステロール合成が高まることも考えられた。しかし、FCE は HMG-CoA レダクターゼ遺伝子の発現には影響しなかった。これらの結果から FCE は、外因性高コレステロール血症モデルおよび内因性高コレステロール血症モデルどちらにおいても、コレステロールの異化代謝に強く作用することによってコレステロール低下作用を示していると考えられた。第4章3節において FCE を分画し、活性化合物の探索を行った。FCE のコレステロール低下作用はスフィンゴ脂質を含む画分 1 やトリアシルグリセロールを含む画分 2 に強い活性があり、FCE のコレステロール低下作用の中心的な作用を担う成分が含まれていると考えられ

えた。そのため、本章における生体異物によって誘導される高コレステロール血症ラットに対する FCE のコレステロール低下作用のメカニズムとしてもコレステロール異化代謝が重要な作用メカニズムであると考えられた。第 4 章および本章の結果から、FCE によるコレステロール低下作用は脂質画分および分離タンパク質画分に含まれるいくつかの成分によって複合的に引き起こされているものの、肝臓におけるコレステロールの異化代謝促進作用を有する脂溶性成分が中心的に作用しているものと推測された。

また、本章において用いたクロレトン投与ラットは肝臓における脂肪酸合成も促進することで脂肪肝および脂肪性肝炎も引き起こすモデルである。FCE はクロレトンによって引き起こされる肝障害に対する予防効果を示した。本章において検討した生体異物によって引き起こされる肝障害モデルと第 2 章でのガラクトサミン誘導肝障害モデルの違いは、肝臓への脂肪の蓄積である。FCE は単に肝障害を予防するだけでなく、肝細胞への脂肪の蓄積も予防した。FCE はコレステロール低下作用同様に、FCE の脂質画分および分離タンパク質画分ともに肝臓への脂肪の蓄積を予防する作用があり、FCE には水溶性および脂溶性生物どちらにも活性化合物が含まれていると推測される。これらの複数の成分が複合体として作用することで、生理活性を示していること、また FCE は脂肪性肝炎発症メカニズムの第一段階の肝臓への脂肪を抑制することで脂肪性肝炎を予防する可能性が示唆された。

第6章

総括

メタボリックシンドロームは心血管疾患や脳血管疾患などの動脈硬化の危険因子である。また、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型が NAFLD や NASH であると考えられている。NASH に加え ASH も線維化から肝硬変や肝がんに進展することが知られている。これらの疾病は、食習慣、運動習慣、飲酒、喫煙、休養などの生活習慣が、その発症と進展に大きく関係している。これら生活習慣病は、日常における食事の質の改善、運動習慣などによる予防および治療が望ましい。一方で、現代社会においては、工場や店舗などにおける夜勤従事者や日勤と夜勤を繰り返すシフトワーカーにおいては、概日リズムの乱れが一因として生活習慣病を引き起こすことが明らかとなっている (Fujino et al., 2006)。このように 24 時間活動し続けている現代社会においては、自らの意思だけでは生活習慣を改善することが困難な場合もある。これらのことから、薬や機能性食品などを生活習慣病の予防、治療に活用することも 1 つの手段であると考えられる。

メタボリックシンドロームの要因の 1 つである脂質異常症の治療薬として世界中で広く使用されているスタチンは、青カビ (*Penicillium citrinum*) から発見され (Endo et al., 1976)、抗がん剤であるタキソールは樹木であるイチイから発見されている (Wani et al., 1971)。これらのように、これまでに多くの天然物から医薬品が開発されているが、その多くが陸上生物を起源としたものである。近年、水生生物を研究対象としたマリンバイオテクノロジーが注目を集めており、陸上生物とは異なる生活環境にあり代謝経路が異なるため新規化合物をもつ水生生物も少なくないと考えられる。天然物から発見された有用化合物を全合成することは、困難な場合があり、起源となる生物を培養、栽培、養殖などによる生物工場として、目的とする化合物もしくは中間体を得る場合もある。その場合には、管理された環境下において、生物をいかに効率的に増殖させるかという問題もあり、マリンバイオロジーにおいて注目されている深海生物など特殊な環境で発見された生物の場合には、飼育が困難という場合もある (Fusetani, 2002)。特に水生の微細藻類や細菌類などが陸上とは異なる生活環境により代謝経路が異なるため新規化合物を有していると期待されている。淡水・海水における微細藻類だけでも 10 万種類以上あると推定されており、非常に種類が多い。またこれらの微細藻類や細菌類は個体そのものが大きくないため、その中に含まれている有用物質の量も少ないことが想定される。そのため、これら微細藻類や細菌類から直接有用物質をスクリーニングすることは膨大な労力がかかることが容易に想定される。これらの微細藻類や細菌類の捕食者である魚介類は、その有用物質を体内に蓄積している可能性があり、探索対象として大きな可能性があると考えられた。特に二枚貝であるシジミは濾過摂食すること

で、環境中の様々な物質を集めていること、さらに環境中では検出できない微量物質、特に脂溶性化合物を体内に濃縮しているため、水生の微細藻類や細菌類からの有用物質を有している可能性があると考えられた。

本論文においては、多くの食経験があり身近な存在ではあるが、これまで研究のあまり進んでいなかった浅瀬の水生生物であるシジミ、特に淡水で生息しているタイワンシジミ (*C. fluminea*) の熱水抽出物である FCE が生活習慣病に対してどのような影響を及ぼすのかを検討し、さらにその生理活性化合物の探索を行うことを目的として研究を行った。

まず、第2章では、FCE がガラクトサミン誘導肝障害モデルに及ぼす影響を検討した。その結果、FCE は、肝障害の指標である血清 AST および ALT 活性の上昇を抑制することが確認された。このことから、FCE はガラクトサミンによって誘導される肝障害に対し保護効果を有することが示唆された。

次いで、第3章では、FCE がアルコールによって引き起こされる肝障害、特に肝臓への脂肪の蓄積に及ぼす影響について、エタノール急性経口投与ラットを用いて検討を行った。その結果として、FCE によって肝臓への脂肪の蓄積を抑制することを明らかにした。エタノールによって引き起こされる肝障害を抑制するメカニズムの1つとして、FCE がアルコール代謝を促進する可能性が考えられた。そのため FCE がアルコール代謝に及ぼす影響について検討を行った。その結果として FCE によって血中アルコール濃度の低下が早まることを確認した。また、これらの結果から FCE はアルコール代謝促進を促進することで、アルコールによって引き起こされる肝臓への脂肪の蓄積に対し抑制作用を示す可能性が示唆された。

