

メタボリック・プロファイリング法による食品因子の未だ見ぬ機能の可視化

研究年度 令和4年度

研究期間 令和3年度～令和5年度

研究代表者名 城内 文吾

共同研究者名 柴崎 貢志

I. はじめに

メタボリックシンドローム（メタボ）は内臓脂肪蓄積を中心病態とする動脈硬化性疾患（脳梗塞や心筋梗塞）の危険因子（血中脂質異常、高血糖、血圧高値）が重複した状態である。実験動物を用いた *in vivo* 研究により、メタボ発症予防に寄与する食品因子の探索が行われ、これまでに数多くの化合物が見出されてきている。多くの代謝を司る肝臓、膵臓、脂肪組織および骨格筋が病態発症予防・抑制のメカニズムの解析対象となるが、アウトカム周辺（代謝近傍）のデータが取得される傾向にあり、アウトカムを説明するメカニズムの全容解明は困難である。申請者は対象化合物を特定せずに試料（生体サンプル）中に含まれる成分を包括的に計測するメタボリック・プロファイリング法を立ち上げた。本研究ではメタボリック・プロファイリング法による食品因子の未だ見ぬ機能の可視化を目指すとともに、確立されたバイオマーカー分子が他の疾患のバイオマーカーにもなりうるのか、その可能性を見出すことを試みる。

多数の藻類が世界中で発見されており、それらは生物学的組織の複雑さに応じて大型藻類（海藻としても知られる）と微細藻類の2つに分類される¹⁾。微細藻類とは淡水と海水の両方の生態系に分布する単細胞性の光合成生物群の総称である¹⁾。微細藻類は農作物と比較して単位面積あたりの生産性が高く、様々な培養条件への適用性も高く、増殖速度の速さから、食品およびバイオ燃料の産業利用が期待されている^{1,2)}。また、微細藻類は持続可能な食料供給と食料の安全保障の観点から、大量の水や土地を必要としない次世代のタンパク質・必須脂肪酸供給源としても注目されている²⁾。現在、世界の微細藻類市場の大部分は、スピルリナやクロレラなど培養においてコンタミネーションリスクが少なく、安価で容易に生育可能な淡水性微細藻類に限定されている³⁾。一方、海産性微細藻類はカロテノイドや *n-3* 系多価不飽和脂肪酸といった生理活性化合物類の高い生産能力を有することも知られている⁴⁾。海産性微細藻類油脂は魚油と比較して、不快な臭いが無い、重金属による汚染が少ない、管理された培養下で生産される油脂の脂肪酸組成に大きな変動がないなど、いくつかの利点がある⁵⁾。これらのことから、いくつかの海産性微細藻類や海産性微細藻類由来油脂がEUの新規食品リストに含まれている⁶⁾。*Chaetoceros gracilis*（以下 *Chaeto* と略す）は海産性微細藻類の1つであり、クロロフィル *a, c1, c2* などの光合成色素に加え、タンパク質、フコキサンチン、EPA に富む特徴を有する^{4,7,8)}。フコキサンチンはキサントフィルファミリーに属し、アレン構造をもつ非プロビタミンAカロテノイドであり、癌細胞に対する増殖抑制およびアポトーシス誘導作用^{9,10)}、抗肥満作用¹¹⁾、および抗糖尿病作用^{12,13)}を有すること、これらの生理機能発現にアレン構造が関与することが報告されている。またEPAは血中脂質低下作用と抗炎症作用を有し、心血管疾患のリスク低下に資することが知られている^{14,15)}。*Chaeto* は現在、EUの新規食品リストには含まれていないが、上述の生理活性化合物に富むことから食資源としての活用が期待される。そこで本研究

2年目では、メタボリックプロファイリング法を用いた海産性微細藻類 *Chaeto* の栄養生理機能の評価を行い、食資源としての活用の可能性を探った。

II. 実験方法

Chaeto は、株式会社ブルーサイエンティフィック新上五島（長崎）より供与頂いた。*Chaeto* の栄養成分組成は100 gあたりで熱量411 kcal、水分4.3 g、タンパク質48.4 g、脂質17.1 g、炭水化物15.9 g、灰分14.3 gであり、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンに富むアミノ酸組成（Table 1）、エイコサペンタエン酸（EPA）に富む脂肪酸組成であった（Table 2）。上記の栄養成分分析は公益社団法人長崎県食品衛生協会 食品環境検査センターにて行われた。また、*Chaeto* のカロテノイド含量はTable 3の通りであった（東京大学農学部水圏生物環境学研究室の片山智代特任助教に分析頂いた）。

