

博士〈健康科学〉論文

しいたけ・エリタデニンの生理機能に関する研究
～主に脂質代謝について～

2019年3月

浅田 憲彦

川崎医療福祉大学大学院
医療技術学研究科
健康科学専攻

博士学位論文目次

第1章 序 論	1頁
1-1. 研究の背景	1頁
1-2. 研究の目的	3頁
1-3. 倫理的配慮	3頁
1-4. 利益相反	4頁
第2章 しいたけ添加食摂食ラットにおける血清中脂質の 経時的な変動と寿命への影響	7頁
2-1. 緒言	8頁
2-2. 対象および方法	8頁
2-3. 結果	9頁
2-4. 考察	10頁
2-5. 結語	11頁
第3章 ラットへの乾しいたけおよび食用油同時投与による 脂質代謝への影響	21頁
3-1. 緒言	22頁
3-2. 対象および方法	23頁
3-3. 結果	25頁
3-4. 考察	26頁
3-5. 結語	28頁
第4章 ラットにおけるエリタデニンの腸管内でのトランスポートの検討	34頁
4-1. 緒言	35頁
4-2. 対象および方法	35頁
4-3. 結果	37頁
4-4. 考察	37頁
4-5. 結語	38頁

第5章 OVX（卵巣摘出）ラットへのエリタデニン静脈内投与による 血清脂質への影響	45頁
5-1. 緒言	46頁
5-2. 対象および方法	46頁
5-3. 結果	48頁
5-4. 考察	49頁
5-5. 結語	50頁
第6章 総括	54頁
謝辞	58頁
投稿論文・学会発表	59頁
参考文献	61頁

第1章 序 論

1-1. 研究の背景

近年、日本人の食生活は大きく変化しており、平成 28 年（2016 年）度の国民健康・栄養調査¹⁾によれば、総エネルギー摂取量の平均値は男女ともに漸減傾向であるにも関わらず、脂肪エネルギー比率が 30 %以上の者の割合は、成人男性で 29.1 %、女性で 38.1 %である。特に 20-29 歳の男性で 41.1 %、女性で 50.4 %と若年層で高くなっており、脂質摂取割合の増加が問題視されている。

同調査では、血清総コレステロールの平均値は、男性で 196.3 mg/dL、女性で 207.6 mg/dL であり、血清総コレステロールが 240 mg/dL 以上の者の割合は、男性 9.8 %、女性 17.3 %と報告されている。平成 18 年（2006 年）から平成 28 年（2016 年）までの 10 年間の年次推移でみると、男女ともに血清総コレステロールの平均値および 240 mg/dL 以上の者の割合は、高止まりで推移している。

また、平成 27 年（2015 年）度の国民健康・栄養調査²⁾では、血清中性脂肪の平均値は男性で 160.7 mg/dL、女性で 123.5 mg/dL であり、血清中性脂肪が 150 mg/dL 以上の者の割合は、男性 42.1 %、女性 24.9 %と報告されている。平成 17 年（2005 年）から平成 27 年（2015 年）までの 10 年間の年次推移でみると、男女ともに血清中性脂肪の平均値は、微増傾向にある。

一方、厚生労働省の患者調査によると平成 20 年（2008 年）度の脂質異常症の総患者数が 143 万 5 千人、平成 23 年（2011 年）度では 188 万 6 千人、平成 26 年（2014 年）度では 206 万 1 千人と推移している³⁻⁵⁾。

脂質異常症は、死因の上位にある心疾患や脳血管疾患である動脈硬化性疾患のリスクファクターの一つである。したがって、脂質異常症改善薬が多く使用されることが考えられるが、医療費増⁶⁾の問題に繋がる懸念される。悪性新生物や脂質異常症のような生活習慣病は、食生活が大きく関与していることから、食生活の改善が求められている。

このような背景を受け、近年、各種きのこに血清脂質の低下や肝障害抑制、抗腫瘍、血圧上昇抑制、血糖上昇抑制など様々な生理活性を認める研究が行われている⁷⁻¹⁴⁾。例えば、しいたけ (*Lentinus edodes*) に含まれるエリタデニン^{7,8)}やニンギョウダケ (*Albatrellus confluens*) に含まれるグリフォン、ネオグリフォン⁹⁾には強い血清コレステロール低下作用があることが知られている。その他、ヒラタケ (*Pleurotus*

ostreatus)¹⁰⁾、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*)¹¹⁾の血清コレステロール低下作用、ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)による肝臓トリグリセリド蓄積抑制作用¹²⁾、カワリハラタケ (*Agaricus blazei Murill*)の β -D-グルカンの抗腫瘍作用¹³⁾、ハタケシメジの血圧上昇抑制作用¹⁴⁾等、様々な生理活性作用があることが報告されている。

エリタデニンは、 $C_9H_{11}N_5O_4$ の分子式で示され (Figure 1)、慣用名には(α R, β R)-6-Amino- α , β -dihydroxy-9H-purine-9-butanoic acid や D-Eritadenine、Lentinacin、Lentysine がある。エリタデニンはしいたけに多く含まれている (乾しいたけ 100 g あたり 50.7-92.7 mg¹⁵⁾) が、しいたけ固有の成分ではなく、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*)にも少量含まれている¹⁵⁾。エリタデニンの血清コレステロール低下作用については、エリタデニンの主な生理作用である S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH)の強力な阻害作用によるものと推測されており¹⁶⁻²⁰⁾、詳細を PE(phosphatidylethanolamine)のメチル化経路および CDP(cytidine diphosphate)コリン経路を用いて説明すると次の通りである (Figure 2)。フォスファチジルコリンは、コリンより CDP-コリンを経て作られる経路とエタノールアミンより合成された PE がメチル化を受けて合成される経路の 2 つがある。エリタデニンは SAHH に対して強い阻害作用を持つことから、SAH (S-adenosyl-L-homocysteine) の濃度が上昇する。さらに、SAHH はメチル化代謝に不可欠な酵素であることから、SAHH 阻害作用をもつエリタデニンは、このメチル化を阻害するため、PE の濃度が上昇する。したがって、PE 濃度の上昇により PC(phosphatidylcholine)/PE 比は下がり、 Δ 6-不飽和化酵素の活性が低下する。さらに Δ 6-不飽和化酵素活性の低下により、リノール酸代謝が抑制され、リン脂質、特に PC 中のリノール酸が増加する。具体的には sn-1 位にパルミチン酸、2 位にリノール酸を持つリン脂質分子種が増加することが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。それらの現象により、リポたんぱく質レセプターの活性上昇やリポたんぱく質コレステロールの肝臓への取り込みが増加し、最終的に血漿コレステロールの低下につながっているのではないかと推測されている。

このような作用をもつエリタデニンを含むしいたけは、わが国では古事記にも記載があるほど昔から食べられており、海外でも注目されている^{21,22)}。そこで、しいたけによる効果をさらに解明する一助となるように、しいたけおよびしいたけに含まれるエリタデニンの未解明な生理作用に着目し研究を行った。

1-2. 研究の目的

ラット等の実験動物へしいたけやエリタデニンを投与した先行研究は3ヶ月程度の投与期間であり、生涯にわたる研究成果はない。そこで第2章では、寿命を全うするまでラットへしいたけを与え続けた場合の血清コレステロールや寿命への影響を確認することを目的に実験を行なった。

第2章でしいたけは血清総コレステロールやリン脂質を有意に低下させるだけではなく、血清中性脂肪も低下させる傾向にあることが示唆されたことから、第3章では、しいたけと同時に摂取する油脂を変える（動物性油脂としてラード、植物性油脂としてコーン油およびMCT含有油を使用する）ことで、総コレステロールや中性脂肪、リン脂質等の血清脂質パラメーターにどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的に実験を行った。

また、エリタデニンのような生理活性物質が作用するためには、基本的には吸収される必要がある。しかし、エリタデニンの消化管での吸収に関しては未解明であることから、第4章では反転小腸法を用いてエリタデニンの腸管における吸収部位や吸収率についての検討を行なった。

さらに、エリタデニンの血清コレステロール低下作用に関する先行研究では、多くの研究が経口的にしいたけやエリタデニンを投与しており、エリタデニンを静脈内へ直接投与した場合の検討はほとんどない。そこで、第5章ではしいたけ投与による効果がしいたけに含まれるエリタデニンそのものの作用であるか否かを確認する目的で、高コレステロール血症モデルや肥満モデルとしても利用されている卵巣摘出モデル（OVX: ovariectomy）ラット²³⁻²⁵⁾を用い、エリタデニンを静脈内に直接投与した場合でも経口投与と同様に血清コレステロールや血清中性脂肪の低下作用が認められるか検討した。

1-3. 倫理的配慮

すべての研究は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal²⁶⁾に則って実施した。

また、第3章および第5章の研究は別府大学動物実験委員会の承認を得て（それぞれ承認番号 第2号および第22号）、第4章の研究は川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て（承認番号 13-007）実施した。

1-4. 利益相反

本研究に関連し、開示すべき COI 関係のある企業等はありません。

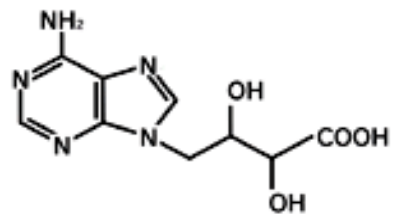


Figure 1 Structure of eritadenine

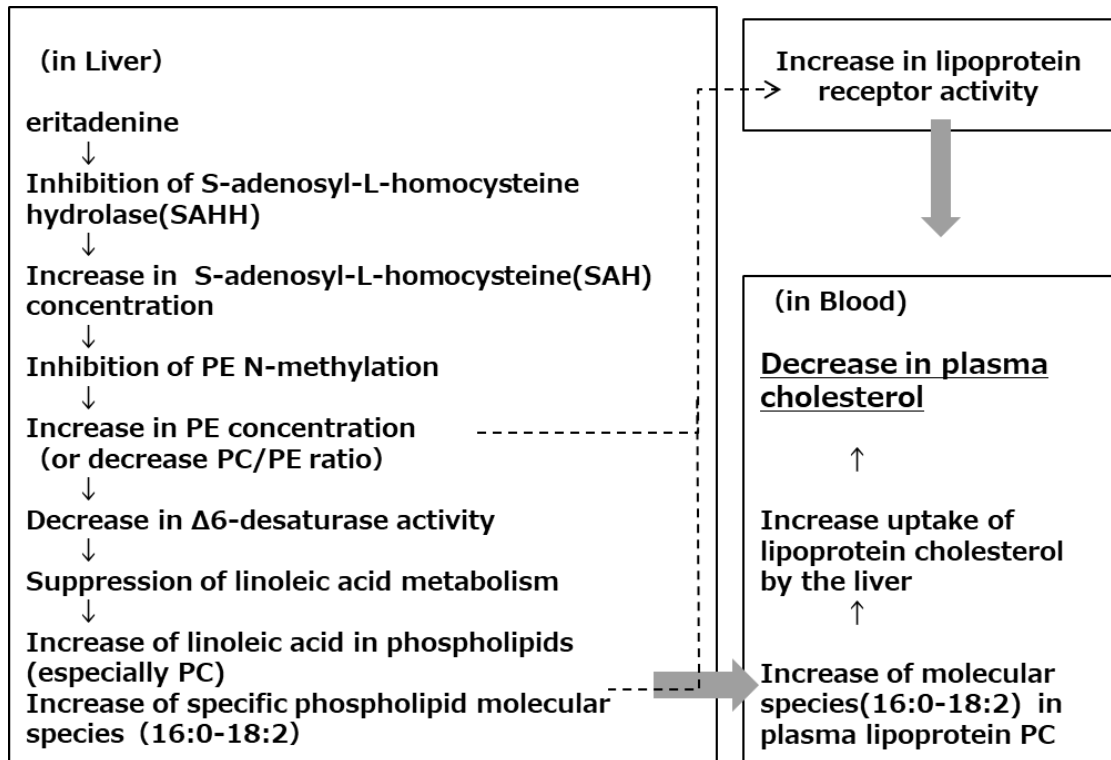


Figure 2 Mechanism of serum cholesterol reduction by eritadenine¹⁷⁻¹⁹⁾

PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, Cho: cholesterol

第 2 章

しいたけ添加食摂食ラットにおける血清中脂質の 経時的な変動と寿命への影響

2-1. 緒言

血清中性脂肪や血清コレステロールの増加は、アテローム動脈硬化症等の危険因子の一つであり、個体の寿命が短くなることが知られている²⁷⁾。Bobek らによる種々のモデル動物やヒトでのきのこ類の血中コレステロール低下作用についての報告がある²⁸⁻³¹⁾。また、しいたけの菌糸がうさぎ動脈において食事誘発性のアテローム性動脈硬化に影響をしていることも報告されている³²⁾。著者は、きのこ類の中でも日本で日常的に食されているきのこであり、ラットで血中コレステロール低下作用を持つことが知られているしいたけ (*Lentinus edodes*) に着目した。しいたけによる血中コレステロール低下作用は、しいたけに含まれるエリタデニンによることが明らかにされている³³⁻³⁵⁾。しかしながら、これらの報告におけるしいたけの投与期間は長い研究で12週間であり、しいたけの血清脂質への効果を長期的に観察したものは見あたらない。

そこで、本研究ではしいたけを含む飼料を自然死するまでラットに与えたときの血清脂質の変動および寿命への影響を明らかにすることを目的に実験を行なった。

2-2. 対象および方法

1) 実験に供した乾しいたけ

しいたけ添加食には、大分県産の乾しいたけ（香信）を80℃の乾燥機で一晩（8時間以上）乾燥させ、ミキサーにより粉碎して用いた。

2) 実験動物と飼料

7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットを購入（日本クレア社）し、1週間市販の固形飼料（MF；オリエンタル酵母社製）で予備飼育した。1週間の予備飼育後、ラットを2つの群に分け、1群にはしいたけ添加食（n=8）を与え、もう1群にはコントロール食（n=10）を与えた。しいたけ添加食は、コントロール食1kgに乾しいたけ18gを添加して作成した。実験食の組成をTable 1に示す。飼料と水は自由に摂取させた。体重測定と死亡の確認は毎日行った。ラットは室温25±2℃、湿度55±5%に保たれた室内で、1ケージに2匹ずつ入れて飼育した。明かりは12時間明暗サイクル（明期7:00-19:00）で維持した。

3) 血清脂質の測定法

採血は実験食投与前（体重 280 ± 5 g、生後 8 週齢）、投与後 4、12、24、36、48、60 および 72 週目に一晩絶食後エーテル麻酔下で尾静脈より行った。血清は測定まで -40 °C で凍結保存した。中性脂肪³⁶⁾、リン脂質³⁷⁾、総コレステロールは酵素法³⁸⁾、HDL 分画と LDL 分画はアガロース電気泳動法³⁹⁾ でそれぞれ測定した。

4) 統計解析

データは平均 \pm SEM で示し、差は Student's t-test により評価した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。survival rate は、Cox-Mantel test によって有意差を評価した。

5) 倫理的配慮

本研究は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal²⁶⁾ に則って実施した。

2-3. 結果

1) 体重

しいたけ添加食群の体重はコントロール食群よりも低い傾向にあったが、有意差はなかった (Figure 3)。

2) 平均生存期間および生存率

平均生存期間はしいたけ添加食群が 92 ± 9.5 週齢であったのに対し、コントロール食群は 85 ± 19.7 週齢であった (Figure 4)。スタート時の個体数がしいたけ添加食群では 94 週齢（実験食開始から 86 週目）で半減したのに対し、コントロール食群では 77 週齢（実験食開始から 69 週目）で半減した。最長寿命はしいたけ添加食群が 110 週齢（実験食開始から 102 週目）であったのに対し、コントロール食群では 120 週齢（実験食開始から 112 週目）であった (Figure 5)。

3) 血清脂質

血清中性脂肪は、コントロール食群では 24 週目まで増加し、その後徐々に減少した

(Figure 6)。しいたけ添加食群でも24週目まで増加し、60、72週目と徐々に減少したが、差は見られなかった。血清リン脂質は、4週目から36週目までしいたけ添加食群でコントロール食群より有意 ($p < 0.001$) に低値であった (Figure 7)。しかしながら、48週目以降では、有意差は見られなかった。血清総コレステロールは、4週目から36週目までしいたけ添加食群でコントロール食群よりも有意に低値を示していた (Figure 8)。また、両群とも48週目までは増加傾向にあった。HDL および LDL 画分では、しいたけ添加食群とコントロール食群の間に有意な差は認められなかった (Figure 9)。

2-4. 考察

しいたけは、コレステロール低下作用を持つ天然の素材である。しかしながら、しいたけを長期的に投与した場合の血清脂質への影響については知られていない。そこで、本研究ではしいたけを含む飼料を自然死するまでラットに与えたときの血清脂質の変動および寿命への影響を検討することを目的に実験を行なった。

しいたけ添加食群の体重はコントロール食群よりも低い傾向にあった。実験の70週目から、しいたけ添加食群、コントロール食群ともに体重が減少しはじめた。コントロール食群の体重が68週目で激減しているのは、67週目に最も重いラット (1320 g) が死亡したためであり、74週目での激増は73週目に最も軽いラット (650 g) が死亡したためである。ラットはすべて自然死であった。

寿命についてみると、しいたけ添加食群では94週齢に半減したのに対し、コントロール食群では77週齢で半減した。しかし、しいたけ添加食群のラットは110週齢で、コントロール食群のラットは120週齢ですべて死亡した。そのために、平均生存期間はしいたけ添加食群が 92 ± 9.5 週、コントロール食群が 85 ± 19.7 週であり、有意差は認められなかった。