第4章および第5章では、高コレステロール食によって誘導される高コレステロール血症モデルラットおよびクロレトンによって誘導される高コレステロール血症モデルラットの2つの実験動物モデルを用いて、FCE がコレステロール低下作用を示すか検討を行い、また FCE 中に含まれるコレステロール低下作用を示す生理活性物質の探索を行った。FCE の主要構成成分である脂質画分、分離タンパク質画分いずれにおいても、コレステロール低下作用があることを明らかにした。さらに、特に強い効果を示した脂質画分から、両親媒性を示すスフィンゴ脂質などを多く含む画分1と中性脂肪およびステロールエステルを多く含む画分2の2つの画分に強いコレステロール低下作用があることを明らかにした。

ガラクトサミン誘導肝障害モデルは、病態が似ていることから、ウイルス性肝炎モデルとして用いられている。しかしながら、アルコール性肝障害や NASH などとも発症メカニズムの一部が類似している点があると考えられる。ガラクトサミンはマスト細胞を活性化させ、ヒスタミンの放出を促進し、腸管透過性を増大させ、腸内細菌の産生するエンドトキシンの流入が増大し、Kupffer 細胞が活性化し、TNF- α の産生が増大し、肝障害を引き起こすと考えられている

(Stachlewitz et al., 1999)。アルコール性肝障害は、まず過剰なアルコール摂取が腸管透過性を亢進し、次いで小腸のグラム陰性菌の増大に伴い、血中エンドトキシン濃度が上昇し、Toll like Receptor (TLR) 4 を介して、Kupffer 細胞を活性化し、ROS や炎症性サイトカインである TNF- α や interleukin-1 の産生が増大し、肝障害を引き起こすと考えられている (Uesugi et al., 2001)。また NAFLD 患者においても、腸管透過性が増大すること (Miele et al., 2009)、血清エンドトキシン濃度が上昇していること (Harte et al., 2010) が報告されている。また高脂肪食によって健常者においても、血漿エンドトキシンが増大することも報告されている (Pendyala et al., 2012)。また、NASH 患者においては、健常者または NASH を伴わない肥満患者と比較すると腸内細菌叢が異なり腸内でのアルコール産生が増大して、NASH の進展に影響を及ぼしている可能性が示唆される結果も報告されている (Zhu et al., 2013)。肝障害を引き起こす原因はいくつかあり、その発症メカニズムもいくつかあると考えられるが、何らかの引き金によって 1) 腸管透過性の亢進、2) 腸内細菌の産生するエンドトキシンの流入の増大、3) Kupffer 細胞が活性化、4) 炎症性サイトカインの産生が増大、5) 肝細胞の炎症、という一連の肝障害発症メカニズムは重複していると思われる。いくつかの研究において、FCE が TNF- α の産生を抑制することが報告されている (Peng et al., 2008, Lee et al., 2012, Huang et al., 2013, Peng et al., 2017)。そのため、FCE は飲酒や高脂肪食などの生活習慣によって引き起こされる ASH や NAFLD/NASH などの肝障害に対しても予防効果を示す可能性が考えられた。FCE は第 2 章においてガラクトサミン誘発肝障害、第 5 章においてクロレトン誘発肝障害を抑制した。この 2 つの動物実験モデルの大きな違いは、肝臓への脂肪の蓄積である。クロレトンなどの生体異物の投与は脂肪肝と慢性的な肝障害を引き起こす (Oda et al., 1987)。近年大きな問題となっている NASH の発症メカニズムとして第一段階として肝臓への脂肪の蓄積、第二段階として酸化ストレスやサイトカインによって炎症が引き起こされる two hit theory が提唱されている (Day et al., 1998)。FCE は単に肝障害を予防するだけではなく、NASH 発症メカニズムの第一段階である肝細胞への脂肪の蓄積も予防することが明らかとなった。また、FCE の脂質画分および分離タンパク質画分ともに肝臓への脂肪の蓄積を予防する作用があり、FCE には水溶性および脂溶性生物どちらにも活性化合物が含まれている可能性が示唆された。これらの複数の成分が作用することで、FCE の肝障害抑制作用が示されていると考えられた。また FCE は脂肪性肝炎発症メカニズムの第一段階の肝臓への脂肪の蓄積および第二段階である炎症性サイトカインの抑制等の各段階においても抑制的に作用することで脂肪性肝炎を予防する可能性が考えられた。これらのことから、FCE は飲酒や高脂肪食などの生活習慣によって引き起こされる ASH や NAFLD/NASH などの肝障害に対し、予防効果を示す可能性が示唆された。

本論文においては、FCE が有するコレステロール低下作用について 2 つの実験動物モデルを用

いて検討を行った。1つは高コレステロール食によって引き起こされる高コレステロール血症モデルラットである。このモデルは世界中で広く高コレステロール血症モデルとして使用されており、様々な先行研究との比較ができるということと、高 VLDL 血症を引き起こすという利点があるが、一方で、食餌由来の過剰な外因性コレステロールはコレステロールホメオスタシスを崩し、コレステロール合成を阻害しているという問題点もある (Dietschy & Siperstein, 1967)。一方、本研究で用いたもう 1 つの高コレステロール血症モデルは、生体異物によって引き起こされる内因性高コレステロール血症モデルである。クロレトンなどの生体異物は肝臓の HMG-CoA リダクターゼ活性を上げてコレステロール合成を促進することで高コレステロール血症を誘発することが報告されている (Kato et al., 1980; Nagaoka, et al., 1986)。