実験食はAIN-76組成¹⁶⁾に準拠し、コーン油を10%、コレステロールを0.1%添加した食餌をControl食とし、*Chaeto* は2%および5%の2つの添加量を設定し、食餌間のタンパク質量および脂質量が同等になるようにそれぞれカゼイン、トウモロコシ油で差し引きし、タンパク質および脂質以外の成分についてはスクロースと置き換えて調製した（Table 4）。

5週齢のSD系ラットを1週間予備飼育し、体重に群間で違いがないように3群に分け、それぞれの実験食を4週間paired-feedingした。飼育終了後、6時間絶食し、断頭により屠殺を行い、各臓器・組織を摘出し、重量測定後に-80℃で凍結保存した。得られた血液は30分間室温にて静置し、冷却遠心（1,200 × g, 20 min, 4℃）することで血清を調製し、-80℃で凍結保存した。本動物実験は長崎県立大学動物実験委員会による動物実験計画書の審査と長崎県立大学学長の承認を得て実施した。

血清中のトリグリセリド、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸およびグルコース濃度、ALT活性は酵素法（TG E-test, Cholesterol E-test, PL C-test, NEFA C-test, Glucose CII-test, Transaminase CII-test; 富士フィルム和光純薬株式会社）により測定した。血清HDLコレステロール濃度は、簡易DCM法¹⁷⁾により分画後に酵素法（Cholesterol E-test）により測定した。血清中のC-ペプチド、インスリンおよびアディポネクチン濃度はELISA法（LBIS rat C-peptide ELISA kit, LBIS rat insulin ELISA kit; 富士フィルムワコーシバヤギ株式会社, mouse/rat adiponectin ELISA kit; 大塚製薬株式会社）により測定した。肝臓の総脂質をBligh & Dyerの方法により抽出し、2-プロパノールに溶解したものを脂質抽出液としてトリグリセリドおよびコレステロール量を酵素法（TG E-test, Cholesterol E-test）により測定した¹⁸⁾。また、肝臓リン脂質量は化学法により無機リンを定量し、無機リン-リン脂質換算係数を乗じて算出した¹⁹⁾。肝臓中のグリコーゲン量はLoらの方法²⁰⁾により測定した。肝臓における脂肪酸合成系酵素（FAS, G6PDH, ME）および脂肪酸β酸化系酵素（CPT）の活性は先行研究の方法²¹⁾に準じて測定した。血清中のラソステロール、カンペステロールおよびβ-シトステロール濃度は5α-cholestaneを内部標準としてGC-MSにより測定した。肝臓における脂質代謝関連遺伝子群の発現量測定は、リアルタイムPCRシステム（LightCycler® 96; 日本ジェネティクス株式会社）を用いてSYBR Green検出系により行った。肝臓および筋肉中の親水性低分子代謝物のノンターゲット分析はGC-MSを用いて実施した。GC/MSに供する試料の前処理はTsugawaらの方法に準じて行った²²⁾。GC-MS分析データをnetCDFフォーマットに変換し、MS-DIAL ver. 4.92により、ベース

ライン補正、ピーク検出、デコンボリューション、アライメントおよび化合物同定を行い^{23,24}、2-isopropylmalic acid を内部標準としてピーク強度を標準化した。

実験結果は平均値±標準誤差で表した。各パラメータにおける *Chaeto* 添加量（用量）反応性については Jonckheere-Terpstra 傾向検定を用いて解析した。また、3 群間の平均値差については一元配置分散分析、次いで Dunnett の多重比較検定を用いて解析を行った。2 群間の平均値差（肝臓および筋肉中の親水性低分子代謝物解析）については *F-test* による等分散性の確認後、等分散の場合は Student's *t-test*、不等分散の場合は Welch's *t-test* にて解析した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意、 $0.05 \leq p < 0.1$ を傾向とした。なお、統計解析には R および R コマンドの機能を拡張した統計ソフトウェアである EZR を用いた²⁵。*Chaeto* 摂取により有意に変動した代謝物を MetaboAnalyst 5.0²⁶の Pathway analysis および Enrichment analysis に供し、影響を受ける可能性のある代謝経路の探索を行った。

