

エクオールの食欲抑制効果に関する機構解明 —エクオールの抱合代謝産物の解析—

水重貴文*・藤谷美菜・山下由起・山内佳也・村上 聖・岸田太郎・海老原清

愛媛大学農学部生物資源学科栄養科学分野

Mechanism for Equol-Induced Anorectic Effect — Analysis of Free and Conjugated Equol Concentrations —

Takafumi MIZUSHIGE*, Mina FUJITANI, Yuki YAMASHITA, Yoshiya YAMAUCHI,
Satoru MURAKAMI, Taro KISHIDA and Kiyoshi EBIHARA

Laboratory of Nutritional science, Faculty of Agriculture, Ehime University,
Matsuyama 790-8566

ABSTRACT

In the previous study, we have shown that an equol, a metabolite of soybean daidzein with intestinal microorganisms, decreased food intake specifically in female rats. The equol may be an active substance on the anorectic action. It is well known that equol metabolizes to glucuronidation and sulfate conjugation in liver and small intestine. In the present study, to examine a biodistribution of daidzein and equol after feeding of daidzein diet, we measured daidzein, conjugated and free equol concentrations in liver, bile, blood, urine and feces when female rats were fed a daidzein diet. As to the results, equol concentrations in bile were higher than those in liver, blood and urine. Free equol concentration in bile in female rats was significantly lower than that in male rats, suggesting that female-specific free equol in an enterohepatic circulation might be the active substance of the anorectic effect. We performed a procedure in which bile taken from female donor rats fed the daidzein diet was infused into the duodenum in other female rats fed the control diet. The bile infusion significantly decreased food intake in female rats, suggesting that the enterohepatic circulated equol in bile induced the anorectic effect. In conclusion, we found that an accumulation of enterohepatic circulated free equol may down-regulate food intake. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 165-169, 2012.

Key words : soy isoflavone, daidzein, equol, conjugate, bile acid

*〒790-8566 松山市樽味3-5-7

先に、我々は、大豆イソフラボンであるダイゼインおよびその代謝産物であるエクオールが雌特異的な食欲抑制効果を示すことを見出したが、その作用機序は未だ明らかとなっていない¹⁾。ダイゼインおよびエクオールは、肝臓や小腸でグルクロン酸抱合型や硫酸抱合型となり代謝される。尿中に排泄されるエクオールは雄では主に硫酸抱合型であり、雌では主にグルクロン酸抱合型であることが報告されており²⁾、エクオールの抱合反応には雌雄差があることが示唆されている。これらのことから、肝臓や小腸で抱合代謝されたダイゼインやエクオールが食欲抑制効果の発現に寄与することが考えられる。本研究では、ダイゼインを摂取させた雌ラットを用いて、肝臓、胆汁、血液、尿、糞に含まれるダイゼインおよびエクオールの経日的変化や、胆汁に含まれる遊離型および抱合型エクオールの濃度比率を調べ、ダイゼイン摂取雌ラットの食欲抑制効果とエクオールの体内動態の関連性を明らかにすることを目的とした。

方 法

全ての実験において、動物は7週齢SDラットを7日間飼育環境に馴化させた後に用いた。エサは、AIN93組成に準拠したコントロール (C) 飼料またはダイゼイン (150 mg/kg飼料, D) 飼料を与えた。

実験1: 雌ラットを搬入後、2群に分け、C飼料またはD飼料を7日間与えた。糞および尿を解剖前24時間採取した。尿は、その腐敗を防ぐため、アジ化ナトリウム水溶液 (6 mg/sample) を添加した。解剖では、肝臓、胆汁、血液を採取した。飼料および飲料水は自由摂取させた。各サンプルの総ダイゼインおよび総エクオール濃度を測定した。

実験2: 雌ラットを2群に分け、C飼料またはD飼料を与えた。実験1と同様に糞および尿を採取した。解剖は、試験飼料を与えてから1, 2, 3, 5日目に行い、胆汁および血液を採取した。各サンプルの総エクオール濃度を測定した。