まず、高コレステロール食によって誘導される外因性高コレステロール血症モデルにおいて、FCE は強いコレステロール低下作用を示した。また、その作用メカニズムとして、肝臓におけるコレステロールから胆汁酸への異化代謝を促進すること、糞中への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄を促進することが考えられた。従来知られている、シジミ中に含まれるコレステロール低下作用を示す化合物として、植物ステロールやタウリン、オルニチンなどが知られている。しかしながら、本研究において用いた FCE に含まれるこれらの成分量は非常に少なく、FCE の強いコレステロール低下作用に十分に寄与しているとは考えられなかった。そのため、FCE のコレステロール低下作用において中心的に作用している生理活性物質の探索を行った。FCE の主要な構成成分であるタンパク質と脂質に着目して、FCE 脂質画分と分離タンパク質画分を調製して、そのコレステロール低下作用について外因性高コレステロール血症モデルを用いて検討した。FCE の脂質画分および分離タンパク質画分どちらにおいても、コレステロール低下作用を示し、特に、脂質画分に強いコレステロール低下作用があった。脂質画分および分離タンパク質画分は、どちらもコレステロールの異化代謝および糞中への胆汁酸排泄を促進するものの、タンパク質画分は中性ステロールの排泄には作用せず、脂質画分は中性ステロールの排泄にも作用した。これら 2 つの画分の作用メカニズムは共通する部分もありながらも、異なる部分もあることが明らかとなった。そのため、FCE には脂質画分および分離タンパク質画分の 2 つの画分に異なる生理活性物質が含まれていることが考えられた。さらに、特に強いコレステロール低下作用を示した FCE 脂質画分に含まれる生理活性物質の探索を行うため、FCE をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 9 画分に分画し外因性高コレステロール血症モデルを用いて、どのような化合物がコレステロール低下作用を示しているのか検討した。FCE の脂質画分をさらに分画した 9 画分のうち 2 つの画分にコレステロール低下作用があった。特に強い効果を示した画分にはスフィンゴ脂質が含まれており、その作用メカニズムとしてコレステロール異化代謝を促進していた。FCE 脂質画分のうち、植物ステロールを含む画分のみが糞中への中性ステロール排泄を促進したが、そのコ

コレステロール低下作用は非常に弱いものであった。これらの結果から、FCE のコレステロール低下作用は、FCE 中のスフィンゴ脂質が肝臓においてコレステロールから胆汁酸への異化代謝を強く促進することで引き起こされる可能性が考えられた。

もう1つの高コレステロール血症モデルとして、生体異物によって引き起こされる内因性高コレステロール血症モデルを用いて FCE のコレステロール低下作用について検討を行った。高コレステロール食をラットに投与する外因性高コレステロール血症モデルは高 VLDL 血症を引き起こすという利点があるが、外因性コレステロールによってコレステロールホメオスタシスを崩し、コレステロール合成が完全に阻害されているという問題点もある (Dietschy & Siperstein, 1967)。ヒトにおいては、一般的に、食事由来の外因性コレステロールは体内の約 2 割であり、残りの 8 割は肝臓で合成される内因性コレステロールである。そのため、臨床的には、肝臓で合成される内因性コレステロールの影響について検討することも重要である。生体異物は肝臓でのコレステロール合成を促進することで高コレステロール血症を引き起こすことが知られている。クロレトンによって引き起こされる内因性高コレステロール血症モデルに FCE がどのような影響を及ぼすのか検討を行った。クロレトン投与ラットにおいても、FCE は強いコレステロール低下作用を示した。またその作用メカニズムも、肝臓におけるコレステロールから胆汁酸への異化代謝を促進すること、糞中への胆汁酸および中性ステロールの排泄促進であった。一方で、FCE は HMG-CoA レダクターゼ遺伝子には影響せず、肝臓におけるコレステロール合成には影響しないことも明らかとなった。さらに、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分が内因性高コレステロール血症モデルにおいても、外因性高コレステロール血症モデルと同様にコレステロール低下作用を示すのかを検討した。内因性高コレステロール血症モデルにおいても、FCE 脂質画分および分離タンパク質画分はコレステロール低下作用を示し、その作用メカニズムとしては、FCE 脂質画分および分離タンパク質ともに、肝臓におけるコレステロールから胆汁酸への異化代謝および糞中への胆汁酸排泄を促進し、一方で中性ステロール排泄については FCE 脂質画分は促進するものの、FCE 分離タンパク質画分は影響しなかった。

外因性および内因性高コレステロール血症と発症メカニズムが異なる 2 つモデルを用いて FCE のコレステロール低下作用を検討した結果、FCE はどちらの高コレステロール血症モデルにおいても、肝臓におけるコレステロール異化代謝を促進することで、強いコレステロール低下作用を示すことが明らかとなった。そのため、どちらのモデルにおいても脂質画分に含まれるスフィンゴ脂質が中心的な作用を示しているものと考えられた。

本論文においては、FCE 中のコレステロール低下作用を示す化合物を単離・同定するには至らなかったが、FCE 分離タンパク質画分および、脂質画分の複数の化合物が FCE のコレステロール低下作用に関与していることを明らかにした。さらに FCE 脂質画分のスフィンゴ脂質を含む

画分に強いコレステロール低下作用があることを明らかにし、その画分の作用メカニズムと、従来知られているスフィンゴ脂質のコレステロール低下作用のメカニズムとは一致しない部分もあり (Duivenvoorden et al., 2006)、新規化合物の可能性も考えられた。Duivenvoorden ら (2006) の研究においてスフィンゴ脂質はコレステロール低下作用を示すものの、肝臓における HMG-CoA リダクターゼ mRNA の発現を誘導している。Duivenvoorden ら (2006) の研究においては、スフィンゴ脂質のコレステロール低下作用は腸管でのコレステロール吸収の阻害であり、コレステロールホメオスタシスによって肝臓でのコレステロール合成が高まった可能性が示唆されている。FCE のコレステロール低下作用は、コレステロールから胆汁酸への異化代謝を促進することによると考えられ、コレステロールホメオスタシスを考えると、コレステロール合成が促進される可能性も考えられる。しかしながら、クロレトン投与ラットにおいて、FCE は HMG-CoA リダクターゼ mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。そのため、FCE に含まれるコレステロール低下作用を示す化合物は、コレステロール合成には影響せず、コレステロールの異化代謝を強く促進することでコレステロール低下作用を示している可能性が示唆された。コレステロール低下薬として広く用いられているスタチンは、コレステロール合成を阻害することでコレステロール低下作用を示す。FCE は、スタチンとは異なるメカニズムでコレステロール低下作用を示していた。スタチンは世界中で広く用いられているが効果を示さない、または副作用があるなどの理由によりスタチンを使用できない場合があり、代替となる治療薬が望まれている。最近では 2016 年に日本においても proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) 阻害薬が高コレステロール血症治療薬として認められたが、日本人における PCSK9 阻害薬単独での有効性と安全性が確立していないという理由でスタチンとの併用が求められている。FCE に含まれるスフィンゴ脂質などの生理活性物質は、スタチンとは作用メカニズムが異なるため、これまでになくコレステロール低下薬への開発の可能性が期待できるものと考えられた。