III. 結果および考察

4 週間給餌後、解剖時の肉眼所見として *Chaeto* を摂取したラットの白色脂肪組織の橙色化が観察された（Figure 1）。終体重、摂食量、食餌効率、肝臓重量、白色及び褐色脂肪組織重量に群間で差はなかったが、ヒラメ筋重量に *Chaeto* の用量反応性が認められた（重量の増加傾向： $p < 0.05$ for Trends）（Table 5）。肝臓中のリン脂質およびグリコーゲン量に差はなかったが、肝臓トリグリセリド量に *Chaeto* の用量反応性が認められ（量の減少傾向： $p < 0.05$ for Trends）、対照群と比較して 2% 及び 5% *Chaeto* 群で有意に低下した（Table 6）。また、肝臓コレステロール量に *Chaeto* の用量反応性が認められ（量の減少傾向： $p < 0.05$ for Trends）、対照群と比較して 5% *Chaeto* 群で有意に低下した（Table 6）。用量依存性は 2% および 5% *Chaeto* 群の血清総コレステロールおよび HDL コレステロール濃度にも認められ（濃度の上昇傾向： $p < 0.05$ for Trends）、対照群と比較して 2% 及び 5% *Chaeto* 群で有意に高値を示した（Table 6）。その他の血清生化学パラメータには差はなかった。肝臓トリグリセリド量低下の作用機序を探るべく、脂肪酸の合成およびβ酸化に關与する酵素の活性を測定したところ、脂肪酸β酸化系の CPT 活性に変化はなかったが、脂肪酸合成系の FAS 活性は対照群と比較して 5% *Chaeto* 群で低下傾向（ $p = 0.0865$ ）、G6PDH 活性は対照群と比較して 5% *Chaeto* 群で有意に低下した（Table 7）。肝臓において同定ならびに半定量した 66 個の代謝物の中で、グリセロール、ヒポタウリンおよびイノシトール量が対照群と比較して 5% *Chaeto* 群で有意に減少した（Table 8）。したがって、*Chaeto* 摂取による肝臓トリグリセリド低下は、トリグリセリドの基質である脂肪酸とグリセロールの両方の減少に起因することが示唆された。コレステロール代謝変動の作用機序を探るべく、血清ステロイド濃度を測定したところ、コレステロール吸収マーカーとして知られるカンペステロールとβ-シトステロール濃度は対照群と比較して 2% および 5% *Chaeto* 群で有意に低値を示した（Table 7）。さらに、*Scarb1* mRNA 量は対照群と比較して 5% *Chaeto* 群で有意に低下した（Table 7）。したがって、*Chaeto* 摂取により引き起こされる腸管からのコレステロール吸収の低下と血中から肝臓への HDL 取り込みの減少が、肝臓コレステロール量の減少に寄与することが示唆された。ヒラメ筋において同定ならびに半定量した 50 個の代謝物の中で、19 個（2-アミノエタノール、3-ヒドロキシピルビン酸、β-アラニン、カダベリン、クレアチン、グリセロール、グリシン、ヒポキサンチン、イミノジアセテート、イソロイシン、ロイシン、リジン、ニコチンアミド、O-

ホスホエタノールアミン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、ウラシルおよびバリン)の量が5%*Chaeto*群で有意に減少し、シュウ酸量は5%*Chaeto*群で有意に増加した(**Table 8**)。 *Chaeto* 摂取によりヒラメ筋重量の増加傾向も見られたことから、上述の有意に変動した20個の代謝物をMetaboAnalysit 5.0のpathway analysisに供し、*Chaeto* 摂取により変動を受ける可能性がある代謝経路を探索した。その結果、9つの代謝経路(“aminoacyl-tRNA biosynthesis,” “valine, leucine and isoleucine biosynthesis”, “pantothenate and CoA biosynthesis”, “glycine, serine and threonine metabolism,” “valine, leucine and isoleucine degradation”, “β-alanine metabolism”, “glutathione metabolism”, “phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis,” and “glyoxylate and dicarboxylate metabolism”)がピックアップされ、Enrichment analysisにおいてもこれら9つの代謝経路がエンリッチしていることが示唆された(**Figure 2**)。

IV. 終わりに

海産性微細藻類 *Chaeto* の経口摂取が高スクロースとコレステロール含有食を与えたラットの肝臓脂質蓄積を抑制することを初めて見出し、食資源としての活用の可能性を示した。*Chaeto* と同様の生理活性化合物を含む他の海産性微細藻類との更なる比較研究を通じて、*Chaeto* 摂取が独自の効果を発揮するのか否かを明らかにしたい。

なお、本研究成果の詳細については学術論文 (Shirouchi B, et al. (2023) Oral administration of *Chaetoceros gracilis*—a marine microalga—alleviates hepatic lipid accumulation in rats fed a high-sucrose and cholesterol-containing diet. *Metabolites* 13(3):436. doi:10.3390/metabo13030436.) を参照されたい。

