

エストロゲン代謝変更因子としてのイソフラボン

海老原清*・岸田太郎・別府真美

愛媛大学農学部

Isoflavones as Modifier of Estrogen Metabolism

Kiyoshi EBIHARA, Taro KISHIDA and Mami BEPPU

Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790-8566

ABSTRACT

The effect of soy isoflavone on the cytochrome P-450 content of the hepatic microsomes and estrogen metabolism were studied. Most of the daidzin and genistin in soybean meal (SBM) were converted into the respective aglycones, daidzein and genistein, by fermentation with *Aspergillus awamori*. In experiment 1, ddy mice were fed isonitrogenous test diets with one of the following four protein sources for 28 d: casein, SBM, fermented and freeze-dried SBM (FSBM-FD), or methanol-extracted FSBM-FD (FSMB-FD-R). The cytochrome P-450 content was significantly higher in the mice fed the FSBM-FD diet than the respective value in mice fed the other test diets. In experiment 2, ddy mice were fed one of eight diets which contained different levels of aglycone obtained by varying the proportion of FSBM-FD and FSBM-FD-R, for 28 d. The cytochrome P-450 content in hepatic microsomes increased as the dietary level of isoflavonoid aglycones increased, but there was a saturation phenomenon. In experiment 3, ovariectomized C3H-HeJ mice fed one of the following four test diets for 16 days: casein diet (C diet), C + E₂ (1 mg/kg diet) (E₂ diet), E₂ diet + genistein (100 mg/kg diet) (G100 diet) or E₂ diet + genistein (200 mg/kg diet) (G200 diet). G100 and G200 diets did not have effects upon the 2-OHE₁ to 16 α -OHE₁ ratio. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 88-93, 1999.

Key words : isoflavones, cytochrome P-450, estrogen metabolism

大豆は栄養価の高い食品であると同時に生理活性を有する各種の化合物（レシチン、イソフラボンなど）を含んでいる。大豆中ではイソフラボンはグリコシドとして存在する。しかし、大豆の発酵食品である味噌やテンペなどではそのほとんどがアグリコンとして存在する¹⁾。味噌がラットの肝薬物代謝系に促進的に働

くことが報告されている¹⁾。フラボノイドの薬剤相互作用については知られており、P-450の関与が明らかにされている²⁾。P-450には、(1)ステロイドホルモンの生合成、(2)胆汁酸の生合成、(3)活性型ビタミンD₃の生合成、(4)アラキドン酸カスケード、(5)薬物代謝などの生理機能のあることが知られている。

大豆に含まれているイソフラボンが前立腺がんや乳がんの発症を抑制する可能性が示されている^{3,4)}。効果

*〒 790-8566 松山市樽味 3-5-7

を発現する機構については、現在のところ確定的ではないが、(1)エストロゲンに対するアンタゴニストとしての作用、(2)エストロゲン代謝に関与するシトクローム P-450 を誘導して活性なエストロゲンの生成を抑制する、(3)チロキシナーゼ活性の阻害、(4)性ホルモン結合グロブリンの合成を促進して、遊離エストロゲンを減少させる結果、エストロゲン作用を弱める、(5)2-OHE₁/16 α -OHE₁ 比の低下⁵⁾ などが考えられている。イソフラボングリコシドは大腸内で腸内細菌により脱抱合を受け、アグリコンになって吸収される。

そこで、本研究ではシトクローム P-450 の誘導に対する大豆イソフラボングリコシドとアグリコンとの比較、シトクローム P-450 の誘導に対する大豆イソフラボンアグリコンの用量応答、乳がん発症と関わりのある 2-OHE₁/16 α -OHE₁ 比の変動に対する大豆イソフラボンアグリコンの影響について検討した。