以上本論文において、古来より生薬として考えられ、且つ、食品として長い食経験のあるシジミ、特に淡水で生息しているタイワンシジミの熱水抽出物である FCE に ASH および NAFLD/NASH などの生活習慣による肝障害を予防する効果や、動脈硬化のリスクファクターの 1 つである高コレステロール血症を予防する効果があることが明らかにすることが出来た。また、コレステロール低下作用を示す化合物はこれまで使用されている治療薬であるスタチンとは異なるメカニズムを有している可能性や、新規化合物が含まれている可能性も示唆された。

本研究において、FCE が生活習慣によって引き起こされる脂質代謝異常や肝機能障害に対する改善効果があることを見出した。さらに、それらの効果を示す成分は FCE 中に複数存在する可能性が示唆された。今後の更なる研究によりいくつかの有用物質が発見された場合、タイワンシジミはすでに養殖方法が確立した生物であり、生物工場としてその有用物質を産生できる可能性

は高いと考えられる。また、本研究においては、FCE の有する有用性について脂質代謝関連の遺伝子発現を中心にメカニズム検討を行った。今後さらに、オミックスなど網羅的解析手法を用いて検討を行うことで、より詳細な FCE 中の有用化合物の作用について明らかにすることが望まれる。これら更なる研究によってタイワンシジミから得られる有用物質を活用して、生活習慣病に対する機能性食品や治療薬の開発につなげ、生活の質が維持された健康寿命の延伸につながることを期待される。

要約

日本人間ドック学会による調査結果である 2015 年「人間ドックの現況」によると、日本における肝機能異常者の頻度は 33.2%であり、3人に1人が肝機能に異常をかかえていることになる。肝機能の低下はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の原因となる。またインスリン抵抗性に加え、遺伝的要素と、食習慣や運動習慣を含む生活習慣によって、肥満、脂質代謝異常、高血圧、耐糖能異常を含む代謝異常によってメタボリックシンドロームとなる。メタボリックシンドロームは、日本において高い死因である心疾患や脳血管疾患を引き起こすことが知られている。特に、脂質代謝異常の1つである高コレステロール血症は、粥状動脈硬化巣の形成および進展に深く関係している。また、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型とされている非アルコール性脂肪肝および非アルコール性脂肪性肝炎も近年増加しており、肝硬変・肝がんへ進展することから問題となっている。本研究では、メタボリックシンドローム、生活習慣病予防に向けて、機能性成分を濃縮する可能性がある水産生物のシジミから機能性成分を見つけ出し、機能性食品や治療薬への応用を検討することを目標とした。

シジミは、日本においては汽水性のヤマトシジミと、淡水性のマシジミ、セタシジミが生息している。台湾においては、淡水性のタイワンシジミ (*Corbicula fluminea*) が生息しており、東アジアにおいてシジミはなじみの深い食材である。中国において 1578 年に刊行された「本草綱目」の中でシジミは、酒毒目黄を解すとあり肝機能に対する有効性が示唆される記載があり、生薬としても長年利用されている。また、日本においても、戦前から肝臓病の食事療法としてシジミ汁が用いられてきた。このようにシジミは昔から機能性成分を含む食材として利用されてきたため、本研究では、特にタイワンシジミの熱水抽出物 (FCE) が有するメタボリックシンドローム、生活習慣病に対する生理活性の検討および、その生理活性物質の探索を行った。

シジミは伝承的に肝機能や二日酔いなどの飲酒に対する効果が言われている。そこで、まずシジミが有する生理活性についてタイワンシジミの熱水抽出物 (FCE) を用いて、ラットにガラクトサミンを腹腔内投与することによって誘導される肝障害に及ぼす影響、またラットにアルコールを経口投与することによって引き起こされる肝臓への脂肪の蓄積およびアルコール代謝に及ぼす影響を検討した。FCE はガラクトサミンによる血清 AST および ALT 値の上昇を有意に抑制した。また、FCE はアルコール摂取による肝臓への脂肪の蓄積に対し抑制傾向を示し、肝臓コレステロール値は対照群に対し有意に低値を示した。さらに、FCE 投与群はアルコール投与後の血中アルコール濃度を低く保ち、血中アルコールの消失速度が速かった。これらの結果から、伝承的に言われているようにシジミにはアルコールや薬物によって引き起こされる肝障害を抑制すること、またその作用メカニズムの1つの可能性としてアルコール代謝促進することによりアルコールに

よって引き起こされる障害を軽減している可能性が示唆された。

「本草綱目」にはシジミの薬理作用として「目黄を解す」とあり、黄疸に対する有用性が示唆されている。黄疸は肝臓からの胆汁の分泌障害によって引き起こされ、胆汁中のコレステロールや胆汁酸、リン脂質が重要な因子である。シジミはコレステロール代謝を改善することで胆汁の分泌を促進する可能性が考えられた。そこで次に、FCE のコレステロール代謝に及ぼす影響を検討した。まず、広く高コレステロール血症モデルとして用いられている高コレステロール食をラットに投与する外因性高コレステロール血症（高 VLDL 血症）モデルを用いて検討を行った。FCE は投与量依存的に血清及び肝臓コレステロールを低下させた。また、FCE 中の生理活性物質を探索するため、FCE の主要な構成成分であるタンパク質と脂質に着目して、FCE から分離タンパク質画分と脂質画分を調製し、コレステロール低下作用を検討した。FCE 脂質画分と分離タンパク質画分のどちらも血清及び肝臓コレステロール低下作用を示した。更に、特に強い活性が見られた脂質画分をカラムクロマトグラフィーによって9つの画分に分画しコレステロール低下作用を検討した。9つの画分のうち、2つの画分に強いコレステロール低下作用が見られ、1つはスフィンゴ脂質を主成分として含む画分であり、もう1つは中性脂肪とステロールエステルを含む画分であった。これら2つの画分は肝臓におけるコレステロール代謝の律速酵素である CYP7A1 遺伝子の発現を誘導した。これらの結果から、FCE にはいくつかのコレステロール低下作用を示す化合物が含まれることが考えられるが、特にスフィンゴ脂質を含む脂質画分がコレステロール異化代謝を促進することで、強いコレステロール低下作用を示すことが示唆された。