V. 参考文献

- 1) Garcia-Perez P, et al. (2023) Algal nutraceuticals: A perspective on metabolic diversity, current food applications, and prospects in the field of metabolomics. *Food Chem.* 409, 135295.
- 2) Barbosa MJ, et al. (2023) Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology. *Trends Biotechnol.* 41, 452–471.
- 3) Araújo R, et al. (2020) Current status of the algae production industry in Europe: An emerging sector of the blue bioeconomy. *Front Mar Sci.* 7, 626389.
- 4) Katayama T, et al. (2022) Bioprospecting of tropical microalgae for high-value products: n-3 polyunsaturated fatty acids and carotenoids. *Aquacult. Rep.* 27, 101406.
- 5) Mayer C, et al. (2022) The potential of the marine microalga *Diacronema lutheri* in the prevention of obesity and metabolic syndrome in high-fat-fed Wistar rats. *Molecules* 27, 4246.
- 6) Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1023 of 23 July 2018 Correcting Implementing Regulation (EU) 2017/2470 Establishing the Union List of Novel Foods. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2018:187:FULL&from=IT> (accessed on 31 March 2023).
- 7) Tachihana S, et al. (2020) High productivity of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin by a marine diatom *Chaetoceros gracilis* in a semi-continuous culture. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 602721.
- 8) Yang Y, et al. (2020) Total lipids content, lipid class and fatty acid composition of ten species of

- microalgae. *J. Oleo Sci.* 69, 1181–1189.
- 9) Martin LJ. (2015) Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment. *Mar. Drugs* 13, 4784–4798.
 - 10) Lau TY, Kwan HY. (2020) Fucoxanthin is a potential therapeutic agent for the treatment of breast cancer. *Mar. Drugs* 20, 370.
 - 11) Gammone MA, D’Orazio N. (2015) Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar. Drugs* 13, 2196–2214.
 - 12) Hosokawa M, et al. (2010) Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 504, 17–25.
 - 13) Nishikawa S, et al. (2012) Fucoxanthin promotes translocation and induction of glucose transporter 4 in skeletal muscles of diabetic/obese KK-A(y) mice. *Phytomedicine* 19, 389–394.
 - 14) Skulas-Ray AC, et al. (2019) Omega-3 fatty acids for the management of hypertriglyceridemia: A science advisory from the American Heart Association. *Circulation* 140, e673–e691.
 - 15) Djuricic I, Calder PC. (2021) Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An Update for 2021. *Nutrients* 13, 2421.
 - 16) American Institute of Nutrition. (1977) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.* 107, 1340–1348.
 - 17) Niibo M, et al. (2019) Probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 improves insulin secretion in a diabetic rat model. *J. Dairy Sci.* 102, 997–1006.
 - 18) Carr TP, et al. (1993) Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* 26, 39–42.
 - 19) Rouser G, et al. (1966) Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1, 85–86.
 - 20) Lo S, et al. (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28, 234–236.
 - 21) Matsuoka R, et al. (2017) Dietary egg-white protein increases body protein mass and reduces body fat mass through an acceleration of hepatic β -oxidation in rats. *Br. J. Nutr.* 118, 423–430.
 - 22) Tsugawa H, et al. (2011) Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 292–298.
 - 23) Lai Z, et al. (2018) Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat. Methods* 15, 53–56.
 - 24) Tsugawa H, et al. (2020) A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nat. Biotechnol.* 38, 1159–1163.
 - 25) Kanda Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452–458.
 - 26) MetaboAnalyst. MetaboAnalyst 5.0—User-Friendly, Streamlined Metabolomics Data Analysis. Available online: <https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml> (accessed on 31 March 2023).

Table 1. Amino acid contents of *Chaetoceros gracilis*

Aspartic acid	4140 mg/100 g
Threonine	1830 mg/100 g
Serine	2020 mg/100 g
Glutamic acid	4200 mg/100 g
Proline	1520 mg/100 g
Glycine	1930 mg/100 g
Alanine	2500 mg/100 g
Valine	1790 mg/100 g
Methionine	560 mg/100 g
Isoleucine	1650 mg/100 g
Leucine	2970 mg/100 g
Tyrosine	1490 mg/100 g
Phenylalanine	1860 mg/100 g
Histidine	710 mg/100 g
Lysine	2240 mg/100 g
Arginine	2090 mg/100 g
Cystine	790 mg/100 g
Tryptophan	≤ 4 mg/100 g