しいたけ中のエリタデニンによる血中コレステロール低下作用についていくつかの報告がある³³⁻³⁵⁾。木本らは、しいたけを食べさせると血漿中の総コレステロール、遊離型コレステロールおよびリン脂質を緩やかに減少させ、また、コレステロールと共に摂取すると肝臓の中性脂肪を増加させると報告している⁴⁰⁾。今回の実験では血清中性脂肪は12週目および24週目で、しいたけ添加食群がコントロール食群よりも低値であった。さらにリン脂質では4週目から36週目までしいたけ添加食群がコントロール食群よりも有意に

低値であった。血清中の総コレステロールは、4週目から36週目までしいたけ添加食群がコントロール食群よりも有意に低値であった。しかしながら、48週目以降徐々に差はなくなっていった。

高島らは、しいたけの血中コレステロール低下作用のメカニズムについて組織と血中のコレステロール平衡が組織側に傾いているためであると報告している³⁵⁾。他方、山王丸らはしいたけは血清中や肝臓のコレステロールを減少させ、その減少した分のコレステロールは2次胆汁酸や総胆汁酸として便中に排泄されたと報告している⁴¹⁾。今回の実験では、肝臓中や便中のコレステロール量は測定していない。HDL画分部分は組織と血漿間のコレステロールの輸送や交換に影響を及ぼしているとの報告がある⁴²⁾が、本研究のHDLおよびLDL画分は、両群間に差はなかったことから、しいたけはHDL画分には影響を及ぼさないと考えられる。

さらに血清総コレステロールが高いほど冠状動脈性心疾患による死亡率が高まることが報告されており²⁷⁾、しいたけを摂取することによる36週目までの総コレステロール上昇抑制が早期の死亡の減少に関与している可能性が示唆された。

2-5. 結語

しいたけを含む飼料をラットに自然死するまで与えたときの寿命および血清脂質の変動について明らかにすることを目的に実験を行った。血清中性脂肪はコントロール食群と比較して、しいたけ添加食群で低い傾向にあったが、有意差はなかった。リン脂質は4週目から36週目までしいたけ添加食群がコントロール食群よりも有意に低値であった。総コレステロールも4週目から36週目までしいたけ添加食群がコントロール食群よりも有意に低値であった。平均生存期間は、しいたけ添加食群がコントロール食群よりも長かったものの有意差はなかったが、それぞれの群の個体数が半減するまでの期間は、しいたけ添加食群が94週目であったのに対しコントロール食群では77週目であった。これらのことから、しいたけを摂取することによる36週目までの総コレステロール上昇抑制効果が、早期の死亡の減少と関連している可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、1996年の川崎医療福祉大学研究助成金を受けて実施いたしました。

Table 1 Composition of experimental diet

Ingredient	Control diet	Shiitake diet (%)
Casein ¹⁾	20.00	19.65
DL-Methionine ²⁾	0.30	0.29
Starch ¹⁾	44.60	43.81
Sucrose ¹⁾	23.00	22.59
Mineral Mixture (AIN-76) ¹⁾	4.00	3.93
Vitamin Mixture (AIN-76) ¹⁾	1.00	0.98
Corn oil ¹⁾	5.00	4.91
Cellulose ¹⁾	1.85	1.82
Choline chloride ²⁾	0.25	0.25
Shiitake		1.77
	100.00	100.00

1) Purchased from Oriental Yeast Industries Co.,Ltd (Japan).

2) Purchased from Wako Pure Chemical Industries Co.,Ltd (Japan).

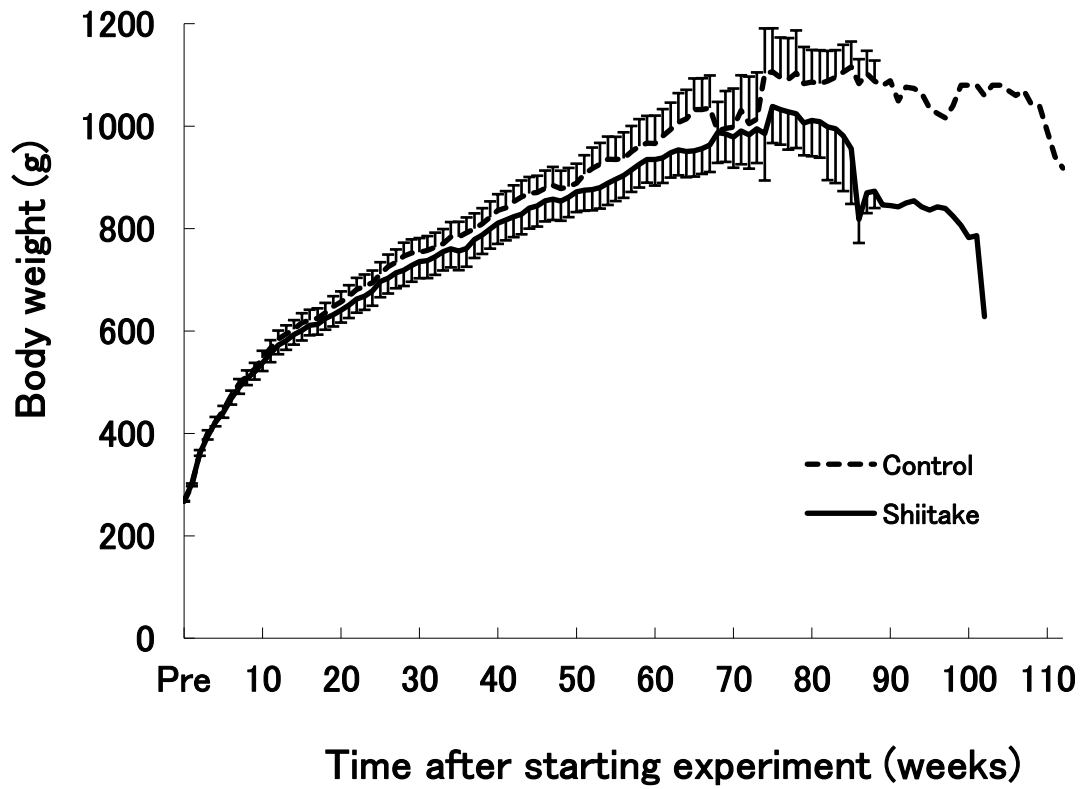


Figure 3 Effect of shiitake diet on body weight of rat

Values are means \pm SEM. Control diet group (n=10), Shiitake diet group (n=8).

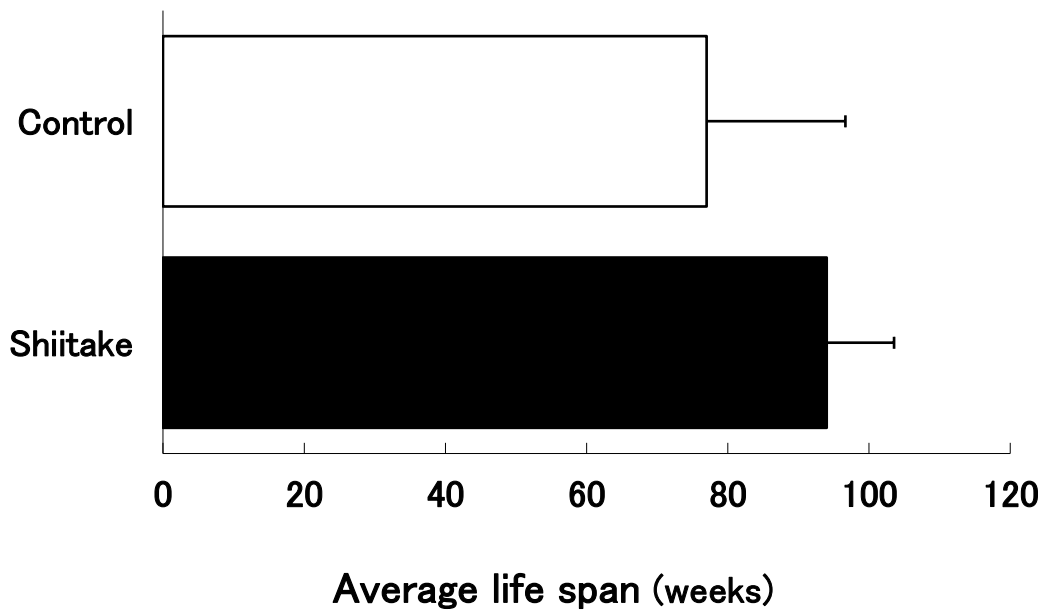


Figure 4 Effect of shiitake on average life span of rat

Values are means \pm SEM. Statistical significance was evaluated by Student's t-test. Control diet group (open column) consisted of 10 animals and shiitake diet group (closed column) consisted of 8 animals.

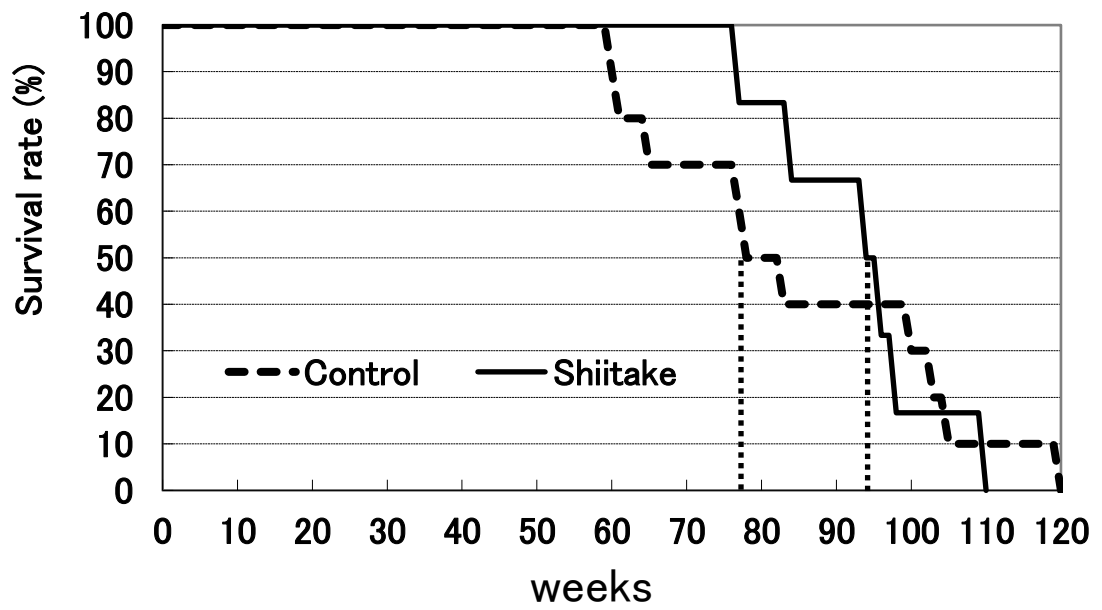


Figure 5 Effect of shiitake diet on survival rate of rats

Control diet group (n=10), Shiitake diet group (n=8). Statistical significance was evaluated by Cox-Mantel test.

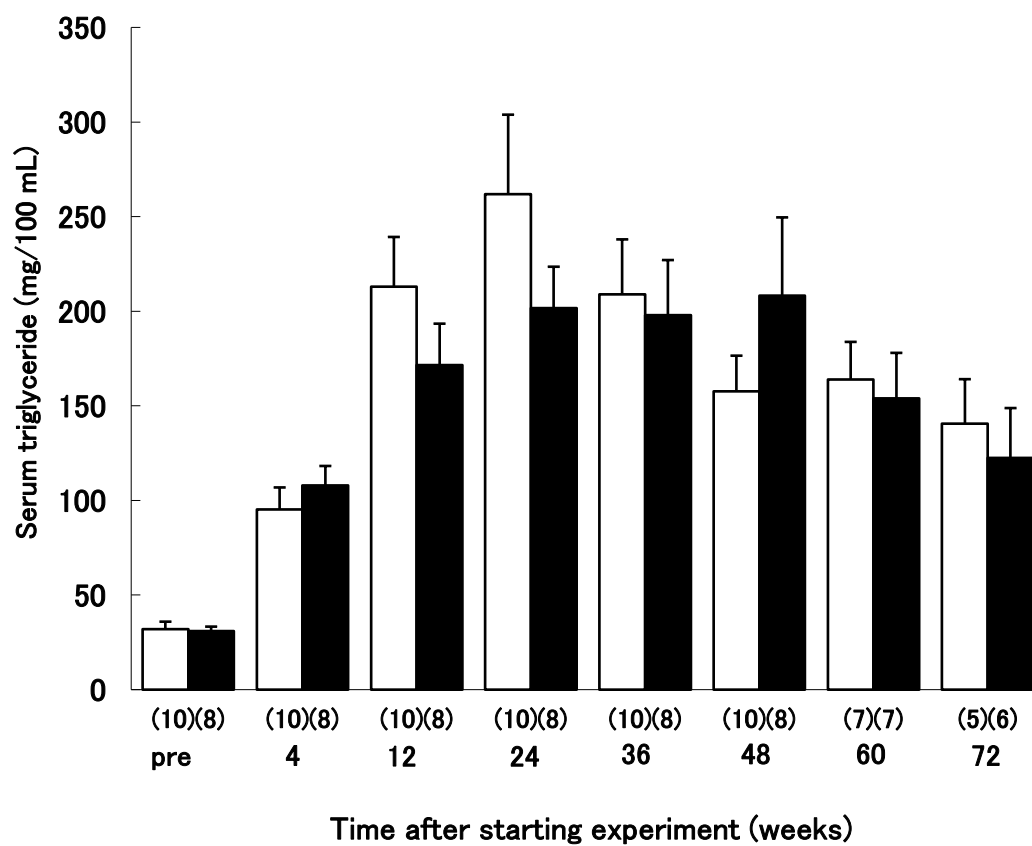


Figure 6 Effect of shiitake diet on concentration of serum triglyceride in rats
 Values are means \pm SEM in both control diet (open columns) and shiitake diet (closed columns). The number of animals used is indicated in parentheses. Statistical significance was evaluated by Student's t-test.

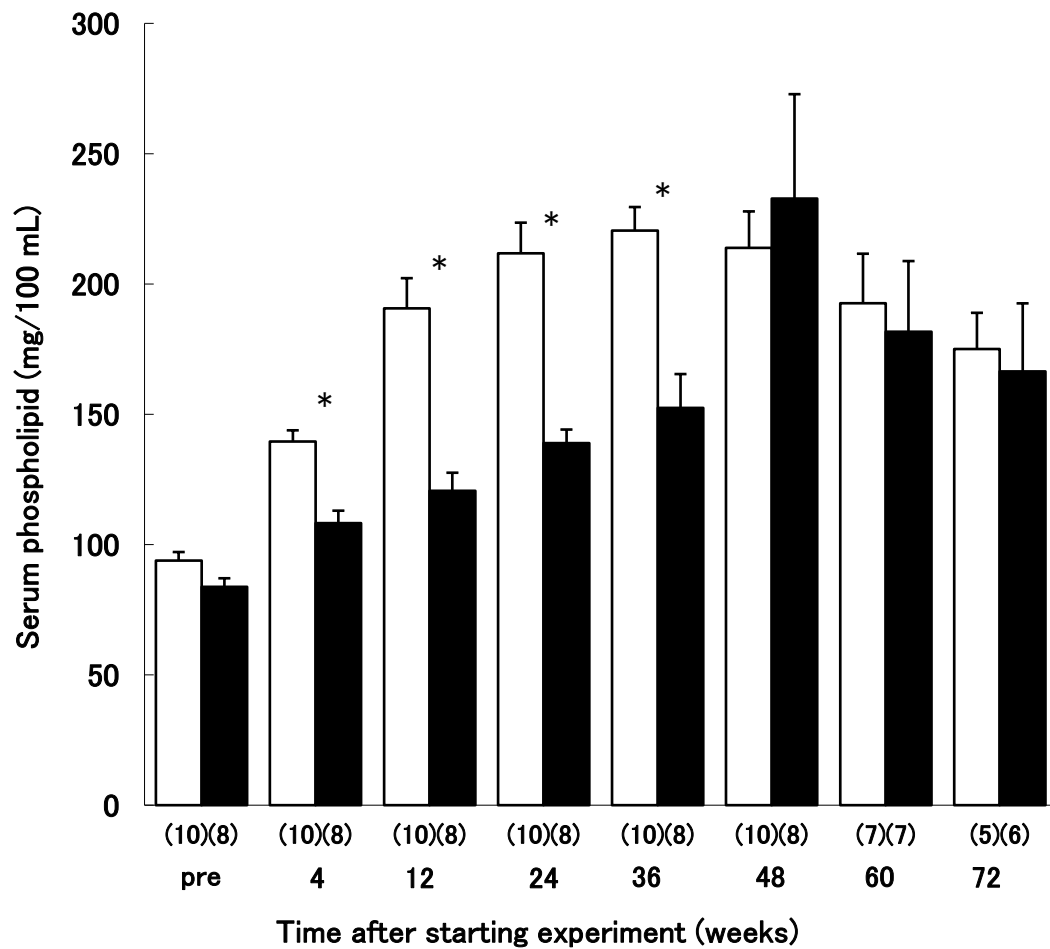


Figure 7 Effect of shiitake diet on concentration of serum phospholipid in rats

Values are means \pm SEM in both control diet (open columns) and shiitake diet (closed columns). The number of animals used is indicated in parentheses.

Statistical significance was evaluated by Student's t-test, * $p < 0.001$.