方 法

実験1：肝シトクローム P-450 の誘導に対するグリコシドとアグリコンとの比較

実験動物には ddy 雄マウス（4 週齢）を用い、1 週間市販の固形飼料で飼育し、飼育環境に馴化させた後、カゼイン飼料（Casein 飼料）、脱脂大豆粉末飼料（SBM 飼料）、*Aspergillus awamori* で発酵処理し、グリコシドのほとんどをアグリコンに変換した脱脂大豆粉末（ニチモウ（株）より供与）飼料（FSBM 飼料）、FSBM を 80% メタノールで脱イソフラボン処理した発酵脱脂大豆粉末飼料（FSBM-R 飼料）の 4 群（1 群 8 匹）に分けた。実験飼料の組成は Table 1 に示した。飼料中のたん白質および糖質量は飼料間で差のないようにした。実験飼料で 28 日間飼育後、断頭にて屠殺し、その後直ちに肝臓を摘出した。シトクローム P-450 の測定は Omura and Sato の方法⁶⁾ に、ミクロソームのたん白質量は Lowry らの方法⁷⁾ に従った。

実験2：肝シトクローム P-450 の誘導に対するアグリコンの用量応答

実験動物には ddy 雄マウス（4 週齢）を 1 週間固形飼料で飼育し、飼育環境に馴化させた後、8 群（1 群 8 匹）に分け、FSBM と FSBM-R との混合比を変えることによりアグリコン量の異なる 8 種類の飼料（33, 101, 168, 235, 302, 370, 437, 505 mg/kg diet）のいずれか

Table 1. Composition of test diets¹

Component	Group			
	Casein ² diet	SBM ³ diet	FSBM-FD ⁴ diet	FSBM-FD-R ⁵ diet
	g/kg			
Casein	200	—	—	—
SBM	—	334	—	—
FSBM-FD	—	—	329	—
FSBM-FD-R	—	—	—	382
Mineral mixture ⁶	35	35	35	35
Vitamin mixture ⁶	10	10	10	10
Corn oil	50	50	50	50
Sucrose	200	200	200	200
Corn starch	505	371	376	323

¹ The SBM, FSBM-HD, FSBM-FD and FSBM-FD-R diets were isonitrogenous with the Casein (200 g casein/kg) diet. SBM, FSBM-FD and FSBM-FD-R contained 85.3, 85.4, 86.7 and 74.7 g nitrogen/100 g, respectively.

² Purchased from New Zealand Dairy Board, Wellington, New Zealand. Casein contained 142.2 g nitrogen/kg.

³ SBM, soy bean meal.

⁴ FSBM-FD, fermented and freeze-dried soy bean meal.

⁵ FSBM-FD-R, FSBM-FD extracted with 800 mL methanol/L.

⁶ Based on AIN-76 (1977). Vitamin mixture used here contained 200 g choline bitartrate/kg.

を与えた。たん白質含量は飼料間で差のないようにした。実験飼料で28日間飼育後、断頭にて屠殺し、その後直ちに肝臓を摘出した。シトクローム P-450 の測定は Omura and Sato の方法⁶⁾ に、ミクロソームのたん白質量は Lowry らの方法⁷⁾ に従った。

実験 3：2-OHE₁/16 α -OHE₁ 比の変動に対する大豆イソフラボンアグリコンの影響

実験動物には C3H-HeJ 雌マウス (8 週齢) を用い、1 週間市販の固形飼料で飼育し、飼育環境に馴化させた後、5 群 (1 群 6 匹) に分け、4 群に卵巣摘出手術、1 群に擬手術を行った。擬手術群にはカゼインをたん白質源とする対照飼料 (C diet) を、卵巣摘出群には対照飼料、対照飼料に 16 β -estradiol (1 mg/kg diet) を添加した飼料 (E₂ diet)、E₂ diet に genistein とし飼料 1 kg 当たり 100 mg または 200 mg 加えた飼料 (G100 diet または G200 diet) を 16 日間与えた。実験最終日に肝臓を摘出し、直ちに肝ミクロソームを調製した。この肝ミクロソームを 16 β -estradiol 含む溶液に加えて 37℃ にて 10 分間反応させた。この溶液中の 16 β -estradiol 代謝物 (E₁, E₃, 2-metoxystosterone, 16 α -OHE₁) を HPLC にて測定した。

結果と考察

肝シトクローム P-450 の誘導に対する大豆イソフラボンの影響

肝臓重量およびミクロソーム中のたん白質含量は群間に差は認められなかった。肝シトクローム P-450 量は Casein 飼料群に比べ SBM 飼料群で有意に多く、SBM 飼料群に比べ FSBM 飼料群で有意に多かった。しかし、FSBM-R 飼料群の肝シトクローム P-450 量は