実験3: 雌雄ラットをそれぞれ2群に分け、C飼料またはD飼料を与えた。解剖は、試験試料を与えてから18日目に行い、胆汁を90分間採取した。胆汁中の遊離型および抱合型のエクオール濃度を測定した。

実験4: 胆汁を回収する雌ドナーラットを2群に分け、C飼料またはD飼料 (300 mg/kg飼料) を14日間与えた後、胆汁を90分間採取した。次に、新たに飼育した雌ラットの十二指腸にカテーテルを設置した。回復後、ドナーから回収した胆汁を12時間注入した (0.9 mL/時、胆汁エクオール濃度: 1,389 μ M)。注入は暗期に行い、その間飼料摂取量を測定した。注入完了後、小腸上部粘膜を採取し、食欲抑制因子の1つであるコレシストキニンのmRNA発現量を測定した。

実験結果は各群の平均値 \pm 標準誤差で表した。各データの統計処理は、unpaired *t*-testを用い比較した。 $p < 0.05$ をもって有意とした。血液中および胆汁中のエクオール濃度と飼料摂取量の相関関係は、線形回帰分析を用い解析した。

結果と考察

我々の過去の研究¹⁾や他の研究³⁾と同様に、実験1、2および3において、ダイゼイン摂取による雌特異的な飼料摂取量低下、それに伴う体重増加量低下および白色脂肪組織重量減少作用が見られた。

実験1では、ダイゼインおよびエクオールの体内動態について調査した。ダイゼインを摂取した雌ラットでは、エクオールが胆汁中および糞中に多く存在したが、血液中および尿中にほとんど存在しなかった (Table 1)。このことから、エクオールは小腸から吸収されるが、その多くは体循環へは入らず、腸肝循環を繰り返す間に小腸に蓄積され、最終的に糞中に排泄されることが示唆された。また、胆汁中エクオール量と飼料摂取量に有意な負の相関関係が見られたが、血液中エクオール量と飼料摂取量に相関関係は見られなかった (Fig. 1)。これらのことから、胆汁中、すなわち腸肝循環しているエクオールが食欲抑制効果の発現に関与していることが示唆された。

Table 1. Distribution of daidzein and equol in rats fed daidzein diet¹ (Experiment 1)

	Serum	Bile	Liver	Urine	Feces
	(μ M)	(μ M)	(μ mol/Liver)	(μ mol/day)	(μ mol/day)
Daidzein	ND	61 \pm 18	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	1.37 \pm 0.21
Equol	4.07 \pm 1.13	2,342 \pm 224	0.29 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	1.85 \pm 0.16

¹Rats were fed the diet including daidzein (150 mg/kg diet) diets for 7.5 days. Each value represents the mean \pm SEM, n=5-6.

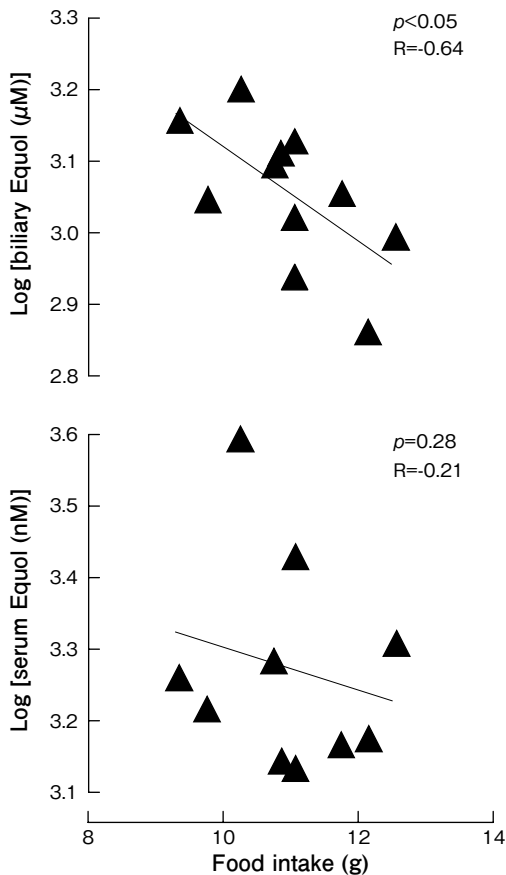


Fig. 1. Correlation between serum or biliary equol concentrations and food intake in rats fed daidzein diet (Experiment 1).