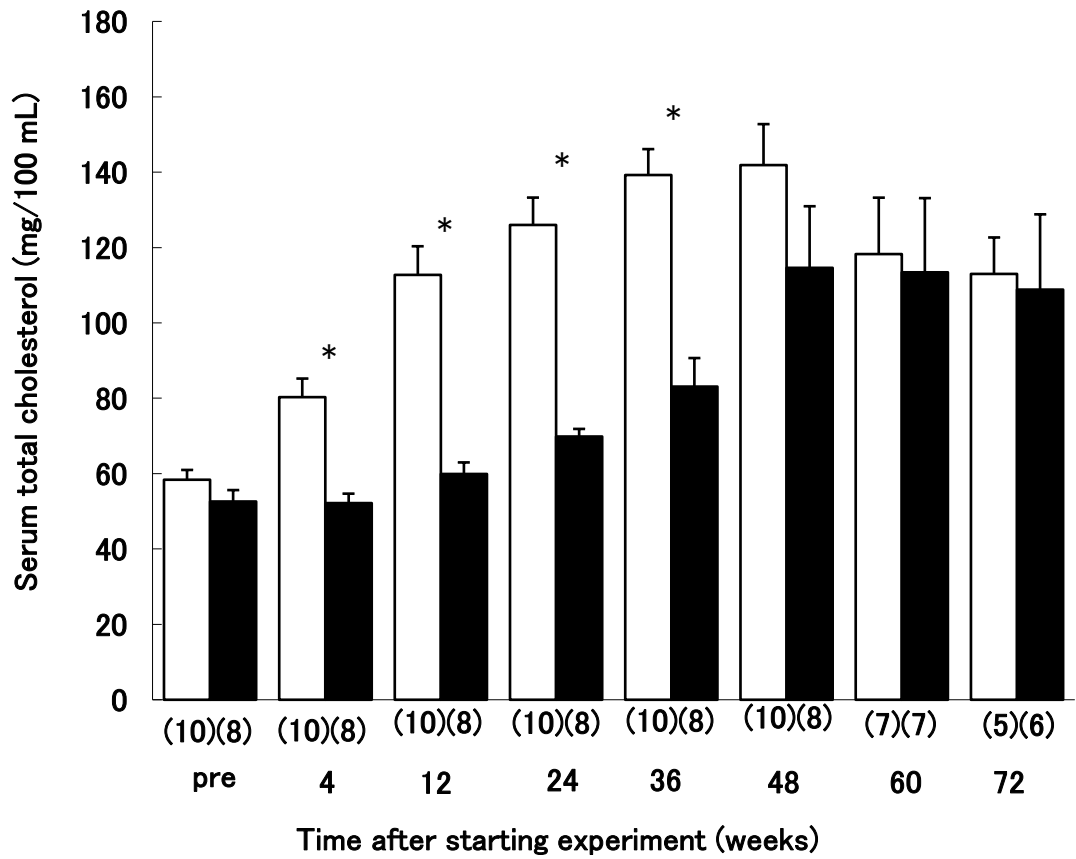


Figure 8 Effect of shiitake diet on concentration of serum total cholesterol in rats

Values are means \pm SEM in both the control diet (open columns) and shiitake diet (closed columns). The number of animals used is indicated in parentheses. Statistical significance was evaluated by Student's t-test, * $p < 0.001$.

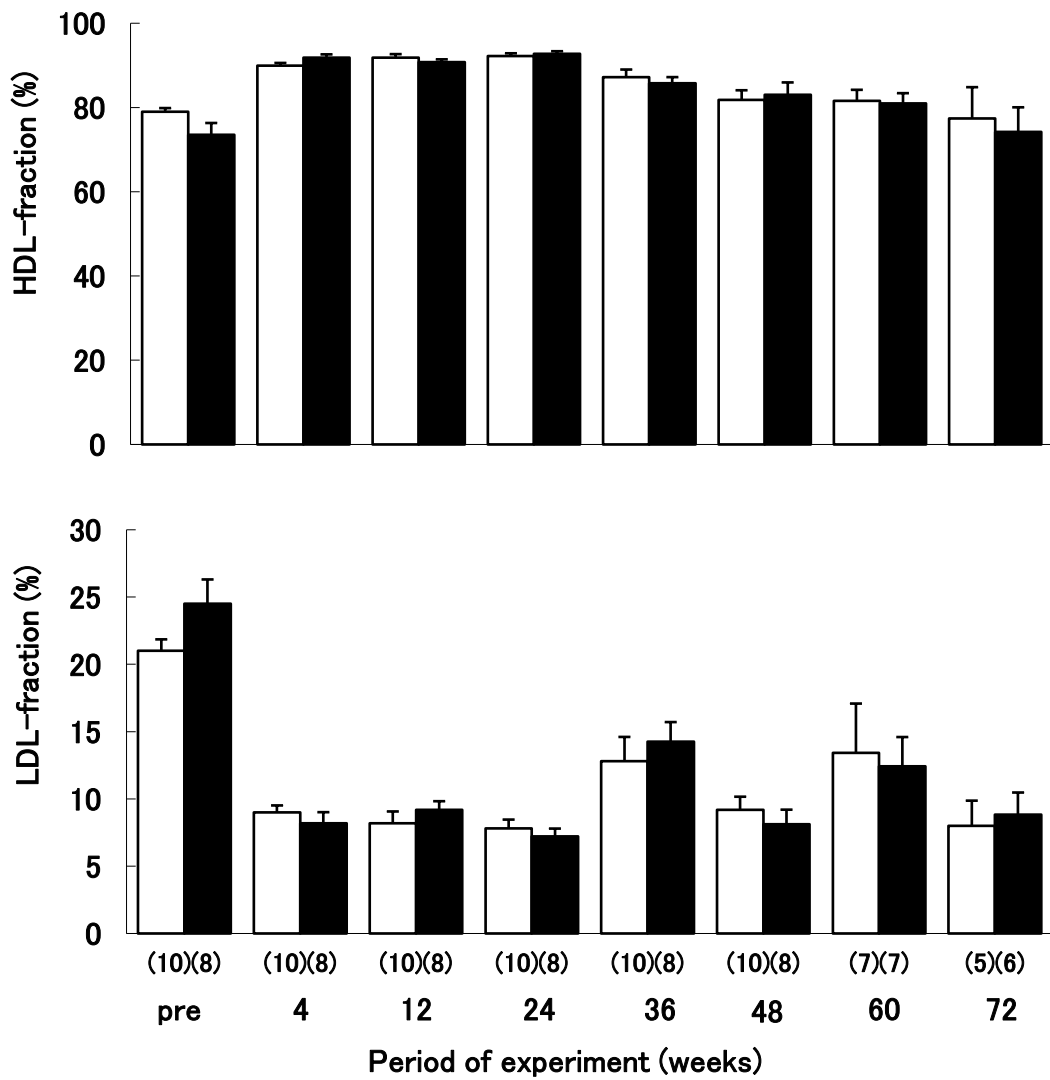


Figure 9 Effect of shiitake diet on the HDL-fraction and LDL-fraction in rats
 Values are means \pm SEM in both the control diet (open columns) and shiitake diet (closed columns). The number of animals used is indicated in parentheses. Statistical significance was evaluated by Student's t-test.

第 3 章

ラットへの乾しいたけおよび食用油同時投与による 脂質代謝への影響

3-1. 緒言

近年、様々なきのこがもつ特異的な生理機能についての研究が数多く報告されている。例えば、しいたけから抽出されるエリタデニンの血中コレステロール低下作用³²⁻³⁵⁾、SHR (Spontaneously Hypertensive Rat : 高血圧自然発症ラット)におけるマイタケ (*Grifola frondosa*) による血圧上昇抑制作用⁴³⁻⁴⁵⁾、霊芝 (*Ganoderma Lucidum*) から抽出されるガノデランの脂質代謝改善作用や血糖上昇抑制作用⁴⁶⁻⁴⁸⁾などが知られている。

また、肥満は世界規模の健康問題の一つであり、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化など様々な病気を引き起こす。それゆえにしいたけから抽出されるエリタデニンの血清コレステロール低下作用は意義深い。エリタデニンはメチオニン代謝に関与してコレステロールを下げる事が報告されている¹⁶⁻²⁰⁾。ラットでのエリタデニンの効果は顕著であり、飼料中に 8 $\mu\text{mol/kg}$ のエリタデニンを添加するだけで明確な血漿コレステロールの低下作用が見られる⁴⁹⁾。エリタデニン添加によるコレステロール低下作用は、用量依存的に下がるとの報告がある¹⁶⁾。また、エリタデニンを飼料に 50 mg/kg 添加した場合、2-3 日後には明確な血漿コレステロールの低下が見られ、その効果は比較的速やかであるとの報告もある⁵⁰⁾。脂肪酸代謝との関連では、エリタデニン添加食 (50 mg/kg) 投与ラットではリノール酸が増加しアラキドン酸は逆に減少することが知られている。これは、肝臓小胞体中存在する $\Delta 6$ -不飽和化酵素の活性低下によりリノール酸代謝が抑制されたためであるとされている¹⁹⁾。エリタデニンのコレステロール低下作用メカニズムは、血漿リポたんぱく質コレステロールの組織による取り込み増加であると考えられている³⁵⁾。エリタデニンは、血漿リポたんぱく質のリン脂質の分子種組成に影響を及ぼして肝臓等の組織に取り込まれやすい性質のリポたんぱく質に変化させるので^{51,52)}、このことが血漿コレステロールの低下に関わっている可能性が示唆されている^{17,18)}。しかしながら、エリタデニンと同時に摂取させる油脂の違いによって血中コレステロールや中性脂肪へどのような影響を及ぼすのかについて検討した研究報告は見あたらない。

一方で、通常の食事に含まれる脂肪の大部分は、長鎖脂肪酸トリアシルグリセロール (LCT) であり、中鎖脂肪酸は牛乳やバターなどに少量含まれている。中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール (MCT) の消化は腸管内で胆汁酸とミセルを形成する必要がなく、舌や胃、膵リパーゼによりほとんどが加水分解を受ける。上皮細胞から吸収された中鎖脂肪酸は LCT とは異なり、中性脂肪に再合成されることなく、門脈内へ入り、肝臓へ移行する。肝臓に取り込まれた中鎖脂肪酸は細胞中のミトコンドリア内に取り込まれ、 β 酸化されるこ

とから、中鎖脂肪酸は、大部分が速やかに酸化されてエネルギーに変換される⁵³⁾。このような特徴を持つことから『血中の中性脂肪や体脂肪が気になる方へ』という保健の用途をもつ特定保健用食品として利用されている。

そこで、本研究では動物性油脂としてラード、植物性油脂としてコーン油およびMCT含有油を高濃度を含んだ飼料（20%高脂肪食）を摂取したラットのしいたけ投与による血清脂質への影響について検討することを目的とした。

3-2. 対象および方法

1) 実験に供した乾しいたけ

実験に用いた乾しいたけは、別府市内のしいたけ店にて大分県産の香信を購入し、80℃で12時間乾燥した後に、ミルサーで粉末状にした。

2) 実験動物

5週齢のSprague-Dawley系雄ラット36匹を購入し、市販の固形飼料（オリエンタル酵母工業製、MF）で予備飼育した。1週間の予備飼育の後、ラットを6匹ずつ6群に分け、コントロール食あるいは実験食を4週間投与した。

3) 実験飼料

コントロール食（H0群）の飼料組成（AIN-76がベース）はシュクロース35%、カゼイン20%、コーンオイル20%、コーンスターチ15%、セルロース5%、ミネラルミクスチャー3.5%、ビタミンミクスチャー1%（以上の精製飼料はオリエンタル酵母工業製）、DL-メチオニン0.3%およびコリン酒石酸塩0.2%（Wako純薬製）とした。6種類の実験食のうち3つには、乾しいたけ粉末を実験食へ1.8%の割合で添加した。残りの3つはそれぞれのコントロールとした。異なった種類の油脂（コーン油およびラード：オリエンタル酵母工業製、MCT含有油：日清オイリオ製）を用い、それぞれペアとした。すなわち、2群にはコーン油を20%含む飼料を投与し、そのうち1群にはしいたけを含む調製食（H0S群）を、もう1群にはしいたけを含まない調製食（コントロール食：H0群）を投与した。また、他の2群にラードを20%含む飼料を投与し、そのうち1群にはしいたけを含む調製食（HFS群）を、もう1群にはしいたけを含まない調製食（HF群）を投与した。さらに

別の2群にMCTを含有する油を20%含む飼料を投与し、そのうち1群にはしいたけを含む調製食(HMS群)を、もう1群にはしいたけを含まない調製食(HM群)を投与した。実験食の組成をTable 2に示した。なお、実験飼料に用いた油脂の脂肪酸組成はTable 3の通りである。すべての群で飼料および水は自由に摂取させた。

4) 飼育条件

ラットは室温 25 ± 2 °C、湿度 55 ± 5 %に保たれた室内で、1匹ずつプラスチックケージに入れて飼育した。明かりは12時間明暗サイクル(明期7:00-19:00)で維持した。

体重は毎日測定した。摂食量および糞便量は、実験に供する2-3日前に測定した。

採血は実験開始後4週目に一晚絶食とし、イソフルラン(Pfizer)麻酔下で下大静脈より行った。血液は3,000回転で10分間遠心分離し、血清を得た。血清は測定まで -80 度で凍結保存した。肝臓、腎臓、副腎、脾臓、胃および内臓脂肪(腸間膜、後腹膜、精巣上部)は、摘出後すばやく生理食塩水で洗浄し重量を測定した。

5) 糞便および肝臓の粗脂肪量定量分析法

ラットの糞は乾燥後、粉末状にした。糞および肝臓はジエチルエーテルにてソックスレー抽出⁵⁴⁾し、粗脂肪量とした。ソックスレー抽出の手順は次の通りとした。定量びんを 105 °Cで12時間乾燥させた後、デシケーター中で1時間放冷し、重量を測定した。これを恒量化するまで繰り返した。次に試料を精秤し、12時間ジエチルエーテルにて脂肪を抽出してエーテルを除去した。その後、 105 °Cで1時間乾燥させた後、デシケーター中で1時間放冷し、重量を測定した。恒量化するまで 105 °Cで1時間乾燥、デシケーター中で1時間放冷を繰り返した。

6) 血清脂質およびLCAT, AST, ALT活性の測定法

血清中の中性脂肪³⁶⁾、リン脂質³⁷⁾、遊離脂肪酸⁵⁵⁾、総コレステロール、エステル型コレステロールおよび遊離型コレステロールは酵素法³⁸⁾によって測定した。L-CAT活性はジパルミトイルリンチン基質法⁵⁶⁾、AST⁵⁷⁾およびALT⁵⁸⁾はJSCC標準化対応法によって測定した。

7) 統計解析

すべてのデータは、平均±SD で示した。結果の有意差については、二元配置分散分析後、Duncan の多重比較法にて解析した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。分析には、SPSS バージョン 16.0 (SPSS, Tokyo, Japan) を用いた。

8) 倫理的配慮

本研究は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、別府大学動物委員会の承認を得て (承認番号 第2号)、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal²⁶⁾ に則って実施した。

3-3. 結果

1) 体重、摂食量、臓器重量、体脂肪量、糞便量、糞便中の粗脂肪量およびその割合

4週間の実験食投与中、体重はすべての群で緩やかに増加した (Table 4)。HFS 群の体重は HMS 群よりも有意に増加した。しかしながら、摂食量はすべての群で差は見られなかった。また、HFS 群の内臓脂肪量は HOS 群や HMS 群よりも有意に増加した。さらに、HMS 群の内臓脂肪量は HM 群よりも有意に少なかった。また一方で、4週間の実験食投与後の肝臓、腎臓、副腎、脾臓および胃の重量は、すべての群で差は見られなかった。

糞便重量はすべての群間に差は見られなかった。HM 群の便中脂肪割合は、HF 群よりも有意に低値を示した。同様に HMS 群の便中脂肪割合は、HFS 群よりも有意に低値を示した。HM 群の便中粗脂肪量は HF 群よりも有意に低値を示した。

2) 血清脂質濃度と L-CAT 活性

血清中性脂肪、リン脂質、遊離脂肪酸、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロールおよび L-CAT (レシチンコレステロールアシル基転位酵素) 活性を Table 5 に示した。

血清中性脂肪では H0 群は HF 群よりも有意に低値を示し、HM 群よりも低値を示す傾向にあった。HOS 群と HMS 群の血清中性脂肪は、HFS 群よりも有意に低値を示した。さらに HOS 群の血清中性脂肪は H0 群よりも、HMS 群では HM 群よりも有意に低値を示した。リン脂質では、HMS 群が HOS 群や HFS 群よりも有意に低値を示した。さらに HOS 群は H0 群よりも、

HMS 群は HM 群よりも有意に低値を示した。遊離脂肪酸はすべての群間に有意な差は見られなかった。しかし、しいたけを含む飼料を食べた群の方がしいたけを含まない飼料を食べた群よりも低値を示す傾向にあった。血清中の総コレステロールおよびエステル型コレステロールでは、HMS 群が HOS 群および HFS 群よりも有意に低値を示した。さらに HOS 群が HO 群よりも、HFS 群が HF 群よりも、HMS 群が HM 群よりも有意に低値を示した。遊離型コレステロールでは HM 群が HF 群よりも有意に低値を示し、HO 群よりも低値を示す傾向にあった。HMS 群は HOS 群および HFS 群よりも有意に低値を示した。さらに HOS 群は HO 群よりも、HMS 群は HM 群よりも有意に低値を示した。L-CAT 活性では、HM 群が HF 群よりも有意に低値を示し、HO 群よりも低値を示す傾向にあった。HMS 群は HOS 群および HFS 群よりも有意に低値を示した。さらに HOS 群は HO 群よりも、HFS 群は HF 群よりも、HMS 群は HM 群よりも有意に低値を示した。