Table 2. Fatty acid contents of *Chaetoceros gracilis*

Myristic acid (C14:0)	1352 mg/100 g
Palmitic acid (C16:0)	2520 mg/100 g
Heptadecanoic acid (C17:0)	425 mg/100 g
Stearic acid (C18:0)	789 mg/100 g
Palmitoleic acid (C16:1 <i>n</i> -7)	3256 mg/100 g
Oleic acid (C18:1 <i>n</i> -9)	1157 mg/100 g
Linolenic acid (C18:2 <i>n</i> -6)	97 mg/100 g
Arachidonic acid (C20:4 <i>n</i> -6)	104 mg/100 g
Eicosapentaenoic acid (C20:5 <i>n</i> -3)	2535 mg/100 g
Docosahexaenoic acid (C22:6 <i>n</i> -3)	180 mg/100 g

Table 3. The contents of photosynthetic and accessory pigments in *Chaetoceros gracilis*

Pigments	Content (mg/g dry weight)
Chlorophyll <i>a</i>	15.2 ± 0.6
Chlorophyll <i>c</i> ₁	5.73 ± 0.06
Chlorophyll <i>c</i> ₂	0.868 ± 0.014
Fucoxanthin	11.8 ± 0.1
Diadinoxanthin	0.650 ± 0.009
Diatoxanthin	0.455 ± 0.009
β-Carotene	0.540 ± 0.014

Values are means ± SEM (*n* = 4).

Table 4. Composition of experimental diets in this study

	Control	2% <i>Chaeto</i>	5% <i>Chaeto</i>
Ingredients		(g/kg diet)	
Sucrose	449	442.10	431.75
Casein	200	190.32	175.80
β -Cornstarch	150	150	150
Cellulose	50	50	50
Corn oil	100	96.58	91.45
<i>Chaetoceros gracilis</i>	---	20	50
Mineral mixture (AIN-76)	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-76)	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2
Cholesterol	1	1	1

Table 5. Effects of *Chaeto* feeding on morphometric variables of rats fed high-sucrose and cholesterol-containing diet.

	Control	2% <i>Chaeto</i>	5% <i>Chaeto</i>	<i>p</i> for Trends [#]
Initial body weight (g)	185 ± 3	186 ± 3	186 ± 3	N.S.
Final body weight (g)	428 ± 6	424 ± 12	419 ± 4	N.S.
Food intake (g/day)	24.8 ± 0.4	24.5 ± 0.8	24.1 ± 0.6	N.S.
Food efficiency (%) [‡]	35.0 ± 0.6	34.5 ± 0.7	34.5 ± 0.3	N.S.
Organ weights (g/100g of body weight)				
Liver	4.43 ± 0.13	4.44 ± 0.17	4.25 ± 0.11	N.S.
Soleus muscle	1.02 ± 0.03	1.09 ± 0.02	1.09 ± 0.03	<i>p</i> < 0.05
White adipose tissue (WAT) weights (g/100 g of body weight)				
Epididymal	1.33 ± 0.08	1.22 ± 0.03	1.30 ± 0.16	N.S.
Perirenal	1.59 ± 0.08	1.56 ± 0.14	1.54 ± 0.30	N.S.
Mesenteric	1.57 ± 0.09	1.39 ± 0.16	1.19 ± 0.18	N.S.
Abdominal [†]	4.48 ± 0.18	4.17 ± 0.30	4.03 ± 0.63	N.S.
Brown adipose tissue (BAT) weight (g/100 g of body weight)				
	0.147 ± 0.007	0.182 ± 0.017	0.163 ± 0.014	N.S.

Values represent the mean ± SEM (*n* = 6–7 group). [‡]Food efficiency was calculated by applying the following formula: Food efficiency (%) = body weight gain (g)/food intake (g) × 100. [†]Abdominal WAT weights were calculated by summing the weights of the epididymal, perirenal, and mesenteric WAT.

[#]Jonckheere–Terpstra trend test. **p* < 0.05 (vs. control group) according to Dunnett’s multiple comparison test.

N.S., not significant.

Table 6. Effects of *Chaeto* feeding on hepatic lipid and glycogen contents, and serum biochemical parameters of rats fed high-sucrose and cholesterol-containing diet.