実験1において、腸肝循環エクオールの蓄積が示唆されたため、実験2では、腸肝循環エクオールの経時的変動について調査した。ダイゼインを摂取した雌ラットでは、胆汁中エクオール濃度が3日間かけて上昇した (Table 2)。ダイゼイン飼料による食欲抑制効果も3日目以降で見られることから、エクオールの腸肝循環プールの拡大が食欲抑制効果の発現に重要であることが示唆された。食欲抑制効果の発現に必要な胆汁中エクオール濃度は、約1,000 μM であることが推測された。

実験3では、腸肝循環エクオールの抱合代謝比率の雌雄差について調査した。興味深いことに、雌ラットの胆汁中の総エクオール濃度、遊離型エクオール濃度、および抱合型エクオール濃度は雄のそれらに比較して有意に高い値を示した (Fig. 2)。今回の検討において、ダイゼインによる食欲抑制効果の発現での雌雄差に肝臓または小腸における抱合代謝の雌雄差が影響を及ぼ

Table 2. Daily changes in the distribution of equol in rats fed daidzein diet¹ (Experiment 2)

	Serum	Bile	Urine	Feces
	(μM)	(μM)	($\mu\text{mol/day}$)	($\mu\text{mol/day}$)
Day 0.5	0.48 \pm 0.07	277 \pm 27	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Day 1.5	0.85 \pm 0.11	709 \pm 56	0.17 \pm 0.02	0.33 \pm 0.06
Day 2.5	1.71 \pm 0.29	1,035 \pm 65	0.31 \pm 0.04	1.58 \pm 0.19
Day 4.5	1.74 \pm 0.16	971 \pm 87	0.61 \pm 0.05	3.76 \pm 0.73

¹Rats were fed the diet including daidzein (150 mg/kg diet) diets for 1, 2, 3 and 5 days. Each value represents the mean \pm SEM, n=6.

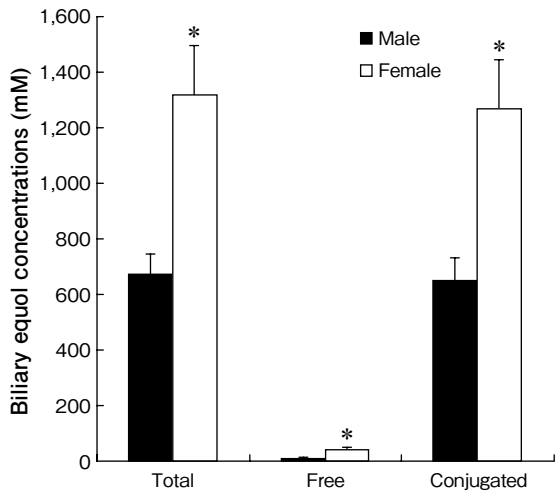


Fig. 2. Total, free and conjugated equol concentrations in bile in male and female rats fed daidzein diet (Experiment 3). *significant difference between male and female ($p < 0.05$), n=6.

しているかどうかは明らかにならなかった。予想外に、雄ラットの遊離型エクオールはほとんど無く、腸肝循環する遊離型エクオールが食欲抑制効果の作用物質であるかもしれない。エクオールは、雄では主に硫酸抱合体、雌では主にグルクロン酸抱合体に抱合代謝されること報告されている。雄ではUDPグルクロナシルトランスフェラーゼおよびグルタチオンS-トランスフェラーゼが多く発現し、雌ではキノンレダクターゼが多く発現するという報告⁴⁾があり、第II相代謝酵素発現の雌雄差が抱合代謝の雌雄差に影響していると考えられる。したがって、グルクロン酸抱合型エクオールが雌特異的な食欲抑制効果を引き起こしている可能性は否定できていない。硫酸型とグルクロン酸型ではエストロゲン活性が異なるという報告⁵⁾もあり、今後、ダイゼイン摂取時のそれぞれの抱合型エクオール濃度についても調べる必要がある。