それぞれの血清項目について各油脂としいたけ含有飼料の検査値/各油脂食の検査値によりしいたけ投与による低下率を求めた (Table 6) ところ、すべての血清項目で MCT 含有油を摂取させた群が最も低下した (中性脂肪 : 51.6 %、リン脂質 : 57.1 %、遊離脂肪酸 : 84.0 %、総コレステロール : 47.4 %、エステル型コレステロール : 46.5 %、遊離型コレステロール : 51.4 %、L-CAT 活性 : 31.3 %)。

3-4. 考察

わが国では脂質摂取量の増加や運動不足に伴い、肥満者が急増し、生活習慣病を引き起こしていることが明らかとなっている。このような生活習慣病者の増加から、日常摂取する食品に含まれる有用な生理活性物質に関する研究が活発に行われている。脂質代謝改善をめざした研究では、茶に含まれるカテキン⁵⁹⁻⁶¹⁾やごまに含まれるセサミン^{62,63)}、とうがらし由来のカプサイシン^{64,65)}などの報告が数多くある。われわれは、古くから日本で食されており、血清コレステロール低下作用物質であるエリタデニンを含むしいたけ (*Lentinus edodes*)に着目した。

本研究において、著者らはラットに異なった 3 種類の油脂 (コーン油、ラードおよび MCT 含有油) を 20 % 含む高脂肪食にしいたけを 1.8 % 添加した飼料を与えた場合の脂質代謝改善作用について検討した。使用した乾しいたけ 100 g 中には、エリタデニンが 56 mg 含まれていたことから、実験食 1 kg あたり 10.08 mg のエリタデニンを添加したことに

なる。

ラットでのエリタデニンの効果は顕著であり、飼料に 8 $\mu\text{mol/kg}$ のエリタデニンを添加するだけで明確な血漿コレステロールの低下作用が見られる⁴⁹⁾。コレステロールは、エリタデニン添加により用量依存的に低下するとの報告がある¹⁶⁾。また、エリタデニンを飼料に 50 mg/kg 添加した場合、2-3 日後には明確な血漿コレステロールの低下が見られ、その効果は比較的速やかであるとの報告もある⁵⁰⁾。本研究では、1.8 % (エリタデニン 10.08 mg/kg) のしいたけ投与量で今回のような結果を得ることができた。

摂食量や便重量に有意な差がなかったにもかかわらず、HMS 群は HFS 群と比べ体重の増加を有意に抑制した。HMS 群は、内臓脂肪も HFS 群より有意に低値を示したことから、体重の増加抑制は内臓脂肪の増加抑制に起因していることが示唆された。さらに HM 群よりも HMS 群は有意に内臓脂肪量を減らしていることからしいたけの作用と使用した油脂の脂肪酸組成の違いによるものと考えられた。また、糞便中脂肪含有率は、HM 群よりも HF 群が、HMS 群よりも HFS 群が有意に高かったことから便中への脂肪排泄割合を増加させるのはラードによる影響が大きいと考えられた。

中性脂肪では HO 群よりも HOS 群が、HM 群よりも HMS 群が有意に低値を示したことや HFS 群よりも HOS 群や HMS 群が有意に低値を示したことからコーン油や MCT 含有油を用いた方がラードを用いた場合よりもしいたけによる中性脂肪の低下が期待できるということが示唆された。

これまでしいたけに含まれるエリタデニンは、メチオニン代謝やリン脂質代謝、リノール酸代謝に関与しつつ、コレステロールを低下させることが報告されており¹⁶⁻²⁰⁾、今回の研究でも血清中の総コレステロールやリン脂質は、コーン油、ラード、MCT 含有油のいずれの油脂を用いた場合もしいたけを添加することにより、有意に低値を示した。特に総コレステロールおよびリン脂質では、HOS 群や HFS 群よりも HMS 群が有意に低値を示したことから、中性脂肪と同様にしいたけと MCT 含有油を同時に摂取することで低下効果が期待できることが示唆された。

しかし、エリタデニンはメチル化経路によるフォスファチジルコリン合成抑制のため、食事中的コリン含有量を高めなければ、脂肪肝になることが示唆されており、今回の研究では 0.2 % のコリンを添加しているが、いずれの油脂を用いた場合でも肝重量は増加する傾向が見られたことから脂肪肝になる可能性は否定できない。

L-CAT は、血漿中のコレステロールのエステル化酵素であり、肝臓で合成され、血漿中

では HDL 上に存在し、L-CAT 欠損で HDL-コレステロールの減少や遊離コレステロールの増加が生じる。今回の研究において、L-CAT はリン脂質や総コレステロールと同様にいずれの油脂を用いた場合でもしいたけを添加した群が有意に低値を示し、HMS 群が HOS 群や HFS 群に比べ有意に低値を示した。L-CAT はリン脂質の脂肪酸を遊離脂肪酸に付与してエステル型コレステロールにすることから、リン脂質が少ないために L-CAT 活性は低下し、エステル型コレステロールが低くなり、それに伴い総コレステロールが低値となったと考えられる。

エリタデニンはリノール酸代謝を抑制し、リン脂質中のリノール酸を増加させ、リポたんぱく質コレステロールの肝臓への取り込みを増加させることにより血中コレステロールを低下させると考えられている¹⁶⁻²⁰⁾。コーン油にはリノール酸が多く含まれていることからラードよりもしいたけ投与による各血清脂質の低下率が高かったと考えられる。

いずれの血清脂質項目においてももっとも低下率が大きかったのは MCT 含有油であった (Table 6)。今回用いた MCT 含有油は、キャノーラ油がベースとなっており、ラードと同様にオレイン酸をもっとも多く含む。今回の実験でこのような結果が得られた理由の 1 つは、中鎖脂肪酸と長鎖脂肪酸の消化、吸収および代謝の違い⁵³⁾によるものと考えられる。本研究により同時に摂取する食用油の違いによって、しいたけによる血清脂質への影響が異なることが示唆された。

3-5. 結語

しいたけと同時に摂取する油脂の種類により血清中性脂肪や血清コレステロールへどのような影響を及ぼすかを検討した。実験には、コーン油、ラードおよび MCT 含有油の 3 種類を用いた。中性脂肪では、コーン油や MCT 含有油を用いた方がラードを用いた場合よりもしいたけによる低下が期待できることが示唆された。血清中の総コレステロールやリン脂質は、コーン油、ラードおよび MCT 含有油のいずれの油脂を用いた場合もしいたけ添加により有意に低値を示し、特にしいたけおよび MCT 含有油との併用で低下率が大きかった。このような結果が得られた理由の 1 つは、中鎖脂肪酸と長鎖脂肪酸の消化、吸収および代謝の違いが考えられる。同時に摂取する食用油の違いによって、しいたけによる血清脂質への影響が異なることが示唆された。

Table 2 Compositions of experimental diets

Ingredients (g/kg)	Group					
	HO	HOS	HF	HFS	HM	HMS
Casein ¹⁾	200	200	200	200	200	200
Sucrose ¹⁾	350	350	350	350	350	350
Cornstarch ¹⁾	150	150	150	150	150	150
Cellulose powder ¹⁾	50	32	50	32	50	32
Corn oil ¹⁾	200	200				
Lard ¹⁾			200	200		
Canola and MCT oil ²⁾					200	200
Salt mixture ¹⁾	35	35	35	35	35	35
Vitamin mixture ¹⁾	10	10	10	10	10	10
DL-methionine ³⁾	3	3	3	3	3	3
Choline bitartrate ³⁾	2	2	2	2	2	2
Shiitake ⁴⁾		18		18		18
Total weight (g)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Protein (%)	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4
Carbohydrates (%)	39.1	38.7	39.1	38.7	39.1	38.7
Fat (%)	43.5	43.8	43.5	43.8	43.5	43.8
Calories (kcal/g)	4.60	4.67	4.60	4.67	4.60	4.67

Abbreviations used: HO, High corn oil group; HF, High lard group; HM, High MCT-containing oil group; HOS, High corn oil and shiitake group; HFS, High lard and shiitake group; HMS, High MCT-containing oil and shiitake group.

1) Purchased from Oriental Yeast Industries Co.,Ltd (Japan).

2) The Nisshin Oillio Group, Ltd.

3) Purchased from Wako Pure Chemical Industries Co.,Ltd (Japan).

4) Purchased from the shiitake store in Beppu city.

Table 3 Fatty acid compositions of lipids used in experimental diets

Fatty acid (%)	Lipids		
	Corn oil ¹⁾	Lard ¹⁾	MCT-containing oil ²⁾
8:0	0.0	0.0	8.1
10:0	0.0	0.1	2.9
12:0	0.0	0.2	0.0
14:0	0.0	1.7	0.0
15:0	0.0	0.1	0.0
16:0	11.3	25.1	3.7
17:0	0.0	0.6	0.0
18:0	2.0	14.4	1.7
20:0	0.4	0.2	0.5
22:0	0.1	0.0	0.3
24:0	0.2	0.0	0.1
14:1	0.0	0.2	0.0
16:1	0.1	2.5	0.2
17:1	0.0	0.4	0.1
18:1	29.8	43.2	56.9
20:1	0.3	0.7	1.0
18:2 n-6	55.0	9.6	16.3
18:3 n-3	0.8	0.5	7.8
20:2 n-6	0.0	0.4	0.0
20:4 n-6	0.0	0.1	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.4
	100.0	100.0	100.0

1) Standards Tables of Food Composition in Japan -2015- (Seventh Revised Edition)⁶⁶⁾

2) Gas chromatographic method

Table 4 Effects of shiitake on initial and final body weights, organ weights, liver lipid levels, food intake, visceral fat mass, fecal weight, and fecal lipid percentages in rats fed diets with different fat origins¹

Experimental groups	HO	HOS	t-test ²	HF	HFS	t-test ²	HM	HMS	t-test ²	fat origins	ANOVA ³	
											shiitake	x shiitake
Initial body weight (g)	264.7 ± 18.6	264.1 ± 19.4	$\rho=0.956$	266.0 ± 29.0	261.2 ± 41.7	$\rho=0.868$	263.3 ± 19.8	262.4 ± 22.1	$\rho=0.940$	$\rho=0.988$	$\rho=0.817$	$\rho=0.980$
Final body weight (g)	448.9 ± 33.6 ^{ab}	446.7 ± 29.8 ^{ab}	$\rho=0.902$	486.7 ± 32.4 ^a	485.4 ± 53.4 ^a	$\rho=0.946$	444.0 ± 32.1 ^{ab}	418.1 ± 42.9 ^b	$\rho=0.226$	$\rho=0.033^s$	$\rho=0.526$	$\rho=0.619$
Liver weight (g)	17.6 ± 1.8	20.3 ± 2.5	$\rho=0.420$	17.6 ± 1.6	21.1 ± 6.7	$\rho=0.513$	18.0 ± 1.7	19.0 ± 1.8	$\rho=0.329$	$\rho=0.894$	$\rho=0.066$	$\rho=0.711$
Liver lipid levels (mg/g)	61.1 ± 7.8	58.6 ± 4.2	$\rho=0.465$	61.5 ± 8.9	58.7 ± 14.4	$\rho=0.534$	60.4 ± 7.5	57.3 ± 5.5	$\rho=0.398$	$\rho=0.207$	$\rho=0.888$	$\rho=0.995$
Mean weight of kidneys (g)	1.63 ± 0.17	1.69 ± 0.13	$\rho=0.474$	1.65 ± 0.17	1.78 ± 0.20	$\rho=0.592$	1.60 ± 0.12	1.70 ± 0.11	$\rho=0.121$	$\rho=0.538$	$\rho=0.321$	$\rho=0.719$
Mean weight of suprarenal bodies (g)	0.032 ± 0.003	0.030 ± 0.003	$\rho=0.288$	0.020 ± 0.000	0.031 ± 0.012	$\rho=0.066$	0.032 ± 0.004	0.037 ± 0.008	$\rho=0.163$	$\rho=0.250$	$\rho=0.220$	$\rho=0.489$
Spleen weight (g)	0.92 ± 0.13	1.04 ± 0.14	$\rho=0.125$	0.94 ± 0.06	0.96 ± 0.16	$\rho=0.784$	1.03 ± 0.13	0.89 ± 0.17	$\rho=0.118$	$\rho=0.913$	$\rho=0.906$	$\rho=0.085$
Stomach weight (g)	1.67 ± 0.16	1.51 ± 0.18	$\rho=0.111$	1.26 ± 0.16	1.43 ± 0.23	$\rho=0.329$	1.59 ± 0.19	1.60 ± 0.16	$\rho=0.907$	$\rho=0.240$	$\rho=0.776$	$\rho=0.128$
Visceral fat mass (g)	39.5 ± 6.7 ^b	36.1 ± 5.1 ^b	$\rho=0.307$	48.9 ± 11.4 ^a	46.4 ± 7.4 ^a	$\rho=0.928$	42.2 ± 3.2 ^a	35.2 ± 6.8 ^b	$\rho=0.030^*$	$\rho=0.006^s$	$\rho=0.140$	$\rho=0.595$
Food intake (g/day)	27.4 ± 2.5	25.0 ± 3.4	$\rho=0.158$	24.9 ± 5.1	23.0 ± 3.2	$\rho=0.552$	25.2 ± 2.7	24.5 ± 1.8	$\rho=0.621$	$\rho=0.228$	$\rho=0.129$	$\rho=0.747$
Fecal weight (g/day)	2.74 ± 0.46	2.55 ± 0.25	$\rho=0.347$	2.71 ± 0.69	2.32 ± 0.42	$\rho=0.680$	2.40 ± 0.60	2.30 ± 0.21	$\rho=0.686$	$\rho=0.234$	$\rho=0.297$	$\rho=0.936$
Fecal lipid percentage (%)	3.31 ± 0.40 ^{ab}	3.16 ± 0.39 ^{ab}	$\rho=0.468$	3.83 ± 0.31 ^a	3.63 ± 0.39 ^a	$\rho=0.289$	3.06 ± 0.50 ^b	2.83 ± 0.51 ^b	$\rho=0.412$	$\rho=0.007^s$	$\rho=0.150$	$\rho=0.916$

¹ Values are means ± SD, n=6. * Within a row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Abbreviations used: HO, high corn oil group; HF, high lard group; HM, high canola and MCT (medium-chain triglyceride) oil group; HOS, high corn oil and shiitake group; HFS, high lard and shiitake group; HMS, high canola and MCT oil and shiitake group.

² Differences between the presence and the absence of shiitake were determined using Student's t-test ($p < 0.05$).

³ Two-way ANOVA: \mathbf{S} , significant influence of fat origins ($p < 0.05$).

Table 5 Effects of shiitake on serum lipid profiles and lecithin-cholesterol acyltransferase (L-CAT), AST, and ALT activities in rats fed diets with different fat origins¹

Experimental groups	HO	HOS	t-test ²	HF	HFS	t-test ²	HM	HMS	t-test ²	fat origins	ANOVA ³	
											shiitake	fat origins x shiitake
Triglycerides (mg/dL)	68.3 ± 26.4 ^b	46.1 ± 18.4 ^b	$\rho=0.094$	141.0 ± 49.8 ^a	174.5 ± 49.1 ^a	$\rho=0.415$	90.9 ± 52.4 ^b	46.9 ± 19.4 ^b	$\rho=0.059$	$\rho<0.001^s$	$\rho=0.403$	$\rho=0.083$
Phospholipids (mg/dL)	168.0 ± 21.8 ^a	107.4 ± 12.4 ^b	$\rho<0.001^*$	164.3 ± 19.6 ^b	123.5 ± 19.1 ^b	$\rho=0.039^*$	154.3 ± 17.3 ^{ab}	88.1 ± 11.5 ^c	$\rho<0.001^*$	$\rho=0.010^s$	$\rho<0.001^{\parallel}$	$\rho=0.280$
Free fatty acids (μ EQ/dL)	732.9 ± 170.4	706.6 ± 146.6	$\rho=0.762$	714.3 ± 144.7	696.3 ± 106.3	$\rho=0.855$	836.1 ± 118.4	702.4 ± 175.5	$\rho=0.121$	$\rho=0.569$	$\rho=0.277$	$\rho=0.572$
Total cholesterol (mg/dL)	100.3 ± 18.5 ^a	59.0 ± 8.5 ^b	$\rho<0.001^*$	96.7 ± 19.0 ^a	63.0 ± 8.0 ^b	$\rho=0.023^*$	87.4 ± 13.8 ^c	41.4 ± 5.1 ^d	$\rho<0.001^*$	$\rho=0.006^s$	$\rho<0.001^{\parallel}$	$\rho=0.587$
Esterified cholesterol (mg/dL)	81.0 ± 14.0 ^a	46.9 ± 5.7 ^b	$\rho<0.001^*$	76.3 ± 16.0 ^a	48.5 ± 4.9 ^b	$\rho=0.020^*$	72.1 ± 10.9 ^c	33.6 ± 3.7 ^d	$\rho<0.001^*$	$\rho=0.014^s$	$\rho<0.001^{\parallel}$	$\rho=0.501$
Free cholesterol (mg/dL)	19.3 ± 4.6 ^a	12.1 ± 2.9 ^b	$\rho=0.004^*$	20.3 ± 3.1 ^a	14.5 ± 3.1 ^b	$\rho=0.005^*$	15.3 ± 3.9 ^b	7.9 ± 1.7 ^c	$\rho=0.002^*$	$\rho=0.001^s$	$\rho<0.001^{\parallel}$	$\rho=0.875$
L-CAT activity (UNIT)	9.5 ± 2.9 ^b	4.5 ± 2.2 ^c	$\rho=0.003^*$	12.7 ± 4.1 ^a	8.3 ± 3.3 ^b	$\rho=0.017^*$	7.7 ± 3.8 ^{bc}	2.4 ± 0.7 ^a	$\rho=0.003^*$	$\rho=0.001^s$	$\rho<0.001^{\parallel}$	$\rho=0.949$
AST activity (U/L)	133.3 ± 40.4	118.3 ± 14.1	$\rho=0.112$	105.7 ± 4.0	124.3 ± 30.4	$\rho=0.765$	124.1 ± 20.3	139.4 ± 29.7	$\rho=0.062$	$\rho=0.423$	$\rho=0.523$	$\rho=0.261$
ALT activity (U/L)	55.1 ± 29.6	63.7 ± 20.9	$\rho=0.066$	43.3 ± 25.7	61.0 ± 23.9	$\rho=0.391$	39.4 ± 16.3	49.9 ± 23.8	$\rho=0.086$	$\rho=0.264$	$\rho=0.156$	$\rho=0.915$

¹ Values are means ± SD, n=6. * Within a row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Abbreviations used: HO, high corn oil group; HF, high lard group; HM, high canola and MCT (medium-chain triglyceride) oil group; HOS, high corn oil and shiitake group; HFS, high lard and shiitake group; HMS, high canola and MCT oil and shiitake group.