	Control	2% <i>Chaeto</i>	5% <i>Chaeto</i>	<i>p</i> for Trends [#]
Hepatic contents of lipids and glycogen (mg/g liver)				
TG	49.8 ± 5.2	33.4 ± 5.6 *	18.8 ± 2.4 *	<i>p</i> < 0.05
T-Chol	8.29 ± 0.61	6.84 ± 0.72	4.26 ± 0.27 *	<i>p</i> < 0.05
PL	27.1 ± 0.7	27.2 ± 2.0	29.3 ± 1.3	N.S.
Glycogen	33.2 ± 6.1	27.3 ± 4.2	25.6 ± 4.4	N.S.
Serum biochemical parameters				
TG (mg/dL)	181 ± 21	156 ± 33	134 ± 24	N.S.
T-Chol (mg/dL)	95.0 ± 2.6	124 ± 4 *	138 ± 4 *	<i>p</i> < 0.05
HDL Chol (mg/dL)	43.9 ± 2.4	62.7 ± 5.0 *	80.8 ± 5.1 *	<i>p</i> < 0.05
Non-HDL Chol (mg/dL)	51.1 ± 2.6	61.5 ± 5.4	57.7 ± 4.9	N.S.
PL (mg/dL)	193 ± 10	213 ± 16	217 ± 7	N.S.
NEFA (mmol/L)	0.609 ± 0.055	0.630 ± 0.060	0.654 ± 0.054	N.S.
Glucose (mg/dL)	131 ± 6	128 ± 6	121 ± 4	N.S.
C-peptide (pg/mL)	229 ± 68	222 ± 22	164 ± 23	N.S.
Insulin (pg/mL)	273 ± 134	141 ± 29	148 ± 26	N.S.
Adiponectin (µg/mL)	1.69 ± 0.15	1.54 ± 0.16	1.55 ± 0.15	N.S.
ALT (IU/L)	8.42 ± 0.69	7.64 ± 0.68	7.24 ± 0.45	N.S.

Values represent the mean ± SEM (*n* = 6–7 group). [#]Jonckheere–Terpstra trend test. **p* < 0.05 (vs. control group) according to Dunnett’s multiple comparison test. ALT, alanine aminotransferase; Chol, cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; NEFAs, non-esterified fatty acids; N.S., not significant; PL, phospholipids; TG, triglycerides.

Table 7. Effects of *Chaeto* feeding on activities of hepatic enzymes related fatty acid metabolism, serum levels of steroids, and relative levels of hepatic mRNA related to cholesterol metabolism in rats fed high-sucrose and cholesterol-containing diet.

	Control	2% <i>Chaeto</i>	5% <i>Chaeto</i>	<i>p</i> for Trends [#]
<i>Hepatic activities of enzymes related to fatty acid synthesis</i> (mmol/min/mg protein)				
FAS	10.9 ± 0.6	9.22 ± 0.90	8.49 ± 0.96 (<i>p</i> = 0.0865)	<i>p</i> < 0.05
G6PDH	35.0 ± 3.9	27.7 ± 8.2	18.9 ± 2.8 *	<i>p</i> < 0.05
ME	41.3 ± 4.8	38.3 ± 7.8	30.5 ± 4.3	N.S.
<i>Hepatic activities of enzyme related to fatty acid β-oxidation</i> (mmol/min/mg protein)				
CPT	5.34 ± 0.13	5.32 ± 0.23	5.05 ± 0.27	N.S.
<i>Cholesterol synthesis marker in serum</i> (mg/dL)				
Lathosterol	0.136 ± 0.028	0.163 ± 0.023	0.170 ± 0.024	N.S.
<i>Cholesterol absorption markers in serum</i> (mg/dL)				
Campesterol	5.41 ± 0.21	4.82 ± 0.14 *	4.34 ± 0.07 *	<i>p</i> < 0.05
β-Sitosterol	9.83 ± 0.45	7.04 ± 0.33 *	6.86 ± 0.15 *	<i>p</i> < 0.05
<i>Relative levels of hepatic mRNA related to fatty acid synthesis and cholesterol metabolism</i> (arbitrary unit)				
<i>Fasn</i>	1.00 ± 0.40	0.792 ± 0.350	0.452 ± 0.128	N.S.
<i>G6pd</i>	1.00 ± 0.08	1.21 ± 0.24	1.07 ± 0.21	N.S.
<i>Hmgcr</i>	1.00 ± 0.13	1.07 ± 0.15	0.971 ± 0.177	N.S.
<i>Soat1</i>	1.00 ± 0.07	1.14 ± 0.21	0.786 ± 0.199	N.S.
<i>Scarb1</i>	1.00 ± 0.06	0.886 ± 0.049	0.683 ± 0.105 *	<i>p</i> < 0.05
<i>Abca1</i>	1.00 ± 0.15	1.20 ± 0.13	1.06 ± 0.20	N.S.