外因性高コレステロール血症モデルは高 VLDL 血症を引き起こすため、コレステロール代謝を検討する上で重要な動物モデルである。しかし、このモデルでは肝臓におけるコレステロール合成が抑制され、ヒトの高コレステロール血症の原因とは異なることが知られている。そこで、生体異物であるクロレトン投与によって引き起こされる内因性高コレステロール血症モデルラットを用いて FCE の検討を行った。このモデルにおいても、FCE およびその脂質画分、分離タンパク質画分はコレステロール低下作用を示した。この低下は、FCE およびその脂質画分、分離タンパク質画分によってコレステロール異化代謝が促進されるためであった。このモデルにおいても、外因性高コレステロール血症モデルで見出されたスフィンゴ脂質が関与する可能性が考えられた。また、FCE およびその脂質画分、分離タンパク質画分は、クロレトンによって引き起こされる肝臓への脂肪の蓄積および肝障害を抑制した。FCE にはコレステロール代謝を含む脂質代謝を改善するとともに肝障害も抑制することが明らかとなった。

本研究において、タイワンシジミの熱水抽出物である FCE は、異なる原因による高コレステロール血症を効果的に改善することを明らかにした。アルコール摂取によって引き起こされる脂質代謝異常や肝機能障害に対して改善効果を有することを明らかにした。コレステロール低下作

用は FCE に含まれるスフィンゴ脂質によるものである可能性を見出した。これまで伝承としてシジミが肝機能を改善する効果があるといわれてきたが、今回の研究からその分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。これまで十分に研究されてこなかった、機能性成分を濃縮する能力を持つ水産生物の機能性食品や治療薬としての可能性も示すものである。今後の更なる研究によって、生理活性物質を単離・同定し、詳細なメカニズムを明らかにすることで、メタボリックシンドローム、生活習慣病に対する機能性食品や治療薬の開発への応用が期待される。

引用文献

- Asahina M, Sato M, Imaizumi K. Genetic analysis of diet-induced hypercholesterolemia in exogenously hypercholesterolemic rats. *J Lipid Res.* 2005;46:2289-94.
- Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R, Tovar AR.. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* 2004;134:522-9.
- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79.
- Bucci L, Hickson FJ Jr. J, Pivarnik JM, Wolinsky I, McMahon JC, Turner SD. Ornithine ingestion and growth hormone release in bodybuilders. *Nutr Res.* 1990;10(3):239-45.
- Cantafora A, Mantovani A, Masella R, Mechelli L, Alvaro D. Effect of taurine administration on liver lipids in guinea pig. *Experientia.* 1986 Apr 15;42:407-8.
- Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev.* 2002;23:443-63.
- Childs MT, Dorsett CS, King IB, Ostrander JG, Yamanaka WK. Effect of shellfish consumption on lipoproteins in normolipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 1990;51:1020-7.
- Choi MJ, Kim MJ, Chang KJ. The effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid concentrations and mineral metabolism in rats fed alcohol. *Adv Exp Med Biol.* 2006;583:243-50.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
- Crestani M., Sadeghpour A., Stroup D., Galli G., Chiang JY., Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res.* 1998;39:2192-200.
- Day, C. P., James O. F. W., Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114: 842-5.
- De Schrijver R, Vermeulen D, Daems V. Dose-response relationships between dietary (n-3) fatty acids and plasma and tissue lipids, steroid excretion and urinary malondialdehyde in rats. *J Nutr.* 1992;122:1979-87.
- Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1974;71:77-106.
- Delaney B, Nicolosi RJ, Wilson TA, Carlson T, Frazer S, Zheng GH, Hess R, Ostergren K, Haworth J, Knutson N. β -glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. *J Nutr.* 2003;133:468-75.

- Dietschy JM, Siperstein MD. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J Lipid Res.* 1967;8:97-104.
- Duivenvoorden I, Voshol PJ, Rensen PC, van Duyvenvoorde W, Romijn JA, Emeis JJ, Havekes LM, Nieuwenhuizen WF. Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis in APOE*3Leiden mice. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:312-21.
- Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 1955;11:1-42.
- Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T; JSG-NAFLD. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol.* 2012;47:586-95.
- El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R1387-93.
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo).* 1976;29:1346-1348.
- Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, Thurman RG. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology.* 1998;115:443-51.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006;3:87-98.
- Fadhel Z, Lu Z, Robertson LW, Glauert HP. Effect of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the induction of hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 associated enzyme activities in rats. *Toxicology.* 2002;175:15-25.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: FishStat Plus, <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>
- Fujino Y, Iso H, Tamakoshi A, Inaba Y, Koizumi A, Kubo T, Yoshimura T; Japanese Collaborative Cohort Study Group. A prospective cohort study of shift work and risk of ischemic heart disease in Japanese male workers. *Am J Epidemiol.* 2006;164:128-135.
- Fusetani N. Bioactive marine natural products research. *Fisheries Sci.* 2002;68:1583-1588.

- Glauert HP, Lu Z, Kumar A, Bunaciu RP, Patel S, Tharappel JC, Stemm DN, Lehmler HJ, Lee EY, Robertson LW, Spear BT. Dietary vitamin E does not inhibit the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls in rats. *J Nutr*. 2005;135:283-6.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6:517-26.
- Gopaul NK, Nourooz-Zadeh J, Mallet AI, Anggård EE. Formation of F2-isoprostanes during aortic endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1994;348:297-300.
- Hajar R. Framingham contribution to cardiovascular disease. *Heart Views*, 2016;17:78-81.
- Harnish DC, Malik S, Kilbourne E, Costa R, Karathanasis SK. Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4. *J Biol Chem*. 1996;271:13621-8.
- Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, Tripathi G, Ashour E, Abdalla MS, Sharada HM, Amin AI, Burt AD, Kumar S, Day CP, McTernan PG. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:15.
- Hashimoto K, Sato K, Nakamura Y, Ohtsuki K. Development of continuous type apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in protein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 2006;54:650-5.
- 林 陽. 貝類の脂質. *油化学*, 1971; 20: 726-736.
- Higaki N, Sato K, Suda H, Suzuka T, Komori T, Saeki T, Nakamura Y, Ohtsuki K, Iwami K, Kanamoto R. Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70:2844-52.
- Hitomi Y, Wakayama M, Oda H, Yoshida A. Liver-specific induction of NADPH-generating enzymes by polychlorinated biphenyls in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1993;57:1134-6.
- Horio F, Yoshida A. Effect of some xenobiotics on ascorbic acid metabolism in rats. *J Nutr*. 1982;112:416-25.
- Høstmark AT, Lystad E, Haug A, Eilertsen E. Plasma lipids, lipoproteins, and fecal excretion of neutral sterols and bile acids in rats fed various high fat diets or a low fat/high sucrose diet. *J Nutr*. 1989;119:356-63.
- Hsu CL, Hsu CC, Yen GC. Hepatoprotection by freshwater clam extract against CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Am J Chin Med*. 2010;38:881-94.
- Huang KC, Wu WT, Yang FL, Chiu YH, Peng TC, Hsu BG, Liao KW, Lee RP. Effects of freshwater clam