² Differences between the presence and the absence of shiitake were determined using Student's t-test ($p < 0.05$).

³ Two-way ANOVA: §, significant influence of fat origins ($p < 0.05$); ¶, significant influence of shiitake supplementation ($p < 0.05$).

Table 6 Decreasing rate of serum lipids by shiitake mushroom

	HOS/HO	HFS/HF	HMS/HM
Triglyceride	67.5 %	123.8 %	51.6 %
Phospholipid	63.9 %	75.2 %	57.1 %
Free fatty acid	96.4 %	97.5 %	84.0 %
Total cholesterol	58.8 %	65.1 %	47.4 %
Esterfied cholesterol	57.9 %	63.6 %	46.6 %
Free cholesterol	62.7 %	71.4 %	51.6 %
L-CAT activity	47.4 %	65.4 %	31.2 %

For each serum lipid values, the decreasing rate was obtained by values of HOS/HO, HFS/HF, or HMS/HM.

第 4 章

ラットにおけるエリタデニンの腸管内でのトランスポートの検討

4-1. 緒言

エリタデニンに関する多くの研究では第2章および第3章のように経口的にしいたけやエリタデニンを投与した場合の影響について検討されている。ところが、序論でも述べた様にエリタデニンの腸管での吸収について検討されている研究は見あらず、小腸のどの部位で吸収されているのか等、エリタデニンの腸管吸収については明らかになっていない。

そこで第4章では、ラットの小腸を用い、小腸の5つの部位（Treitz 靭帯に最も近い部位、盲腸に最も近い部位、Treitz 靭帯と盲腸の中間の部位（中間部とする）、Treitz 靭帯と中間部との中間の部位および中間部と盲腸との中間の部位）について反転小腸法により、エリタデニンの吸収率や吸収部位を検討することを目的に実験を行った。

4-2. 対象および方法

1) エリタデニン

本研究には、Santa Cruz Biotechnology 社製のエリタデニンを用いた。FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography（中高压液体クロマトグラフィー）分析のスタンダードとして、KRPB1 mL にエリタデニン 100 μ g を含む溶液を準備した。

2) エリタデニン濃度の測定

得られたサンプル中のエリタデニン濃度測定は、Enman らの方法⁶⁷⁾を参考に、FPLC を用い、次の分析条件により実施した。FPLC 装置は ÄKTAexplorer10S/100 (General Electric Company)、カラムは μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 (General Electric Company)、溶媒は 0.05 %TFA（トリフルオロ酢酸）を含むアセトニトリル、分析条件は温度 23 °C、吸光度 260 nm、サンプル流量 1 mL/min とした。

分析は、0.05 %TFA（トリフルオロ酢酸）を含む純水と 0.05 %TFA を含むアセトニトリルを最初 98:2 の割合で流し、少しずつ 40:60 の割合に移行させた。40:60 の割合で 10 分以上溶媒を流したら、次に 98:2 の割合に戻してさらに 15 分間流した。なお、分析に使用した溶液類はすべて脱気したものを用いた。

3) 実験動物、食餌および飼育条件

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを 6 匹購入し、市販の固形飼料（オリエンタル酵

母工業製、MF) で1週間予備飼育した。ラットは室温 25 ± 2 °C、湿度 55 ± 5 %に保たれた室内で1匹ずつプラスチックケージに入れて飼育した。明かりは12時間明暗サイクル(明期 7:00-19:00)で維持した。

4) 反転小腸法によるエリタデニンの吸収実験

ラットを8時間絶食させた後、頸動脈切断により脱血死させ、正中切開にて開腹し、Treitz 靱帯より盲腸手前までの全腸を採取した。小腸は生理食塩水で洗浄し、Treitz 靱帯に最も近い部位(切片1とする)、盲腸に最も近い部位(切片5とする)、Treitz 靱帯と盲腸の中間の部位(切片3とする)、Treitz 靱帯と切片3との中間の部位(切片2とする)および切片3と盲腸との中間の部位(切片4とする)の合計5箇所について吸収状況を検討することとした(Figure 10)。それぞれの部位について腸管を4 cmずつ切離し、反転小腸を作製した⁶⁸⁾。反転小腸の内液(漿膜側)としてKRPB:Krebs-Ringerリン酸緩衝液(Table 7)を注射筒にて1 mL注入し、外液(粘膜側)にはエリタデニン濃度 $50 \mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ (n=6)、エリタデニン濃度 $25 \mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ (n=6) およびエリタデニン濃度 $10 \mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ (n=6) をそれぞれ5 mLずつ50 mLのmeyerフラスコに入れた。37 °Cで1時間 O_2 を添加した状況でインキュベーションし、内液中のエリタデニン濃度をFPLC分析により測定した。なお、FPLC分析には、得られたサンプルから遠心分離により上清を得た後、さらに孔径4 mmのコスモナイス(R)フィルター水系(Nacalai)によりろ過したものをを用いた。

5) 統計解析

すべてのデータは、平均 \pm SDで示した。結果の有意差については、一元配置分散分析法を行った後、Tukeyの多重比較法にて解析した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。分析には、SPSSバージョン16.0を用いた(SPSS, Tokyo, Japan)。

6) 倫理的配慮

この研究は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、川崎医療福祉大学動物委員会の承認を得て(承認番号 13-007)、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal²⁶⁾に則って実施した。

4-3. 結果

1) エリタデニンの測定法の検討

エリタデニン濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB の標準サンプルを準備し、測定を行ったところ Figure 11 の様な結果が得られ、吸光度 260 nm にあるピークがエリタデニンであることを確認した。この結果より、反転小腸法により得られた内液中のエリタデニン濃度も同様の方法で分析することとした。

2) エリタデニンの吸収量と吸収率、吸収部位

小腸組織 100 mg あたりのエリタデニンの吸収量 ($\mu\text{g/mL}/100\text{ mg/hr}$) は、切片 1、切片 2、切片 3、切片 4 および切片 5 のいずれの部位においても 10 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:1.57 \pm 0.63 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 2:1.80 \pm 0.66 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 3:1.60 \pm 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 4:2.19 \pm 0.56 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 5:2.96 \pm 0.85 $\mu\text{g/mL}$) よりも 25 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:4.44 \pm 1.79 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 2:4.59 \pm 1.36 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 3:3.49 \pm 0.87 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 4:4.71 \pm 1.92 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 5:7.81 \pm 2.86 $\mu\text{g/mL}$) の方が、25 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB よりも 50 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:8.34 \pm 0.97 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 2:8.54 \pm 1.39 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 3:7.82 \pm 1.71 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 4:7.69 \pm 1.07 $\mu\text{g/mL}$ 、切片 5:10.21 \pm 2.69 $\mu\text{g/mL}$) の方が多かった (Figure 12)。

また、内液中のエリタデニン濃度/外液中のエリタデニン濃度 \times 100 で求めた吸収率 (%) は、10 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:30.7 \pm 12.0 %、切片 2:35.0 \pm 12.2 %、切片 3:31.9 \pm 10.0 %、切片 4:45.5 \pm 10.9 %、切片 5:66.8 \pm 18.3 %)、25 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:34.7 \pm 8.3 %、切片 2:36.7 \pm 9.8 %、切片 3:32.6 \pm 6.5 %、切片 4:31.5 \pm 3.4 %、切片 5:55.5 \pm 9.0 %) および 50 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB (切片 1:31.2 \pm 3.4 %、切片 2:31.4 \pm 2.7 %、切片 3:30.1 \pm 6.5 %、切片 4:28.7 \pm 2.9 %、切片 5:42.8 \pm 11.2 %) であった (Figure 13)。

さらに、吸収率の検討では、エリタデニン濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB、エリタデニン濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB およびエリタデニン濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ ・KRPB いずれにおいても、切片 1-3 では吸収率が 30-35 %であり、切片 4 および 5 ではばらつきが大きかった。

4-4. 考察

小腸でのエリタデニンの吸収部位を推測するため反転小腸法により検討した。吸収実験

に用いる外液のエリタデニン濃度を、50 $\mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ 、25 $\mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ および 10 $\mu\text{g/mL} \cdot \text{KRPB}$ と濃度を変えて検討したところ、用量依存的に吸収されていたことから、エリタデニンの吸収には受動輸送が関与していることが示唆された。吸収率の検討では、切片 1-3 の部位ではエリタデニンの濃度に関わらず 30-35%程度であったが、盲腸に近づくにつれ吸収率は大きいがエリタデニン濃度が薄い方が吸収率は増加する傾向にあった。このことから、高濃度では吸収能が飽和状態であったことが示唆された。

また、エリタデニンは分子内にアデニンを有する (Figure 14) ことから、腸管での吸収が核酸のトランスポーターによるものである可能性も考えられる。小腸上皮細胞には、concentrative nucleoside transporter (CNT) と equilibrative nucleoside transporter (ENT) の 2 種類の核酸トランスポーターファミリーが存在することが報告されている^{69,70)}。核酸塩基トランスポーターである rSNBT1 についても報告⁷¹⁾されているが、プリンヌクレオシドよりもプリン塩基の方が腸管から吸収される量が少ないことが確認されている⁷²⁾。エリタデニンがプリン塩基を有することから、吸収されにくい物質であることも考えられる。

4-5. 結語

ラットの小腸を用い、小腸の 5 つの部位 (Treitz 靭帯に最も近い部位、盲腸に最も近い部位、Treitz 靭帯と盲腸の中間の部位 (中間部とする)、Treitz 靭帯と中間部との中間の部位および中間部と盲腸との中間の部位) について反転小腸法により、エリタデニンの吸収率や吸収部位を検討した。エリタデニンは小腸上部から中央あたりの部位にて、エリタデニンの濃度に関わらず 30-35 %の吸収率で吸収されることが示された。また、用量依存的に吸収されており、受動輸送が関与していることが示唆された。

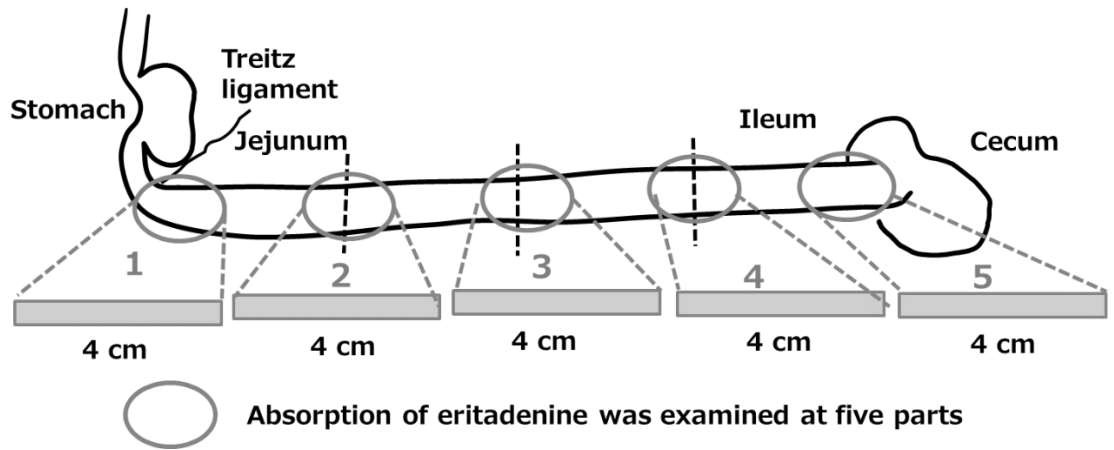


Figure 10 Examination of absorption parts of eritadenine

Table 7 Composition of Krebs Ringer Buffer

0.90 % NaCl(0.154 M)	100 mL
1.15 % KCl(0.154 M)	4 mL
1.22 % CaCl ₂ (0.11 M)	3 mL
2.11 % KH ₂ PO ₄ (0.154 M)	1 mL
3.82 % MgSO ₄ /7H ₂ O(0.154 M)	1 mL
0.1 M Phosphate buffer pH7.4	12 mL

17.8 g Na₂HPO₄·2H₂O + 20 mL 1 M HCl

Add water to make 1 L.

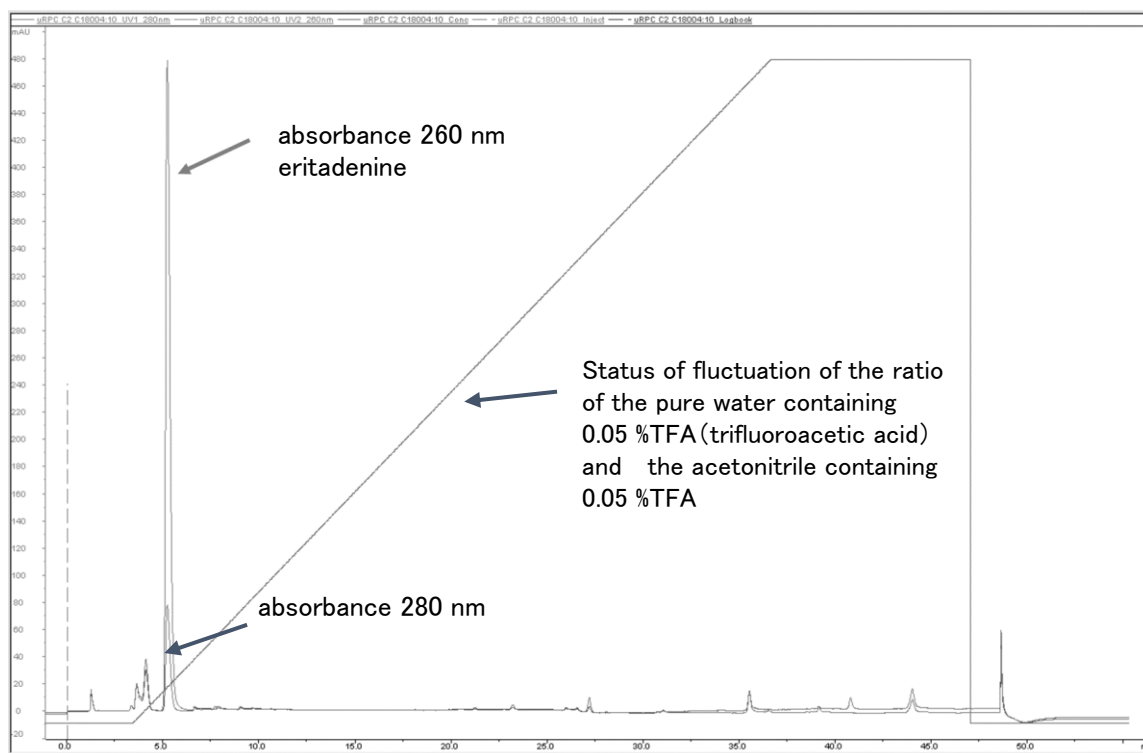


Figure 11 Elution pattern of eritadenine by FPLC

FPLC system : ÄKTAexplorer10S/100 (General Electric Company)

Column : μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 (General Electric Company)

Solvent : acetonitrile containing 0.05 %TFA (trifluoroacetic acid)

<Analytical condition>

Temperature : 23 °C

Absorbance : 260 nm

Sample flow rate : 1 mL / min

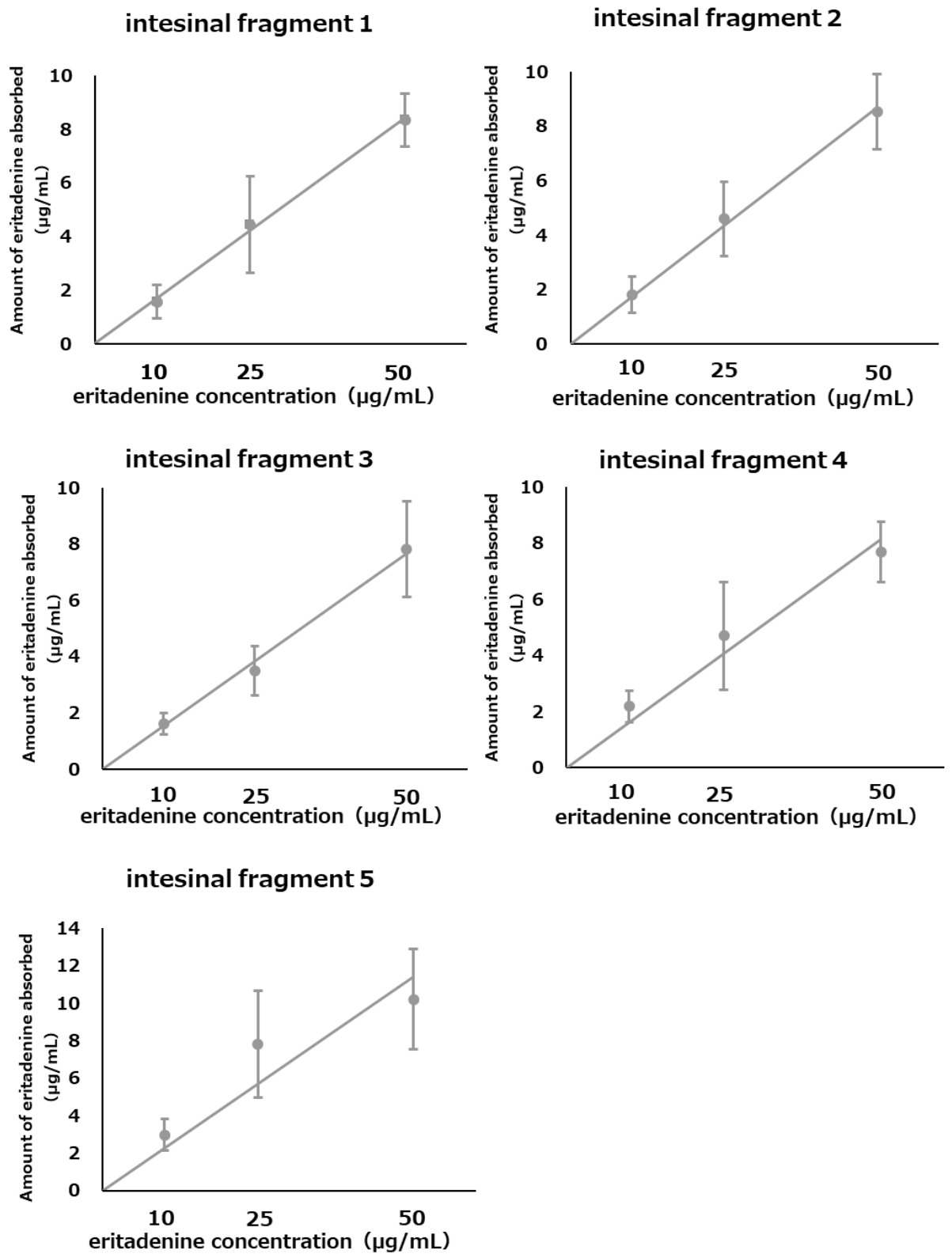


Figure 12 *In vitro* absorption of eritadenine in GI tract

Per 100 mg small intestine tissue. Incubation time is 1 hour.