Values represent the mean ± SEM (*n* = 6–7 group). [#]Jonckheere-Terpstra trend test. **p* < 0.05 (vs control group) according to Dunnett multiple comparison test. *Abca1*, ATP-binding cassette protein A1; CPT, carnitine palmitoyltransferase; FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; ME, malic enzyme; N.S., not significant; *Scarb1*, scavenger receptor class B member 1; *Soat1*, sterol *O*-acyltransferase 1.

Table 6. Effects of *Chaeto* feeding on levels of identified water-soluble metabolites in the liver and soleus muscle of rats fed high-sucrose and cholesterol-containing diet.

	Control	5% <i>Chaeto</i>
<i>Levels of water-soluble metabolites in the liver (arbitrary unit[#])</i>		
Glycerol	402 ± 22	239 ± 40 *
Hypotaurine	32.5 ± 5.3	10.6 ± 1.6 †
Inositol	24.7 ± 1.3	17.6 ± 1.3 *
<i>Levels of water-soluble metabolites in soleus muscle (arbitrary unit[#])</i>		
2-Aminoethanol	10.3 ± 0.7	17.8 ± 0.8 *
3-Hydroxypyruvate	194 ± 17	283 ± 18 *
β-Alanine	23.0 ± 3.0	54.8 ± 7.2 *
Cadaverine	17.6 ± 1.8	26.2 ± 3.5 *
Creatinine	52.7 ± 3.6	76.2 ± 3.7 *
Glycerol	189 ± 16	275 ± 14 *
Glycine	500 ± 69	727 ± 49 *
Hypoxanthine	39.5 ± 6.5	63.8 ± 8.6 *
Iminodiacetate	14.0 ± 2.2	28.5 ± 4.3 *
Isoleucine	72.6 ± 3.1	129 ± 14 †
Leucine	142 ± 9	237 ± 27 †
Lysine	154 ± 16	282 ± 45 *
Nicotinamide	31.0 ± 1.4	35.9 ± 1.6 *
O-Phosphoethanolamine	5.34 ± 0.41	7.59 ± 0.55 *
Oxalate	17.6 ± 1.4	13.1 ± 1.5 *
Phenylalanine	11.2 ± 1.2	23.4 ± 3.5 *
Serine	24.6 ± 2.5	51.0 ± 5.7 *
Threonine	23.4 ± 2.5	39.0 ± 3.7 *
Uracil	4.42 ± 0.61	7.11 ± 0.98 *
Valine	81.3 ± 3.3	142 ± 19 †

Values represent the mean ± SEM ($n = 6-7$ group). [#]Relative quantity of each metabolite was calculated using the peak area of each metabolite relative to an internal standard (2-isopropylmalic acid). * $p < 0.05$ (vs control group) according to Student's t -test. † $p < 0.05$ (vs control group) according to Welch's t -test.