実験4では、雌の胆汁中に食欲抑制効果の作用物質が存在するかどうかを調査した。ダイゼイン飼料を摂取した雌ドナーラットから回収した胆汁を、別の雌ラットに12時間注入したところ、注入期間の後半6時間で、コントロール飼料を摂取した雌ドナーラットの胆汁を注入したラットと比較して、飼料摂取量が有意に低下した (Fig. 3)。また、ダイゼイン群の胆汁を注入したラットでは、コントロール群の胆汁を注入したラットと比較して、小腸上部コレシストキニン遺伝子発現量が有意に上昇した (Fig. 3)。これらの結果より、おそらくエクオールであるが、腸肝循環している胆汁に含まれる物質が小腸上部に作用し、食欲抑制効果を誘導することが示唆された。

本研究により、雌特異的な食欲抑制効果は腸肝循環する遊離型エクオールが蓄積することにより引き起こされることが示唆された。しかしながら、雌に特異的なエクオール受容体あるいはエクオール抱合型の食欲抑制効果への関与の可能性は残されたままである。今後は、遊離型エクオールの作用部位の特定および硫酸抱合型およびグルクロン酸抱合型のエクオール定量を行い、ダイゼインの食欲抑制効果のさらなる機構解明を行う予定である。

要 約

本研究では、雌特異的なダイゼインの食欲抑制効果の機構を解明するために雌ラットを用いて、血液、胆汁、肝臓、尿および糞に含まれるエクオール濃度を測定し、エクオールの体内分布を調べた。ダイゼイン飼料を摂取したとき、エクオールが胆汁および糞に多く存在したことから、エクオールは腸肝循環しながら体内に蓄積することが示唆された。雌雄ラットを用いて、胆汁に含まれる遊離型および抱合型のエクオール濃度を測定し、食欲抑制効果の作用物質の特定を試みたところ、雌の遊離型および抱合型エクオールは雄のそれと比較して多く存在した。雄の遊離型エクオールはほとんど存在しなかった。このことはエクオールの抱合代謝に雌雄差があることを示しており、遊離型エクオールが食欲抑制効果に重要な物質であるかもしれない。ダイゼインを摂取した雌ドナーラットの胆汁を別の雌ラットに注入すると飼料摂取量が低下した。ダイゼインを摂取した雌ラットの胆汁中に食欲抑制効果の鍵となる物質が含まれることが示唆された。以上のことから、腸肝循環で蓄積した遊離型エクオールが小腸上部に作用し、食欲抑制効果が引き起こされる可能性が示された。

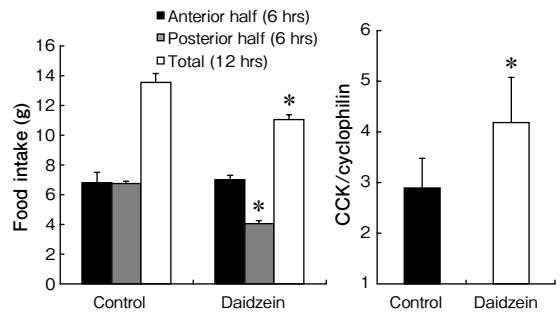


Fig. 3. Food intake and CCK mRNA expression in female rats infused bile of donor female rat fed daidzein diet (Experiment 4). *significant difference between control and daidzein group ($p < 0.05$), $n = 6$.

文 献

- 1) Kishida T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A and Ebihara K (2008): Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy. *Obesity* (Silver Spring), **16**, 290-297.
- 2) Bayer T, Colnot T and Dekant W (2001): Disposition and Biotransformation of the Estrogenic Isoflavone Daidzein in rats. *Toxicol Sci*, **62**, 205-211.
- 3) Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D and Wuttke W (2007): Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause*, **14**, 925-932.
- 4) Zhang Y, Song TT, Cunnick JE, Murphy PA and Hendrich S (1999): Daidzein and genistein glucuronides *in vitro* are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr*, **129**, 399-405.
- 5) Froyen EB, Reeves JL, Mitchell AE and Steinberg FM (2009): Regulation of phase II enzymes by genistein and daidzein in male and female Swiss Webster mice. *J Med Food*, **12**, 1227-1237.