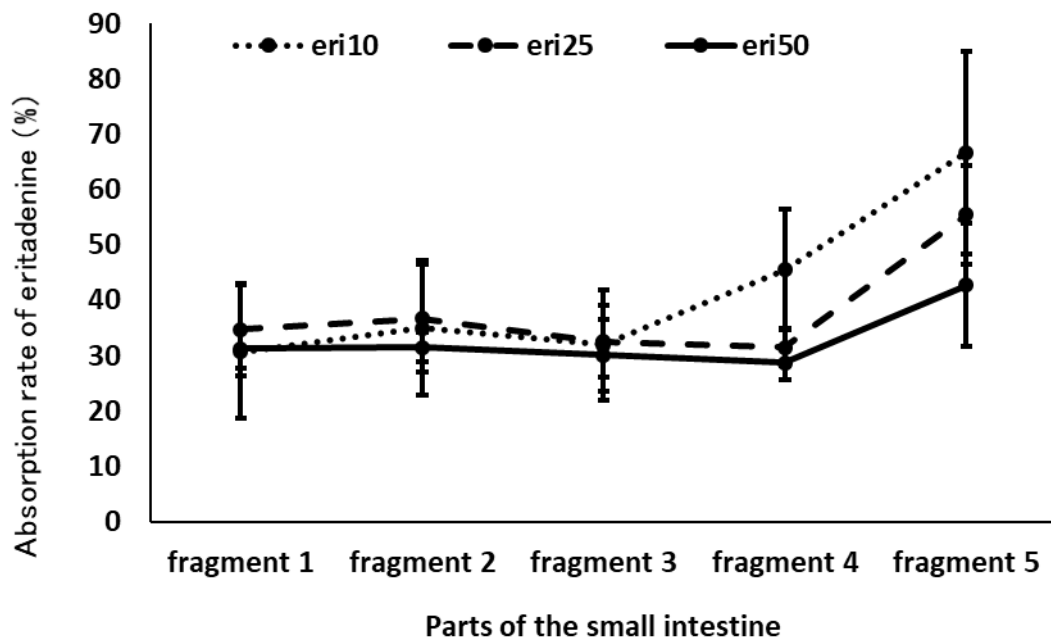
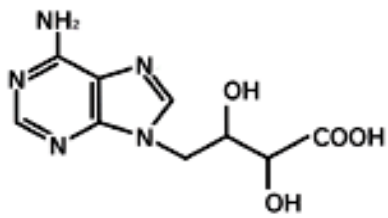
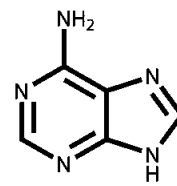


Figure 13 Absorption rate of eritadenine

eri10 : eritadenine concentration 10 μ g/mL, eri25 : eritadenine concentration 25 μ g/mL, eri50 : eritadenine concentration 50 μ g/mL. Incubation time is 1 hour.



eritadenine



adenine

Figure 14 Structures of eritadenine and adenine

第 5 章

OVX（卵巣摘出）ラットへのエリタデニン静脈内投与による 血清脂質への影響

5-1. 緒言

しいたけやエリタデニンの効果を検討する研究の多くが経口的に摂取させており²⁸⁻³⁵⁾、エリタデニンを静脈内へ直接投与した場合の血中脂質への影響に関する研究はほとんどない。高島らの報告では、静脈内投与されたエリタデニンは血液循環から急速に排除され、腎臓を介して排泄されるため効果がなかったとされている³⁴⁾。

そこで、しいたけによる血清コレステロール低下作用がエリタデニンによるものか否かを確認するため、エリタデニンを静脈内へ直接投与して血清コレステロールや中性脂肪の改善効果について検討することとした。

エリタデニンの静脈内投与による効果を検討するにあたっては単回投与ではなく、複数回の連続的な投与が望ましいと考えた。その理由は、50 mg/kg のエリタデニンを含む飼料を2-3日食べさせ、血清コレステロールの低下がみられる⁵⁰⁾との報告があり、単回ではなく複数回の静脈内投与を行えば有効なエリタデニンの血中濃度に至ると推測したからである。また、経口投与されたエリタデニンの力価は、これまで報告されている研究¹⁸⁻²⁰⁾のエリタデニン摂取量より5 mg/kg BW と推測されることから、本研究では0.5 mg/kg BW の割合でエリタデニンを10回投与することとした。さらに、エリタデニンの血清コレステロール低下作用に関する先行研究で用いられる実験動物は健常な雄であり、脂質異常症モデルを対象とした研究が見あたらないため、高コレステロール血症モデルや肥満モデルとしても知られているOVX : ovariectomy (卵巣摘出) ラット²³⁻²⁵⁾を用いた。

5-2. 対象および方法

1) 実験動物および飼料

4週齢のSprague-Dawley系雌性ラット28匹を購入し、市販の固形飼料(オリエンタル酵母工業製、MF)で1週間予備飼育し、7匹ずつ4群に分けた。ラットは室温 25 ± 2 ℃、湿度 55 ± 5 %に保たれた室内において、1匹ずつプラスチックケージで飼育した。明かりは12時間明暗サイクル(明期7:00-19:00)で維持した。体重は毎日測定し、摂食量は術後5週ごとに測定した。すべての群で飼料および水は自由に摂取させた。

2) OVX: ovariectomy (卵巣摘出) 手術およびSham手術

OVX手術およびSham手術は、予備飼育後、5週齢で実施した。ペントバルビタール(ソ

ムノペンチル、共立製薬)を腹腔内投与(5.0 mg/BW 100 g)して全身麻酔を施し、後背部腰椎周辺部を剃毛し70%エタノールにて消毒を行った。皮膚を1カ所切開した後、内部の両腎臓部周辺の筋肉を左右2カ所小さく切開し、それぞれ卵巣を脂肪ごと引き出し、子宮との接合部を絹糸で結紮後、切断して子宮は内部へ戻した。切開した筋層および皮膚は縫合後、70%エタノールで再度消毒を行った。

Sham (Sham-operated rats) 群は、上記と同様に皮膚を切開後、卵巣を摘出することなく縫合を行った。

3) エリタデニンの投与

本研究には、Santa Cruz Biotechnology 社製のエリタデニンを用いた。

OVX (卵巣摘出) 手術を施した2群のうち、1群には術後20週目にエリタデニンを生理食塩水に0.5 mg/mLの濃度で調製した溶液を尾静脈内へ1 mL/kg BW 投与し、もう1群には生理食塩水を投与した。また、Sham 手術を施した2群のうち、1群には同様に術後20週目にエリタデニンを生理食塩水に0.5 mg/mLの濃度で調製した溶液を尾静脈内へ投与し、もう1群には生理食塩水を投与した。いずれも投与の期間は10日間とした。これはエリタデニンを50 mg/kg 含有した飼料を14日間経口的に投与した摂取量の合計が200 gであった⁷³⁾ことから算出し、設定した量である。さらに、本研究の実施前に、エリタデニンを0.2 mg/mL/kg BWの濃度で5日間投与したが、血清脂質には全く影響はなかった。これらの結果に基づいて、本研究ではエリタデニンを0.5 mg/mL/kg BWの用量で設定し、10日間投与することとした。具体的には、8:00-16:00 (明期) 間の8時間の絶食後、イソフルラン麻酔 (ファイザー) 下で尾静脈から血液を採取し、エリタデニン溶液または生理食塩水 (コントロール) の投与を実施した。翌日以降も同様に8:00-16:00 (明期) 間の8時間絶食後、イソフルラン麻酔下でエリタデニン溶液または生理食塩水を毎日1回ずつ、合計10日間投与した。

4) 採血および血清脂質濃度およびLCAT 活性測定

OVX 手術およびSham 手術実施20週間後に採血 (エリタデニン投与前: pre) した。エリタデニンおよび生理食塩水の10回目の投与の翌日、8:00-16:00 (明期) 間の8時間絶食後、イソフルラン麻酔下で尾静脈より血液を採取した。その後、イソフルラン麻酔下でラットを安楽死させた。

得られた血液は 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、血清を得た。血清は測定まで -80°C で凍結保存した。血清中の中性脂肪³⁶⁾、リン脂質³⁷⁾および総コレステロール³⁸⁾は酵素法によって、L-CAT 活性は、ジパルミトイルレシチン基質法⁵⁶⁾によって測定した。

5) 統計解析

すべてのデータは、平均 \pm SD で示した。体重および食物摂取量の結果は、OVX 手術群と Sham 手術群間の有意差について Student's t-test によって分析した。血清脂質の結果は、エリタデニンまたは生理食塩水の投与前後間の有意差について Student's t-test によって分析した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。分析には、SPSS バージョン 16.0 を用いた (SPSS, Tokyo, Japan)。

6) 倫理的配慮

本研究は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、別府大学動物委員会の承認を得て (承認番号 第 22 号)、Guide for the Care and Use of Laboratory Animal²⁶⁾ に則って実施した。

5-3. 結果

1) 体重および摂食量

それぞれのグループの初期体重は、OVX エリタデニン投与群が 176.5 ± 13.6 g、OVX 対照群が 174.9 ± 15.2 g、Sham エリタデニン投与群が 178.7 ± 11.3 g および Sham 対照群が 175.3 ± 14.0 g であった。手術後の体重は、OVX の両群において Sham 両群より増加する傾向にあった (Figure 15)。エリタデニンまたは生理食塩水の投与開始後、体重はすべての群で減少する傾向にあった。エリタデニン投与群と対照群との間に有意差はなかった。

摂食量は術後 5 週目、10 週目で OVX 群が Sham 群と比較して、有意に増加、もしくは増加する傾向にあった (Figure 16)。しかし、すべての群で経時的に摂食量は減少し、術後 24 週目では、4 群間に大きな差はなかった。

2) 血清脂質量および LCAT 活性

中性脂肪は、OVX を施すことにより有意に低下もしくは低下する傾向にあった (Figure

17a)。OVX 群ではエリタデニンを 10 日間静脈内に投与することにより有意に低値を示した。Sham 群では、エリタデニンまたは生理食塩水いずれを 10 日間投与した群も有意に低値を示した。リン脂質は、OVX を施すことにより有意に低下もしくは低下する傾向にあった (Figure 17b)。エリタデニンまたは生理食塩水を 10 日間尾静脈内に投与することにより、OVX 群および Sham 群ともに有意に低値を示した。エリタデニンを投与した群では、有意差 ($p < 0.001$) を示した。総コレステロールは、OVX を施すことにより高値を示す傾向にあった (Figure 17c)。OVX 群および Sham 群ともにエリタデニンを 10 日間静脈内に投与することにより有意に低下した。L-CAT は OVX 群でエリタデニンを 10 日間静脈内に投与することにより有意に低値を示した (Figure 17d)。

5-4. 考察

エリタデニンを静脈内へ投与しても血清脂質への効果はないとの報告がある³⁴⁾。しかし、エリタデニンを静脈内へ連続的に複数回投与することにより血清コレステロール低下に有効なエリタデニンの血中濃度に至るのではないかと考え、尾静脈よりエリタデニンを直接投与し検討することとした。また、実験動物には高コレステロール血症や肥満モデルとしても知られている卵巣摘出 (OVX: ovariectomy) ラットを用いた。

体重は OVX 手術施行直後より OVX 群が Sham 群よりも増加する傾向にあった。卵巣を摘出することによってマウスおよびラットの摂食量が増加することが報告⁷⁴⁾されており、本研究でも有意差はなかったものの OVX 群では摂食量が増加した影響により体重が増加したと考えられた。また、投与 5 日目の体重減少は、エリタデニンまたは生理食塩水を静脈内投与する際のイソフルラン麻酔もしくは尾静脈への穿刺により、摂取量が減少したためと推測している。

本研究では、OVX による血清総コレステロールの上昇はわずかであったが、OVX 群および Sham 群でエリタデニンを 10 日間静脈内へ投与することにより、血清中性脂肪、リン脂質、総コレステロールおよび L-CAT 活性は有意に低下した。エリタデニンまたは生理食塩水投与前の血清中性脂肪が OVX 群よりも Sham 群で有意に高値を示したことについて、原因は明らかではない。

血清中性脂肪および総コレステロールは、エリタデニン投与群で対照群より有意に低かった。これらの結果から、静脈内投与されたエリタデニンの力価は 5 mg/kg BW と推察さ

れ、これまで報告されているラットにおけるエリタデニンを経口投与した場合¹⁸⁻²⁰⁾の摂取量から推測した力価と同様であった。

本研究によりエリタデニンを複数回連続的に静脈内へ投与することで、血中のエリタデニン濃度が維持され、血清中性脂肪、リン脂質、総コレステロールおよびL-CAT活性を低下させるのに有効であることが明らかとなり、しいたけ投与による血中脂質改善効果の一因として、エリタデニンによる作用が関与していることが認められた。

5-5. 結語

しいたけ投与による血中脂質の改善効果がエリタデニンによるものであるか否かを確認するためにエリタデニンを静脈内へ直接投与して検討を行った。実験動物には、卵巢摘出(OVX)ラットを用いた。OVX群およびSham群のいずれも、エリタデニンを静脈内投与することにより血清中性脂肪、リン脂質および総コレステロールは、コントロールよりも有意に低値を示した。これらの結果より、エリタデニンの静脈内投与は連続的複数回行うと有効であることが示唆され、しいたけによる血中脂質改善効果にエリタデニンが関与していることが確認できた。

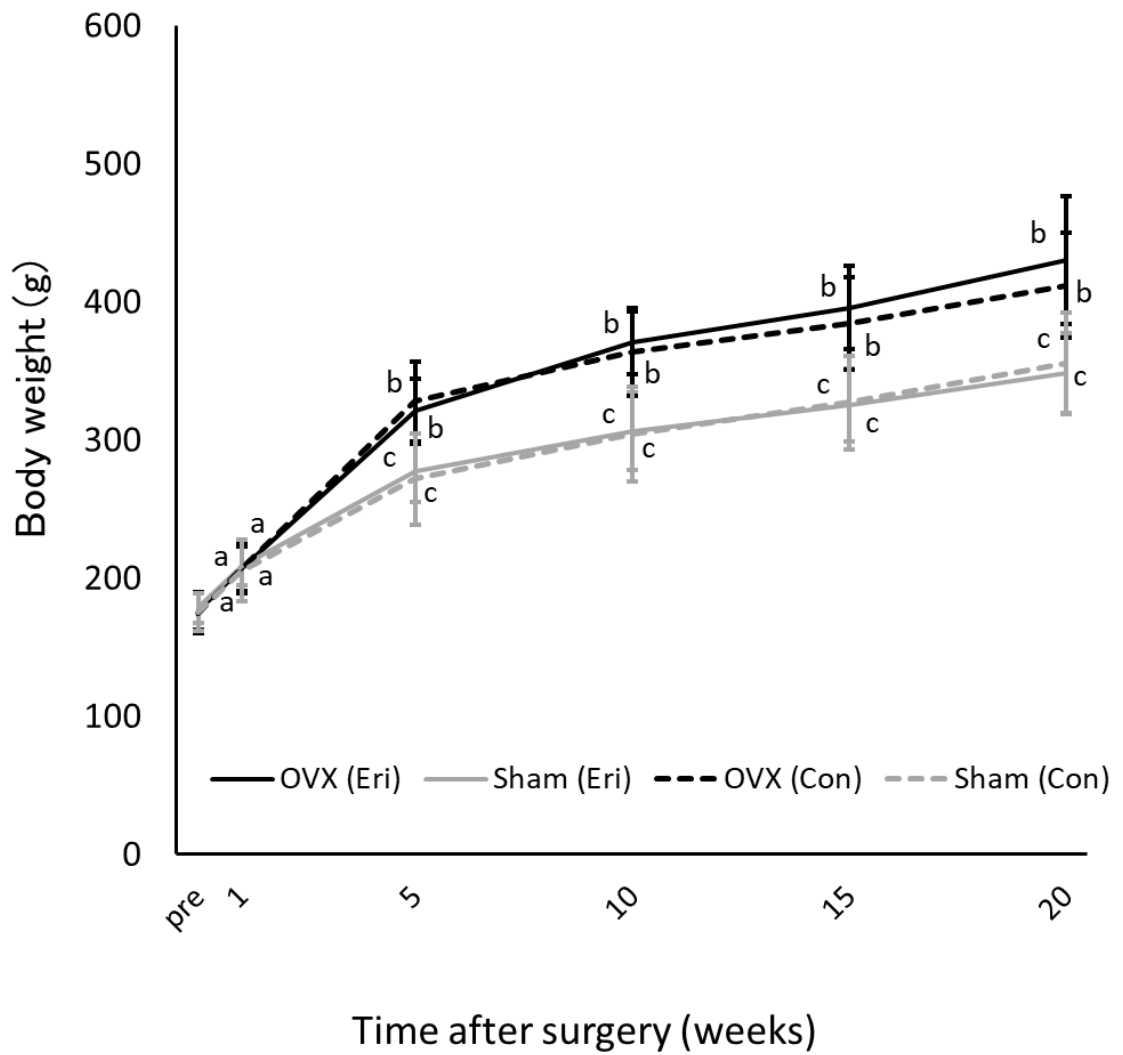


Figure 15 Effects of intravenous injections of eritadenine on body weights in ovariectomized (OVX) rats and sham-operated rats

Eri: intravenous injection of eritadenine, Con: intravenous injection of saline. Values are means \pm SD. Different letters indicate significant differences between the OVX group and the Sham group tested with the Student's t-test between groups ($p < 0.05$).