- extract supplementation on time to exhaustion, muscle damage, pro/anti-inflammatory cytokines, and liver injury in rats after exhaustive exercise. *Molecules*. 2013;18:3825-38.
- Hunold W. Clinical experiences in liver diseases (specially in patients with fatty liver due to alcoholism and food poisoning) under monotherapy with ornithine aspartate. *Z Allgemeinmed*. 1973;49:469-72.
- Ikeda I, Kudo M, Hamada T, Nagao K, Oshiro Y, Kato M, Sugawara T, Yamahira T, Ito H, Tamaru S, Sato M, Imaizumi K, Nagaoka S, Yanagita T. Dietary soy protein isolate and its undigested high molecular fraction upregulate hepatic ATP-binding cassette transporter G5 and ATP-binding cassette transporter G8 mRNA and increase biliary secretion of cholesterol in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009;55:252-6.
- 池嶋 健一、渡辺 純夫, NAFLD の診療・研究の進歩, *日消誌* 2014 ; 111 : 4-13.
- Iritani N, Fukuda E, Inoguchi K. Influences of oyster or clam feeding on lipid metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1979a;25:205-11.
- Iritani N, Fukuda E, Inoguchi K. Effect of feeding the shell fish (*Corbicula japonica*) on lipid metabolism in the rat. *Atherosclerosis*. 1979b;34:41-7.
- Iritani N, Fukuda E, Inoguchi K, Tsubosaka M, Tashiro S. Reduction of lipogenic enzymes by shellfish triglycerides in rat liver. *J Nutr*. 1980;110:1664-70.
- Iritani N, Nagashima K, Fukuda H, Katsurada A, Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr*. 1986;116:190-7.
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr*. 1996;126:380-8.
- Je J, Park J, Jung W, Park P, Kim S. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chem*. 2005;90:809-14.
- Jia X, Ebine N, Demonty I, Wang Y, Beech R, Muise V, Fortin MG, Jones PJ. Hypocholesterolemic effects of plant sterol analogues are independent of ABCG5 and ABCG8 transporter expressions in hamsters. *Br J Nutr*. 2007;98:550-5.
- Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Morimoto M, Hayashida K, Hashimoto N, Kita T. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:955-60.
- Kato N, Tani T, Yoshida A. Effect of dietary level of protein on liver microsomal drug-metabolizing enzymes, urinary ascorbic acid and lipid metabolism in rats fed PCB-containing diets. *J Nutr*. 1980;110:1686-94.
- Kato N, Kawai K, Yoshida A. Effect of dietary level of ascorbic acid on the growth, hepatic lipid

- peroxidation, and serum lipids in guinea pigs fed polychlorinated biphenyls. *J Nutr.* 1981;111:1727-33.
- Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *J Nutr.* 1997;127:1395-400.
- Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA. Taurine: protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. *Amino Acids.* 1998;15:53-76.
- Kimura Y, Ohminami H, Okuda H. Effects of extract of oyster on lipid metabolism in rats. *J Ethnopharmacol.* 1998;59:117-23.
- Komano T, Yokoyama Funakoshi R, Egashira Y, Sanada H. Mechanism of the suppression against D-galactosamine-induced hepatic injury by dietary amino acids in rats. *Amino Acids.* 2009;37:239-47.
- Kong ZL, Yu SC, Dai SA, Tu CC, Pan MH, Liu YC. Polyoxygenated sterols from freshwater clam. *Helv Chim Acta.* 2011;94:892-6.
- 公益社団法人日本人間ドック学会 . 2015 年「人間ドックの現況」
<https://www.ningen-dock.jp/wp/wp-content/uploads/2013/09/2ebf31e708cb165bd2c0b68fae972994.pdf>
- Koyama T, Chounan R, Uemura D, Yamaguchi K, Yazawa K. Hepatoprotective effect of a hot-water extract from the edible thorny oyster *Spondylus varius* on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:729-31.
- Kritchevsky D, Tapper SA, DiTullo NW, Holmes WL. The sterols of seafood. *J Food Sci.* 1967;32:64-6.
- 虚血性心疾患の一次予防ガイドライン（2006年改訂版）
http://j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2006_kitabatake_h.pdf
- Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C- δ . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:E682-91.
- Lara-Guzmán OJ, Gil-Izquierdo Á, Medina S2 Osorio E3 Álvarez-Quintero R, Zuluaga N, Oger C, Galano JM, Durand T, Muñoz-Durango K. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol.* 2018;15:1-11.
- Laurent T, Okuda Y, Chijimatsu T, Umeki M, Kobayashi S, Kataoka Y, Tatsuguchi I, Mochizuki S, Oda H. Freshwater clam extract ameliorates triglyceride and cholesterol metabolism through the expression of genes involved in hepatic lipogenesis and cholesterol degradation in rats. *Evid Based Complement*

Alternat Med. 2013;2013:830684. doi: 10.1155/2013/830684.

Lee RP, Subeq YM, Lee CJ, Hsu BG, Peng TC. Freshwater clam extract decreased hemorrhagic shock-induced liver injury by attenuating TNF- α production. *Biol Res Nurs.* 2012;14:286-93.

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137-40.

李 時珍: 本草項目

Lin CM, Lin YL, Tsai NM, Wu HY, Ho SY, Chen CH, Liu YK, Chiu YH, Ho LP, Lee RP, Liao KW. Inhibitory Effects of Chloroform Extracts Derived from *Corbicula fluminea* on the Release of Pro-inflammatory Cytokines. *J Agric Food Chem.* 2012;60:4076-82.

Lin DS, Connor WE, Phillipson BE. Sterol composition of normal human bile. Effects of feeding shellfish (marine) sterols. *Gastroenterology.* 1984;86:611-7.

Lin YH, Tsai JS, Hung LB, Pan BS. Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and *Gracilaria*. *Food Chem.* 2010;123:395-9.

Lin YH, Tsai JS, Hung LB, Pan BS. Plasma lipid regulatory effect of compounded freshwater clam hydrolysate and *Gracilaria* insoluble dietary fibre. *Food Chem.* 2011;125:397-401.

Liu YC, Hasegawa Y. Reducing effect of feeding powdered scallop shell on the body fat mass of rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:86-92.

Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6:507-15.