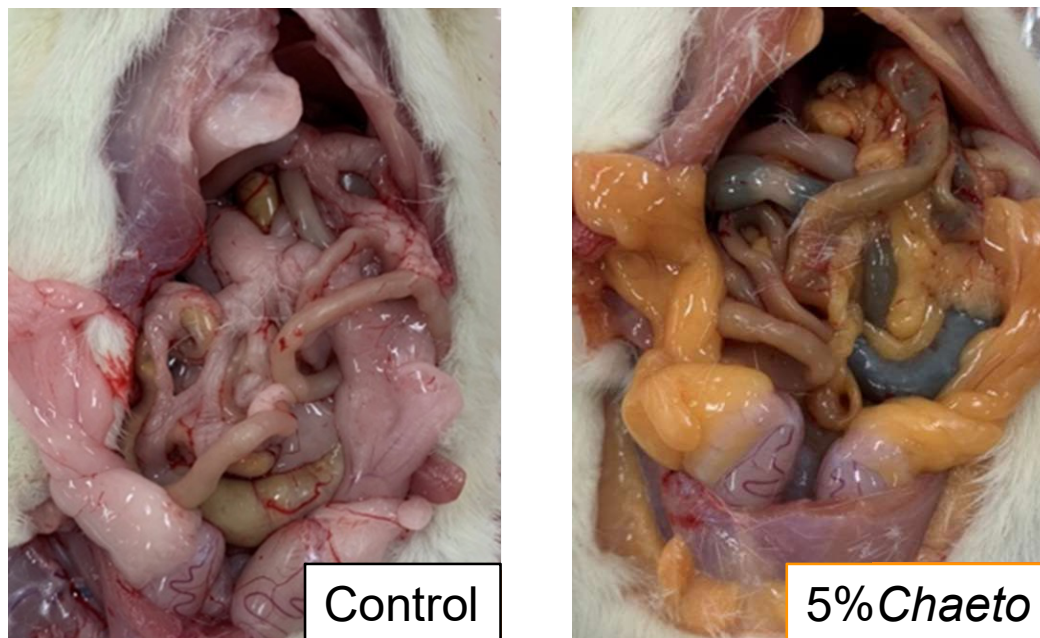
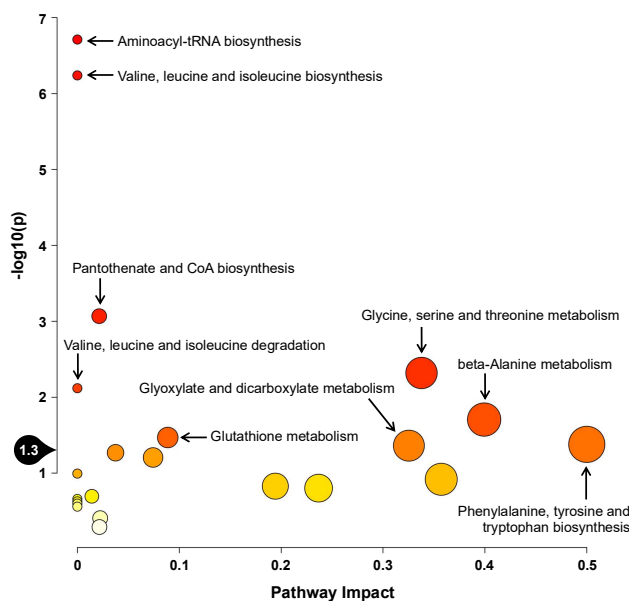


Figure 1. Macroscopic changes in the abdominal cavity of rats fed *Chaeto*.

(a) Overview of Pathway Analysis



(b) Metabolite Sets Enrichment Overview

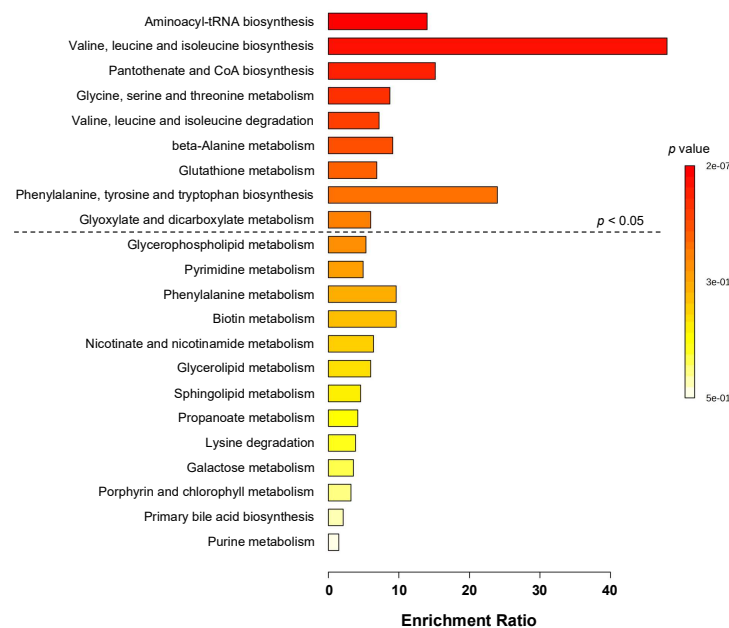


Figure 2. (a) Summary of MetaboAnalyst 5.0 pathway analysis for metabolites significantly different between the control and 5%*Chaeto* groups. The pathway impact on the x axis from 0 (low impact) to 1 (strong impact) represents the values from the pathway topology analysis. The circle diameter covaries with pathway impact, and the fill color intensity (white to red) reflects statistical significance (decreasing p -value). The black drop with 1.3 on the y axis indicates the threshold of significance at $p < 0.05$. (b) Summary of MetaboAnalyst 5.0 enrichment analysis for metabolites significantly different between the control and 5%*Chaeto* groups. The enrichment ratio is calculated as the number of hits within a particular metabolic pathway divided by the expected number of hits. Each bar shows a pathway, and the fill color intensity (white to red) reflects statistical significance (decreasing p -value). The pathways above the dotted line indicate significance at $p < 0.05$.