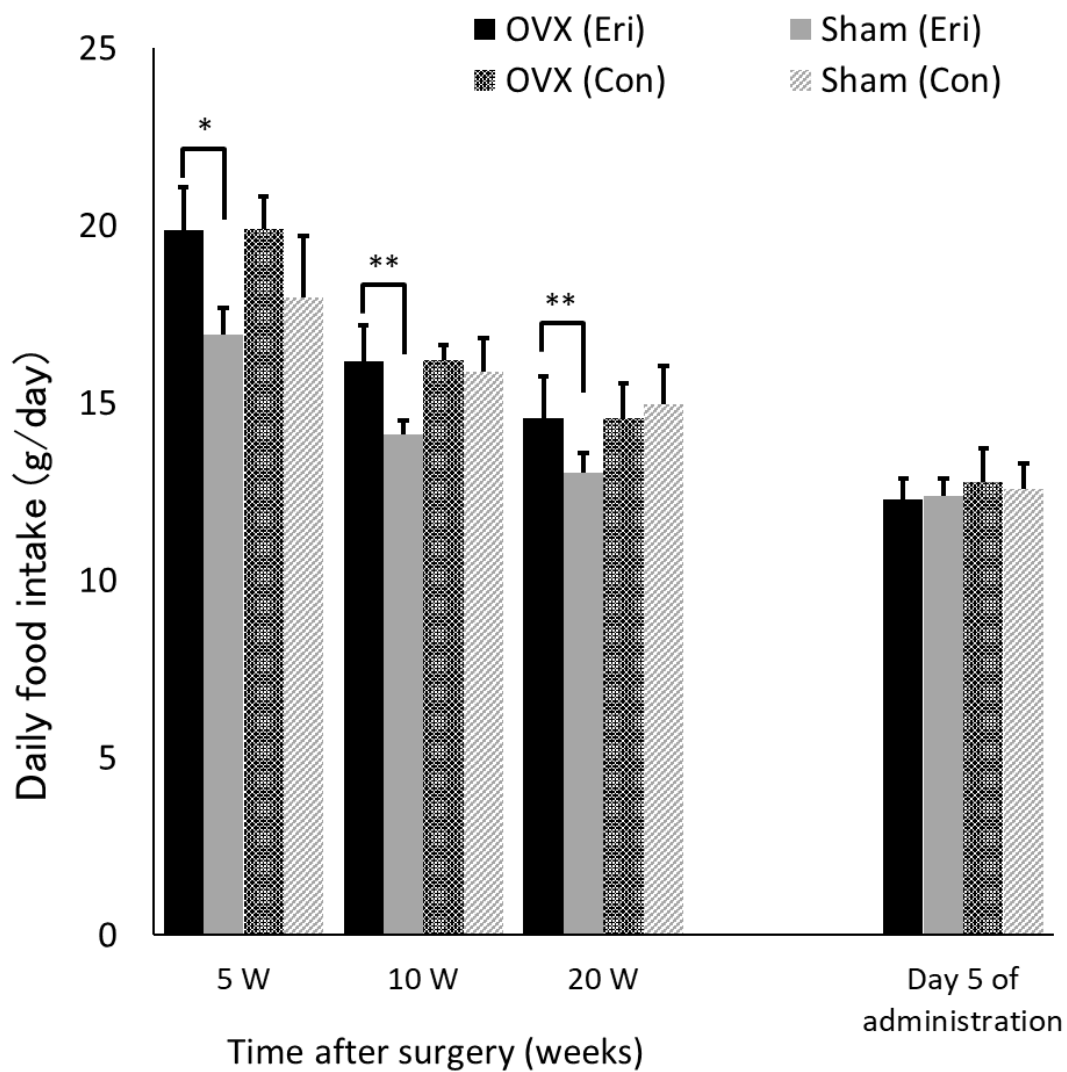


Figure 16 Effects of intravenous injections of eritadenine on daily food intake in ovariectomized (OVX) rats and sham-operated rats

Eri: intravenous injection of eritadenine, Con: intravenous injection of saline. Values are means \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 indicate significant differences between the OVX group and the Sham group tested with the Student's t -test.

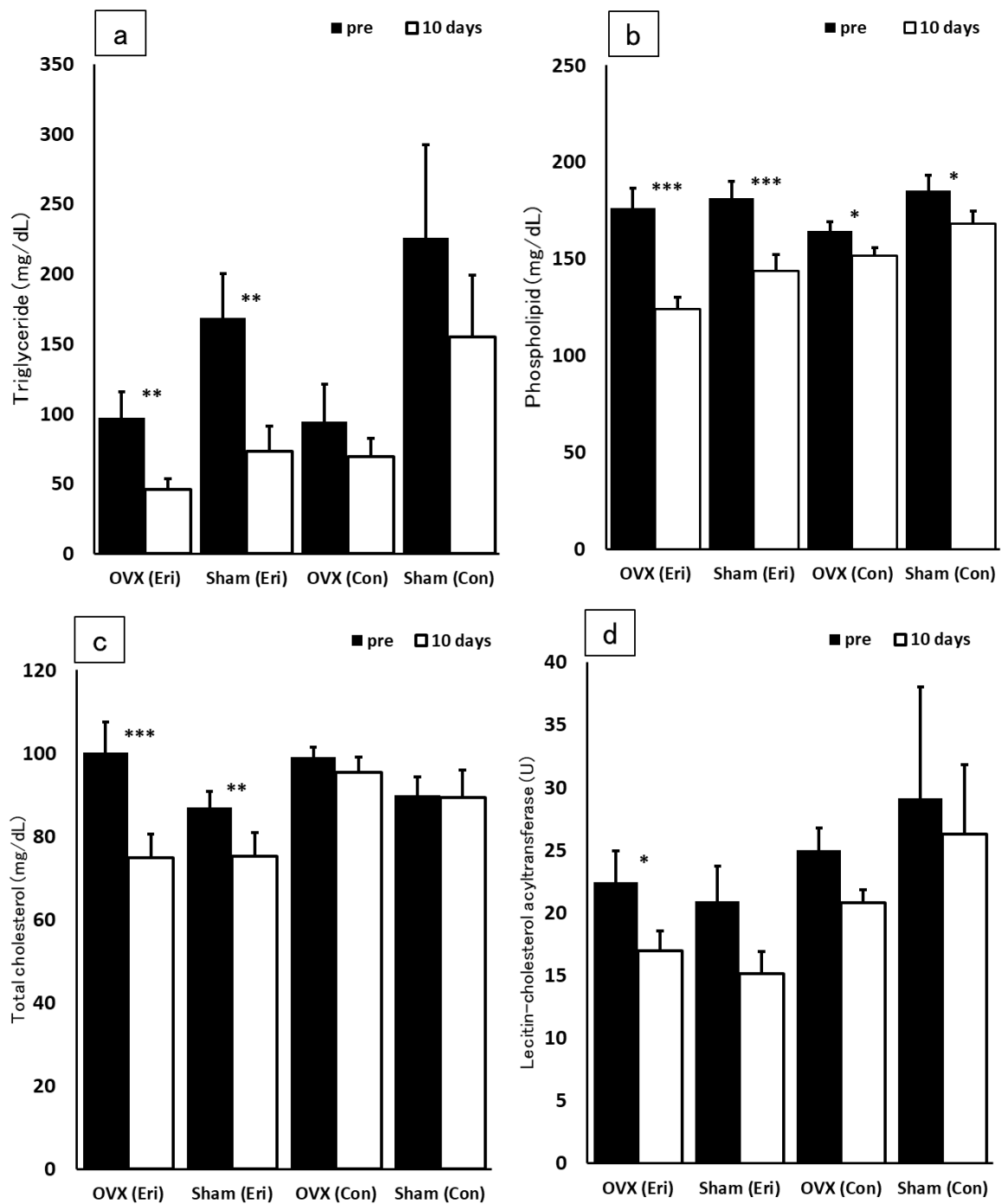


Figure 17 Effects of intravenous injections of eritadenine on serum lipid profiles and lecithin-cholesterol acyltransferase (L-CAT) activities in ovariectomized (OVX) rats and sham-operated rats

Eri: intravenous injection of eritadenine, Con: intravenous injection of saline. Values are means \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 indicate significant differences between pre and the administration of eritadenine or saline tested with the Student's t -test.

第6章 総括

国際連合の人口統計年鑑⁷⁵⁾によると、日本国民の平均寿命は男性で1975年（昭和50年）から、女性で1982年（昭和57年）から最長寿国となっている。2017年（平成29年）のデータ（一部海外は2016年）では、男性の平均寿命（81.09歳）は香港、スイスに次いで3位、女性（87.26歳）は香港に次いで2位となったが、日本が長寿国であることに変わりはない。寿命が伸びた理由として、教育水準の向上、医療の発展、栄養の改善、生活水準の向上や労働条件の改善、感染症罹患率の低下などが挙げられる^{76,77)}。医療の発展と寿命という観点から見ると、厚生労働省より発表された平成29年（2017年）の人口動態調査の結果⁷⁸⁾では、男性の死因で最も多いのは悪性新生物、次いで心疾患、脳血管疾患である。女性は、悪性新生物、心疾患、老衰および脳血管疾患の順である。男女ともに死因の1位である悪性新生物の要因として、喫煙、感染性要因および飲酒であることが報告されている⁷⁹⁾。さらに悪性新生物の中でも死亡率が男性3位、女性1位である大腸がんに限ってみると、肥満、高脂肪食摂取、インスリン抵抗性（高血糖）および高トリグリセリド血症は、全て大腸がんのリスクと正相関することが疫学調査や動物実験より明らかとなっており、メタボリックシンドロームは大腸がんのリスク因子であるとの報告がある^{80,81)}。

近年、日本人の食生活は大きく変化し、総エネルギー摂取量の平均値は男女とも漸減傾向であるにも関わらず、脂肪エネルギー比率が高くなっており脂肪摂取割合の増加が問題視されている¹⁾。また、血清総コレステロールの平均値や値が240 mg/dL以上の者の割合は高止まりで推移しており、血清中性脂肪の平均値は微増傾向にある。さらに、脂質異常症の総患者数は年々増加しているとの報告もある³⁻⁵⁾。脂質異常症は、心疾患や脳血管疾患である動脈硬化性疾患のリスクファクターの1つである。脂質異常症患者への治療として薬物療法が選択されることが多いと考えられるが、医療費増の問題へ繋がる⁶⁾ことが懸念されている。悪性新生物や脂質異常症のような生活習慣病は、おもに食生活に起因することから、食生活の改善が求められている。

このような状況の中、各種きのこに血清脂質の低下や肝障害抑制、抗腫瘍、血圧上昇抑制、血糖上昇抑制など様々な生理活性があることが示されている⁷⁻¹⁴⁾。中でも、しいたけのエリタデニン¹⁵⁾は血清コレステロール低下作用をもつ成分として知られている。そのメカニズムは、エリタデニンの主な生理作用である S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHH) の強力な阻害作用により PE のメチル化阻害等の反応がカスケード的に起こった

結果、リポたんぱく質レセプターの活性上昇やリポたんぱく質コレステロールの肝臓への取り込みが増加し、最終的に血清コレステロールの低下につながっているのではないかと推測されている¹⁶⁻²⁰⁾。

本研究では、第2章としてラットへしいたけを含む飼料を自然死するまで与えたときの寿命および血清脂質の変動について検討することを目的に実験を行った。血清中性脂肪はコントロール食群と比較して、しいたけ添加食群で低い傾向にあったが、有意差はなかった。リン脂質は4週目から36週目までしいたけ添加食群でコントロール食群よりも有意に低値であった。総コレステロールも4週目から36週目までしいたけ添加食群でコントロール食群よりも有意に低値であった。しかし、48週目以降徐々に差はなくなっていった。平均生存期間は、しいたけ添加食群がコントロール食群よりも長かったものの有意差はなかった。また、それぞれの群の個体数の半減期は、しいたけ添加食群が94週齢であったのに対しコントロール食群では77週齢であった。これらのことから、しいたけを摂取することによる36週目までの総コレステロール上昇抑制効果が早期の死亡を減少させることに関与している可能性が考えられた。

第2章で、しいたけの血清脂質への影響が血清コレステロールやリン脂質だけではなく、血清中性脂肪も低下傾向にあったことから飼料中の脂肪に着目した。第3章では、しいたけと同時に摂取する油脂を変えることで血清コレステロールや中性脂肪等の血清脂質パラメーターにどのような影響があるかを検討することを目的に実験を行った。しいたけと同時に摂取する油脂としては、コーン油、ラードおよびMCTを含む油の3種類をラットに4週間与えた。MCT含有油は、コーン油およびラードと比べて血清中性脂肪、リン脂質、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロールおよびL-CAT活性で有意に低値を示した。しいたけには、エリタデニン以外にも β -D-グルカン等の食物繊維も豊富に含んでいることから、エリタデニンのみの作用とは言えないが、中性脂肪やリン脂質、総コレステロールはしいたけとMCT含有油を同時に摂取することで、コーン油やラードと一緒に摂取するよりも低値を示した。このことから、しいたけと同時に摂取する食用油を変えることで、血清脂質への影響が異なることが示唆され、さらにMCT含有油は今回用いた3種類の油の中で最も大きな低下効果が期待できることが示された。

第2章および第3章の研究では、ラットにしいたけを経口的に摂取させることで効果を検討しており、経口摂取した物質が効果を発現させるには、基本的に消化管で吸収される必要がある。しいたけ中のエリタデニンも同様で経口摂取したしいたけ中のエリタデニン

が効果を発揮するには吸収される必要がある。ところがエリタデニンの消化管での吸収に関しては未解明である。そこで、第4章では小腸でのエリタデニンの吸収部位を推測するために、腸管を5箇所より4 cmずつ切り出し、反転小腸法により検討した。その結果、小腸上部から中央部でエリタデニンは濃度に関わらず30-35%の吸収率で吸収されることが示された。また、エリタデニンは用量依存的に吸収されていることが示唆された。

第4章でエリタデニンが小腸で吸収されていることが明らかになったことから、しいたけに含まれるエリタデニンも小腸で吸収され、その効果を発揮していると考えられる。そこで、第2章および第3章で見られたしいたけによる血清脂質の改善作用がしいたけに含まれるエリタデニンによるものであるか否かを確認するため、静脈内へ直接エリタデニンを投与して検討することとした。先行研究で静脈内投与されたエリタデニンは血液循環から急速に排除され、腎臓を介して排泄されるため効果がなかったとの報告³⁴⁾もあるが、静脈投与での効果を検討するにあたっては、複数回の連続的な投与が望ましいと考えた。また、脂質異常症モデルを対象とした研究が見あたらないことから第5章では、高コレステロール血症モデルや肥満モデルとしても利用されている卵巣摘出モデル(OVX: ovariectomy)ラットを実験動物として用い、エリタデニンを静脈内に直接投与した場合も経口投与と同様に血清コレステロール低下作用が見られるか検討した。OVXの影響で摂食量が増加し、体重の増加に繋がったが血清中性脂肪はむしろ低値を示し、総コレステロールは増加する傾向が見られた。エリタデニンを0.5 mg/mL・生理食塩水に調製した溶液を1 mL/kg BWの割合で10日間静脈内に投与することにより、血清中性脂肪やリン脂質、総コレステロールは経口摂取と同様に低下することが示唆された。これらの結果から、複数回連続的にエリタデニンを静脈内へ投与することで、血中のエリタデニン濃度が維持され、血中脂質への改善効果を発揮したと考えられる。