Mahawar MM, Jaroli DP. Traditional knowledge on zootherapeutic uses by the Saharia tribe of Rajasthan, India. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2007;3:25

Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Akimoto N. Carotenoids in three species of corbicula clams, *Corbicula japonica*, *Corbicula sandai*, and *Corbicula* sp. (Chinese freshwater corbicula clam). *J Agric Food Chem.* 2005;53:8357-64.

Melzer H, Weber D, Wotzka R. On the therapy of liver diseases with ornithine aspartate. *Med Klin.* 1969;64:1541-4.

Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;49:1877-87.

Mochizuki S, Yoshida A. Effect of strain difference on lipid metabolism in rats after an acute ethanol

- administration. *Agric Biol Chem.* 1991;55:2895-6.
- Morise A, Sérougne C, Gripois D, Blouquit MF, Lutton C, Hermier D. Effects of dietary α -linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *J Nutr Biochem.* 2004;15:51-61.
- Nagaoka S, Masaki H, Aoyama Y, Yoshida A. Effects of excess dietary tyrosine or certain xenobiotics on the cholesterologenesis in rats. *J Nutr.* 1986;116:726-32.
- Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor- α system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci.* 1997;42:2487-94.
- 日本消化器病学会. NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014
- Oda H, Yamashita K, Sasaki S, Horio F, Yoshida A. Long-term effects of dietary polychlorinated biphenyl and high level of vitamin E on ascorbic acid and lipid metabolism in rats. *J Nutr.* 1987;117:1217-23.
- Oda H, Matsushita N, Hirabayashi A, Yoshida A. Hyperlipoproteinemia in rats fed polychlorinated biphenyls. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1990;36:117-22.
- Oda H, Yoshida A. Effect of feeding xenobiotics on serum high density lipoprotein and apolipoprotein A-I in rat. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58:1646-51.
- Oda H, Matsushita N, Hirabayashi A, Yoshida A. Cholesterol-rich very low density lipoproteins and fatty liver in rats fed polychlorinated biphenyls. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58:2152-8.
- Oda H, Nozawa K, Hitomi Y, Kakinuma A. Laminin-rich extracellular matrix maintains high level of hepatocyte nuclear factor 4 in rat hepatocyte culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212:800-5.
- Oda H, Suzuki Y, Shibata T, Yoshida A. Glucocorticoid-dependent induction of HMG-CoA reductase and malic enzyme gene expression by polychlorinated biphenyls in rat hepatocytes. *J Nutr Biochem.* 1999;10:644-53.
- Oda H. Functions of sulfur-containing amino acids in lipid metabolism. *J Nutr.* 2006;136:1666S-1669S.
- 岡上武, 水野雅之. 肝機能検査、肝障害について—健診における問題点— 総合検診 2015;42:307-12.
- Oyamada C, Kaneniwa M, Ebitani K, Murata M, Ishihara K. Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopekten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Mar Biotechnol (NY).* 2008;10:141-50.
- Park T, Oh J, Lee K. Dietary taurine or glycine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a cholesterol-free diet. *Nutr Res.* 1999;19:1777-89.

- Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012;142:1100-1101.e2.
- Peng TC, Subeq YM, Lee CJ, Lee CC, Tsai CJ, Chang FM, Lee RP. Freshwater clam extract ameliorates acute liver injury induced by hemorrhage in rats. *Am J Chin Med*. 2008;36:1121-33.
- Peng YC, Fwu-LinYang, Subeq YM, Tien CC, Lee RP. Freshwater clam extract supplementation improves wound healing by decreasing the tumor necrosis factor α level in blood. *J Sci Food Agric*. 2017;97:1193-1199.
- Plösch T, Kruit JK, Bloks VW, Huijkman NC, Havinga R, Duchateau GS, Lin Y, Kuipers F. Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the ABCG5/8 transporter. *J Nutr*. 2006;136:2135-40.
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:517-54.
- Qiao D, Ke C, Hu B, Luo J, Ye H, Sun Y, Yan X, Zeng X. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydr Polym*. 2009;78:199-204.
- Raicht RF, Cohen BI, Shefer S, Mosbach EH. Sterol balance studies in the rat. Effects of dietary cholesterol and beta-sitosterol on sterol balance and rate-limiting enzymes of sterol metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1975;388:374-84.
- Roy DM, Schneeman BO. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. *J Nutr*. 1981;111:878-85.
- Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996;10:709-20.
- Sheltawy MJ., Losowsky MS. Determination of fecal bile acids by an enzymatic method. *Clin. Chim. Acta*. 1975;64:127-32.
- Sheron N, Lau J, Daniels H, Goka J, Eddleston A, Alexander GJ, Williams R. Increased production of tumour necrosis factor alpha in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 1991;12:241-5.
- Shimizu M, Tanabe S, Morimatsu F, Nagao K, Yanagita T, Kato N, Nishimura T. Consumption of pork-liver protein hydrolysate reduces body fat in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats by suppressing hepatic lipogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70:112-8.
- Sorci-Thomas M, Prack MM, Dashti N, Johnson F, Rudel LL, Williams DL. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1989;30:1397-403.
- Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG. Glycine and

- uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*. 1999;29:737-45.
- Stroup D, Chiang JY. HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res*. 2000;41:1-11.
- Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem*. 1997;43:1512-26.
- Subbiah MT. Dietary plant sterols: current status in human and animal sterol metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1973;26:219-25.
- Sugano M, Kamo F, Ikeda I, Morioka H. Lipid-lowering activity of phytosterols in rats. *Atherosclerosis*. 1976;24:301-9.
- 杉本 和史, 竹井 謙之. アルコール性肝障害と非アルコール性脂肪性肝疾患—その共通点と相違点から見えてくる病態—. *日本消化器病学会雑誌*. 2015;112:1641-50.
- Sugiyama K, Kushima Y, Muramatsu K. Effects of sulfur-containing amino acids and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric Biol Chem*. 1985;49:3455-61.
- Sun L, Zhu B, Li D, Wang L, Dong X, Murata Y, Xing R, Dong Y. Purification and bioactivity of a sulphated polysaccharide conjugate from viscera of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Food Agric Immunol*. 2010;21:15-26.
- Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol*. 2006;169:846-60.
- Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T, Yokoi T. MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4a, modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J Biol Chem*. 2010;285:4415-22.
- 高木 光造, 飯田 優, 村山 花子, 相馬 すが. 貝肉のエキスアミノ酸組成. *北海道大学水産学部研究彙報*. 1970;21:128-32.
- 武内 望, 植田 規史, 片山 善章, 日野 典史, 岩村 淳. 実験的脂肪肝およびその血清脂質に対するシジミ(*Corbicula sandai* Reinhardt)抽出物の効果. *応用薬理*. 1981a;22:527-40.
- 武内 望, 荃田 仁志, 片山 善章, 日野 典史, 植田 規史, 古賀 正史, 中尾 治義, 森本 靖彦, 有末 一隆, 田中 富美子, 林 長蔵, 岩村 淳一. シジミ抽出物中の脂質代謝に対する活性物質について. *動脈硬化*. 1981b;9:471-8.