本研究により、しいたけが平均生存期間や個体数が半減するまでの期間を延伸することに関与した可能性やしいたけと同時に摂取する油の種類によって血中脂質の低下の程度に違いがあることが示唆された。また、しいたけの血中脂質低下作用に関与していると考えられるエリタデニンの吸収について反転小腸法で検討したところ、これまで明らかにされていなかったエリタデニンの吸収率は小腸上部から中央部において30-35%であることや用量依存的に吸収されていることから受動的な輸送であることが明らかとなった。さらに、これまでエリタデニンの静脈内投与は効果がないとされてきたが、エリタデニンの静脈内への投与方法を連続的複数回投与とすることで血中の中性脂肪、リン脂質、総コレステロ

ールおよびL-CAT 活性を低下させ、しいたけの血中脂質低下作用にエリタデニンが関与していることが確認できた。

今後、しいたけと MCT 含有油を併用することでコーン油やラードよりも血中脂質を大きく低下させた機序やエリタデニンの吸収に関する詳細な機構を明らかにすることを検討課題としたい。

謝 辞

博士学位論文を提出するにあたって、多くの方々のご指導とご助力をいただきました。

本研究を遂行するにあたり終始、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました小野章史教授に厚く御礼申し上げます。小野章史先生には、学部在籍時に研究の初歩からご指導いただき、卒業論文、修士論文、そして随分と期間が経過してからではありますが博士学位論文まで、なかなか研究活動が進まない私を常に叱咤激励していただいたことは、私の人生において何ものにも代え難い財産となっております。長期間にわたり家族のように温かく見守っていただきまして、心より感謝申し上げます。

また本論文を提出するにあたり2名の先生に副査をお願いいたしました。ご校閲の労を賜りました寺本房子教授および宮田富弘教授に深く感謝申し上げます。

そして、栄養生化学研究室同門生の皆様にも大変お世話になりました。皆様の日々のご支援のおかげで本論文を作成することができました。誠にありがとうございます。

最後になりましたが、博士課程に進学する機会を与えてくれ、あらゆる場面において支援し続けてくれた両親、妻、子どもたちに深く感謝し、謝辞といたします。

投 稿 論 文

1. Effect of long-term Feeding of Shiitake on Age-related Changes in Serum Lipids in Male SD Rats

Norihiko ASADA, Rumi HIRAGANE, Akifumi ONO

共著, Kawasaki Journal of Medical Welfare, 平成 20 年 2 月, Vol.13 No.2, p67-73

2. Effects of Shiitake Intake on Serum Lipids in Rats Fed Different High-Oil or High-Fat Diets

(油脂の種類を変えた高脂肪食を与えたラットにおけるしいたけ摂取による血清脂質への影響)

Norihiko ASADA, Rumi KAIRIKU, Mika TOBO, Akifumi ONO

共著, Journal of Dietary Supplements, Published online: 27 Apr 2018, Vol.15

DOI: 10.1080/19390211.2018.1458768

3. Effects of Intravenously Injected Eritadenine on Serum Lipids in Ovariectomized (OVX) Rats

Norihiko ASADA, Akifumi ONO

共著, Kawasaki Journal of Medical Welfare, 平成 30 年 9 月, Vol.24 No.2

学 会 発 表

1. 「シイタケ添加食における寿命および血清タンパクの変化」

浅田憲彦, 小野章史, 松本義信, 平包留美, 守田哲朗

第 52 回日本栄養・食糧学会, 沖縄, 平成 10 年 4 月 18 日

2. 「干しいたけ添加食ラットにおける寿命および体重と血清脂質との相関関係について」

浅田憲彦, 小野章史, 安原陽子

第 50 回日本栄養改善学会, 岡山, 平成 15 年 9 月 17 日

3. 「Effect of Shiitake on Serum Lipids in Male SD Rats Fed High Fat Diet」

Norihiko Asada, Kimiko Asada, Hisami Ono, Akifumi Ono

15th International Congress of Dietetics, 横浜, 平成 20 年 9 月 10 日

4. 「しいたけ投与ラットにおける油脂の種類の違いによる血清脂質への影響について」

浅田憲彦, 浅田貴美子, 平包留美, 小野章史

第 64 回日本栄養・食糧学会, 徳島, 平成 22 年 5 月 22 日

5. 「油脂の種類の違いによるしいたけ投与ラットにおける血清生化学値への影響について」

浅田憲彦, 浅田貴美子, 平包留美, 小上和香, 小野尚美, 小野章史

第 57 回日本栄養改善学会, 埼玉, 平成 22 年 9 月 12 日

6. 「OVX ラットにおけるエリタデニンの静脈内投与による血清脂質への影響」

浅田憲彦, 大森 聡, 小野章史

第 60 回日本栄養改善学会, 神戸, 平成 25 年 9 月 14 日

7. 「OVX (卵巣摘出) ラットへのエリタデニン静脈内投与による血清脂質への影響」

浅田憲彦, 小野章史

第 61 回日本栄養改善学会, 横浜, 平成 26 年 8 月 22 日

8. 「ラットにおけるエリタデニンの反転小腸法による吸収についての検討」

浅田憲彦, 大森 聡, 小野章史

第 64 回日本栄養改善学会, 徳島, 平成 29 年 9 月 14 日

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省健康局 (2017) 平成 28 年 国民健康栄養調査結果の概要
- 2) 厚生労働省健康局 (2016) 平成 27 年 国民健康栄養調査結果の概要
- 3) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2009) 平成 20 年 患者調査結果の概要
- 4) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2012) 平成 23 年 患者調査結果の概要
- 5) 厚生労働省大臣官房統計情報部 (2015) 平成 26 年 患者調査結果の概要
- 6) 厚生労働省政策統括官付参事官付保健統計室 (2016) 平成 27 年度 国民医療費の概況
- 7) 金田尚志, 荒井君枝, 徳田節子 (1964) しいたけのコレステロール代謝に及ぼす影響. 栄養と食糧 16: 466-468.
- 8) Kaneda T, Tokuda S (1966) Effect of Various Mushroom Preparations on Cholesterol Levels in Rats. *J Nutr* 90: 371-376.
- 9) Sugiyama K, Kawagishi H, Tanaka A, Saeki S, Yoshida S, Sakamoto H, Ishiguro Y (1992) Isolation of plasma cholesterol-lowering components from ningyotake (*Polyporus confluens*) mushroom. *J Nutr Sci Vitaminol* 38: 335-342.
- 10) Bobek P, Ginter E, Jurcovicová M, Kuniak L (1991) Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Ann Nutr Metab* 35: 191-195.
- 11) 卯川 裕一, 安藤 雅之, 古市 幸生, 苔庵 泰志, 西井 孝文, 久松 眞 (2001) ハタケシメジの血漿コレステロール上昇抑制作用. 日本食品科学工学会誌 48: 520-525.
- 12) Mori K, Kobayashi C, Tomita T, Inatomi S, Ikeda M (2008) Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr Res* 28: 335-42.
- 13) Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T (1989) Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 186: 267-73.
- 14) 苔庵 泰志, 西井 孝文, 古市 幸生 (2002) ハタケシメジの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌 49: 126-129.
- 15) 斉藤衛郎, 安元健, 金田尚志 (1975) しいたけおよびその他食用キノコ類のエリタデ

ニン含量. 栄養と食糧 28: 503-505.

16) Sugiyama K, Yamakawa A, Saeki S (1997) Correlation of suppressed linoleic acid metabolism with the hypocholesterolemic action of eritadenine in rats. *Lipids* 32: 859-866.

17) Shimada Y, Morita T, Sugiyama K (2002) Effect of *Lentinus edodes* on fatty acid and molecular species profiles of phosphatidylcholine in rats fed different levels of corn oil. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1759-1763.

18) Shimada Y, Morita T, Sugiyama K (2003) Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. *J Nutr* 133: 758-765.

19) Shimada Y, Morita T, Sugiyama K (2003) Effects of dietary eritadenine on the liver microsomal Δ 6-desaturase activity and its mRNA in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1258-1266.

20) Fukada S, Setoue M, Morita T, Sugiyama K (2006) Dietary eritadenine suppresses guanidinoacetic acid-induced hyperhomocysteinemia in rats. *J Nutr* 136: 2797-2802.

21) 江口文陽 (2016) きこの多機能性を科学する. 木材保存 42(1): 12-17.

22) Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O (2015) Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *Int J Microbiol* 2015, Article ID 376387, 14 pages.

23) Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B (1993) Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 52: 26-33.

24) Bhattarai K, Adhikari S, Fujitani M, Kishida T (2017) Dietary daidzein, but not genistein, has a hypocholesterolemic effect in non-ovariectomized and ovariectomized female Sprague-Dawley rats on a cholesterol-free diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1805-1813.

25) Jin B, Wang W, Bai W, Zhang J, Wang K, Qin L (2017) The effects of estradiol valerate and remifemin on liver lipid metabolism. *Acta Histochemica* 119: 610-619.

26) National Institutes of Health, National Research Council (1996) Guide for the

Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, DC

- 27) Stamler J, Wentworth D, Neaton JD (1986) Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *J Am Med Assoc* 256: 2823-2828.
- 28) Bobek P, Ozdin O, Mikus M (1995) Dietary oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) accelerates plasma cholesterol turnover in hypercholesterolaemic rat. *Physiol Res* 44: 287-291.
- 29) Bobek P, Ozdin L, Kuniak L (1996) Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. *Nahrung* 40: 222-224.
- 30) Bobek P, Ozdin L, Galbavy S (1998) Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition* 14: 282-286.
- 31) Bobek P, Galbavy S (1999) Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung* 43: 339-342.
- 32) Yamada T, Oinuma T, Niihashi M, Mitsumata M, Fujioka T, Hasegawa K, Nagaoka H, Itakura H (2002) Effects of *Lentinus edodes* mycelia on Dietary-Induced Atherosclerotic involvement in Rabbit Aorta. *J Atheroscler Thromb* 9: 149-56.
- 33) Chibata I, Okumura K, Takeyama S, Kotera K (1969) Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia* 25: 1237-1238.
- 34) Takashima K, Izumi K, Iwai H, Takeyama S (1973) The hypocholesterolemic action of eritadenine in the rat. *Atherosclerosis* 17: 491-502.
- 35) Takashima K, Sato C, Sasaki Y, Morita T, Takeyama S (1974) Effect of eritadenine on cholesterol metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 23: 433-438.
- 36) Tamaoku K, Ueno K, Akiura K, Ohkura Y (1982) New Water-soluble Hydrogen Donors for the Enzymatic Photometric Determination of Hydrogen Peroxide. II. N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl) aniline Derivatives. *Chem Pharm Bull* 30: 2492-2497.
- 37) Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I (1977) A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 79: 93-

98.

38) Richmond W (1973) Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19: 1350-1356.

39) Noble RP (1968) Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 9: 693-700.

40) 木本 万里, 吉沢 節子, 越智 尚子, 鶴木 富紀子, 大村 京生, 道喜 美代 (1976) しいたけ摂取の白ネズミの血漿および肝臓脂質成分に対する影響. *栄養と食糧* 29(5): 275-281.

41) Sannoumaru Y, Shimizu J, Nakamura K, Hayakawa T, Takita T, Innami S (1996) Effects of semi-purified dietary fibers isolated from *Lagenaria siceraria*, *Raphanus sativus* and *Lentinus edodes* on fecal steroid excretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 42: 97-110.

42) Schwartz CC, Zech LA, VandenBroek JM, Cooper PS (1993) Cholesterol kinetics in subjects with bile fistula. Positive relationship between size of the bile acid precursor pool and bile acid synthetic rate. *J Clin Invest* 91: 923-938.

43) Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S (1987) Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*) and Maitake (*Grifola frondosa*) Mushroom on Blood Pressure and Plasma Lipids of Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 33: 341-346.

44) Kabir Y, Kimura S (1989) Dietary Mushroom Reduce Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *J Nutr Sci Vitaminol* 35: 91-94.

45) Talpur N, Echard B, Dadgar A, Aggarwal S, Zhuang C, Bagchi D, Preuss HG (2002) Effects of Maitake mushroom fractions on blood pressure of Zucker fatty rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 112: 68-82.

46) Hajjaj H, Mace C, Roberts M, Niederberger P, Fay LB (2005) Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 71: 3653-3658.

47) Zhang HN, Lin ZB (2004) Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol* 25: 191-195.

48) Kimura Y, Okuda H, Arichi S (1988) Effects of the extracts of *Ganoderma*

lucidum on blood glucose level in rats. *Planta Med* 54: 290-294.

49) Sugiyama K, Akachi T, Yamakawa A (1995) Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *J Nutr Biochem* 6: 80-87.

50) Sugiyama K, Akachi T, Yamakawa A (1995) Hypocholesterolemic action of eritadenine is mediated by a modification of hepatic phospholipid metabolism in rats. *J Nutr* 125: 2134-2144.

51) Sugiyama K, Yamakawa A (1996) Dietary eritadenine-induced alteration of molecular species composition of phospholipids in rats. *Lipids* 31: 399-404.

52) Sugiyama K, Yamakawa A, Kawagishi H, Saeki S (1997) Dietary eritadenine modifies plasma phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed different types of fat. *J Nutr* 127: 593-599.

53) 笠井通雄 (2006) 特定保健用食品としての中鎖脂肪酸. *J Lipid Nutr* 15(1): 55-61.

54) AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2002) Official Methods of Analysis of AOAC International 17th ed., p.920.05-920.39, edited by Harwitz W. Gaithersburg, MD: AOAC International

55) S Sugo, Y Matsumoto, T Yamaoka, I Sakurabayashi (1990) Improved enzymatic method for determining free fatty acids in serum, with use of 3-octenoic acid. *Clinical Chemistry* 36(1): 163.

56) Nagasaki T, Akanuma Y (1977) A new colorimetric method for the determination of plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Clin Chim Acta* 75: 371-375.

57) Japan Society of Clinical Chemistry (1989) Recommended Method for Measurement of Enzymes in Human Serum (Aspartate aminotransferase). *Clin Chem* 18: 226-230.

58) Japan Society of Clinical Chemistry (1989) Recommended Method for Measurement of Enzymes in Human Serum (Alanine aminotransferase). *Clin Chem* 18: 250-254.

59) Murase T, Nagasawa A, Suzaki J, Hase T, Tokimitsu T (2002) Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity : stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes* 26: 1459-1464.

60) Readerstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P (2003) Effect of EGCG on

- lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 14: 326-332.
- 61) Sayama K, Lin S, Zheng G, Oguni I (2000) Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. *In Vivo* 14: 481-484.
- 62) Hirose N, Inoue T, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, Yamada H (1991) Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J Lipid Res* 32: 629-638.
- 63) Kushiro M, Masaoka T, Hageshita S, Takahashi Y, Ide T, Sugano M (2002) Comparative effect of sesamin and episesamin on the activity and gene expression of enzymes in fatty acid oxidation and synthesis in rat liver. *J Nutr Biochem* 13: 289-295.
- 64) Sambaiah K, Satyanarayana MN (1987) Stimulation of liver triglyceride secretion in rats by capsaicin. *Current Sci* 56: 897-898.
- 65) Tani Y, Fujioka T, Sumioka M, Furuichi Y, Hamada H, Watanabe T (2004) Effects of capsinoid on serum and liver lipids in hyperlipidemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 50: 351-355.
- 66) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編 (2015)日本食品標準成分表 2015年版(七訂) .
- 67) Enman J, Rova U, Berglund KA (2007) Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *J Agric Food Chem* 55: 1177-1180.
- 68) 萩平 博 (1972) 腸管吸収実験手技(7). 感染症学雑誌 46: 23-30.
- 69) Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 447: 728-734.
- 70) Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29, *Pflugers Arch* 447: 735-743.
- 71) Yamamoto S, Inoue K, Murata T, Kamigaso S, Yasujima T, Maeda J, Yoshida Y, Ohta K, Yuasa H (2010) Identification and functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals. *J Biol Chem* 285: 6522-6531.
- 72) Salati ML, Gross JC, Henderson ML, Savaiano AD (1984) Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5' -monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the

isolated vascularly perfused rat small intestine. *J Nutr* 114: 753-760.

73) Shimada Y, Morita T, Sugiyama K (2003) Eritadenine-induced alterations of plasma lipoprotein lipid concentrations and phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets.

Biosci Biotechnol Biochem 67: 996-1006.

74) Mook DG, Kenney NJ, Roberts S, Nussbaum AI, Rodier WI 3rd (1972) Ovarian-adrenal interactions in regulation of body weight by female rats. *J Comp Physiol Psychol* 81: 198-211.

75) United Nations (2016) Demographic Yearbook

76) Costa DL (2005) Causes of improving health and longevity at older ages: a review of the explanations. *Genus* 61(1): 21-28.

77) Cutler D, Deaton A, Lleras-Muney A (2006) The determinants of mortality. *J econ perspect* 20(3):97-120.

78) 厚生労働省 (2017) 人口動態調査

79) Inoue M, Sawada N, Matsuda T, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Shibuya K, Tsugane S (2012) Attributable causes of cancer in Japan in 2005-systematic assessment to estimate current burden of cancer attributable to known preventable risk factors in Japan. *Ann Oncol* 23(5): 1362-1369.

80) Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H (2013) Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett* 334: 56-61.

81) 井上 詠, 高山美智代, 別所理恵子, 吉田諭史, 柏木和宏, 榎野香奈子, 清水良子, 広瀬 寛, 杉野吉則, 岩男 泰 (2017) 大腸ポリープ発生におけるメタボリック症候群の関与の検討. *総合健診* 44(6): 67-72.