- Takeya M, Tomokiyo R, Jinnouchi K, Sakaguchi H, Hagiwara S, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K. Macrophage scavenger receptors: Structure, function and tissue distribution. *Acta Histochem Cytochem.* 1999;32:47-51.
- Tanaka K, Aso B, Sugano M. Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. *J Nutr.* 1984;114:26-32.
- Tanaka K, Fukuda M, Ikeda I, Sugano M. Effects of dietary short-necked clam, *Tapes japonica*, on serum and liver cholesterol levels in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1994;40:325-33.
- Tanaka K, Ikeda I, Kase A, Koba K, Nishizono S, Aoyama T, Imaizumi K. Effects of feeding oyster, *Crassostrea gigas*, on serum and liver lipid levels in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2003;49:100-6.
- The Science and Technology Agency of Japan. Standard Tables of Food Composition in Japan, 4th ed. Ministry of Finance Printing Bureau: Tokyo, Japan. 1982.
- Tukey JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics.* 1949;5:99-114.
- Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2001;34:101-8.
- Uchida K, Takase H, Nomura Y, Takeda K, Takeuchi N, Ishikawa Y. Changes in biliary and fecal bile acids in mice after treatments with diosgenin and b-sitosterol. *J Lipid Res.* 1984;25:236-45.
- Uchisawa H, Sato A, Ichita J, Matsue H, Ono T. Influence of low-temperature processing of the brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, on the ornithine content of its extract. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:1228-34.
- Uchisawa H, Naraoka T, Ono T. A novel ornithine-containing tripeptide isolated from the extract of the brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770:790-6.
- Vahouny GV, Connor WE, Roy T, Lin DS, Gallo LL. Lymphatic absorption of shellfish sterols and their effects on cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* 1981 Apr;34:507-13.
- Wakimoto T, Kondo H, Nii H, Kimura K, Egami Y, Oka Y, Yoshida M, Kida E, Ye Y, Akahoshi S, Asakawa T, Matsumura K, Ishida H, Nukaya H, Tsuji K, Kan T, Abe I. Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:17533-7.
- Walsh A, Ito Y, Breslow JL. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J Biol Chem.* 1989;264:6488-94.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and

- structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971;93:2325-2327.
- Wang B, Ishihara M, Egashira Y, Ohta T, Sanada H. Effects of various kinds of dietary amino acids on the hepatotoxic action of D-galactosamine in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999;63:319-22.
- Wang J, Hu J, Cui J, Bai X, Du Y, Miyaguchi Y, Lin B. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 2008;111:302-8.
- Wang Z, Yao T, Song Z. Chronic alcohol consumption disrupted cholesterol homeostasis in rats: down-regulation of low-density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34:471-8.
- Wheeler MD, Ikejema K, Enomoto N, Stacklewitz RF, Seabra V, Zhong Z, Yin M, Schemmer P, Rose ML, Rusyn I, Bradford B, Thurman RG. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56:843-56.
- Wijesekara I, Kim SK. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry. *Mar Drugs.* 2010;8:1080-93.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785-92.
- Wong WW, Smith EO, Stuff JE, Hachey DL, Heird WC, Pownell HJ. Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1385S-1389S.
- Wotzka R, Weber D. Further clinical experiences with ornithine aspartate in liver diseases. *Ther Ggw.* 1972;111:400-12.
- Wu H, Shiau C. Proximate composition, free amino acids and peptides contents in commercial chicken and other meat essences. *J Food Drug Anal.* 2002;10:170-7.
- Xiong ZQ, Wang JF, Hao YY, Wang Y. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. *Mar Drugs.* 2013;11:700-17.
- Xu G, Shneider BL, Shefer S, Nguyen LB, Batta AK, Tint GS, Arrese M, Thevananther S, Ma L, Stengelin S, Kramer W, Greenblatt D, Pcolinsky M, Salen G. Ileal bile acid transport regulates bile acid pool, synthesis, and plasma cholesterol levels differently in cholesterol-fed rats and rabbits. *J Lipid Res.* 2000;41:298-304.
- Yanagita T, Enomoto N, Yamamoto K. Cholesterol-lowering effect of agemaki, a kind of shellfish, in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1991;37:313-8.

- Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Kang KS, Kim HL, Yoon BI, Lee MO, Lee BH. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;223:225-33.
- Yoshida Y, Kimura N, Oda H, Kakinuma A. Insulin suppresses the induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital in adult rat cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:182-8.
- You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J Biol Chem.* 2002;277:29342-7.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199:316-31.
- Zhu B, Zhou D, Li T, Yan S, Yang J, Li D, Dong X, Murata Y. Chemical composition and free radical scavenging activities of a sulphated polysaccharide extracted from abalone gonad (*Haliotis Discus Hannai* Ino). *Food Chem.* 2010;121:712-8.
- Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013;57:601-9.

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始あたたかいご指導を賜りました小田裕昭准教授に心よりお礼申し上げます。また、本論文のみならず、学会発表や論文作成にあたり、幅広い視点からご指導いただきましたこと心より感謝申し上げます。

佐々木食品工業㈱に入社直後から、シジミの生理機能について研究を開始いたしましたが、その直後からご指導を賜りました大分大学 望月聡教授に心よりお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、特にシジミの生理活性物質の探索において、ご指導、ご協力を賜りました長崎大学 山田耕史准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、特に動物実験において、ご指導、ご協力を賜りました別府大学 梅木美樹准教授に心よりお礼申し上げます。

また本論文の研究は、私が勤務している佐々木食品工業㈱の業務の一環として実施したものであり、研究と学位論文作成の機会を与えていただいた佐々木興平代表取締役社長、直属の上司である大野隆之部長に心より感謝申し上げます。

最後となりましたが、本論文の作成をあたたかく見守ってくれた妻と二人の息子に感謝いたします。

平成 30 年 11 月 22 日

千々松 武司