SBM 飼料および FSBM 飼料群のそれらに比べ有意に少なく、Casein 飼料群と同程度であった (Table 2)。肝シトクローム P-450 量は飼料中のアグリコンの量が多くなるにつれて増加したが、飽和現象が認められた (Fig. 1)。これらの結果は、肝シトクローム P-450 の誘導に大豆イソフラボンが関与しており、誘導はグリコシドよりもアグリコンの方が強いことを示している。アグリコンは小腸から直接吸収されるが⁸⁾、グリコシドは腸内細菌によってアグリコンに変換されてから吸収される⁹⁾。それゆえ、アグリコンはグリコシドよりも容易に吸収されるようである¹⁰⁾。Sariaslani and Kunz¹¹⁾ は genistein の摂取が大豆粉末よりも急速に、

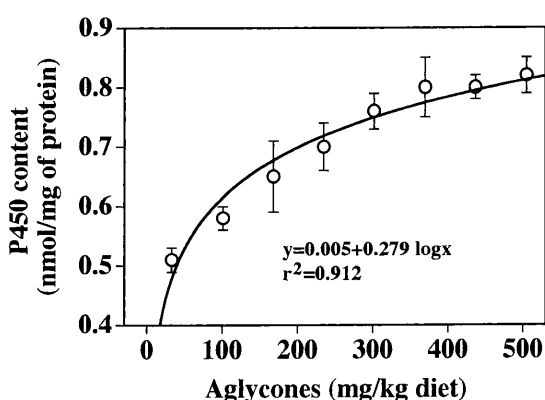


Fig. 1. Relationship between the cytochrome P450 content of the hepatic microsomes and the dietary level of isoflavonoid aglycones. Mice were fed one of eight tests diets which contained different levels of aglycone obtained by varying the proportion of FSBM-FD and FSBM-FD-R, for 28 d. Values are means $\pm$ SEM, $n=8$. The relationship can be described as $y=0.050+0.279 \log x$ ($r^2=0.912$).

Table 2. Cytochrome P-450 content of the hepatic microsomes of male std : ddy mice after 28 d of consuming the casein, SBM, FSBM-FD or FSBM-FD-R diet¹ (Experiment 1)

Group	Liver weight	Microsomal protein	Cytochrome P450	
	g	mg $\cdot$ g ⁻¹ liver	nmol $\cdot$ mg ⁻¹ protein	nmol $\cdot$ g ⁻¹ liver
Casein ² diet	2.07 $\pm$ 0.08	23.0 $\pm$ 1.0	0.42 $\pm$ 0.04 ^a	9.7 $\pm$ 1.2 ^a
SBM ³ diet	1.98 $\pm$ 0.08	26.1 $\pm$ 2.1	0.65 $\pm$ 0.03 ^b	17.1 $\pm$ 1.8 ^b
FSBM-FD ⁴ diet	1.99 $\pm$ 0.11	25.2 $\pm$ 1.1	0.92 $\pm$ 0.05 ^c	23.4 $\pm$ 2.1 ^c
FSBM-FD-R ⁵ diet	1.94 $\pm$ 0.09	24.0 $\pm$ 1.7	0.51 $\pm$ 0.05 ^a	12.3 $\pm$ 1.4 ^a

¹ Values are $\pm$ means SEM, $n=8$. Means in a column not sharing a superscript are significantly different, $P<0.05$.

² See note 2 to Table 1.

³⁻⁵ See notes 3, 4 and 5 to Table 1.

より多くの肝シトクローム P-450 を誘導することを報告している。肝シトクローム P-450 量は吸収されるイソフラボンの量に依存しているかもしれない。FSBM 中のイソフラボンのほとんどがアグリコンであるのに対し、SBM 中のイソフラボンのほとんどはグリコシドであった。FSBM 飼料群に比べ SBM 飼料群において肝シトクローム P-450 量が有意に多かったのは、飼料

中のアグリコン量が FSBM 飼料群で多かったことによるものと考えられる。

2-OHE₁/16 α -OHE₁ 比の変動に対する大豆イソフラボンアグリコンの影響

結果は Fig. 2 に示す。Estrone(E₁)は 2-OHE₁ と 16 α -OHE₁ の 2 つの経路を経て代謝されるが、発がんに 16 α -OHE₁ が密接に関与していることが示唆されてい

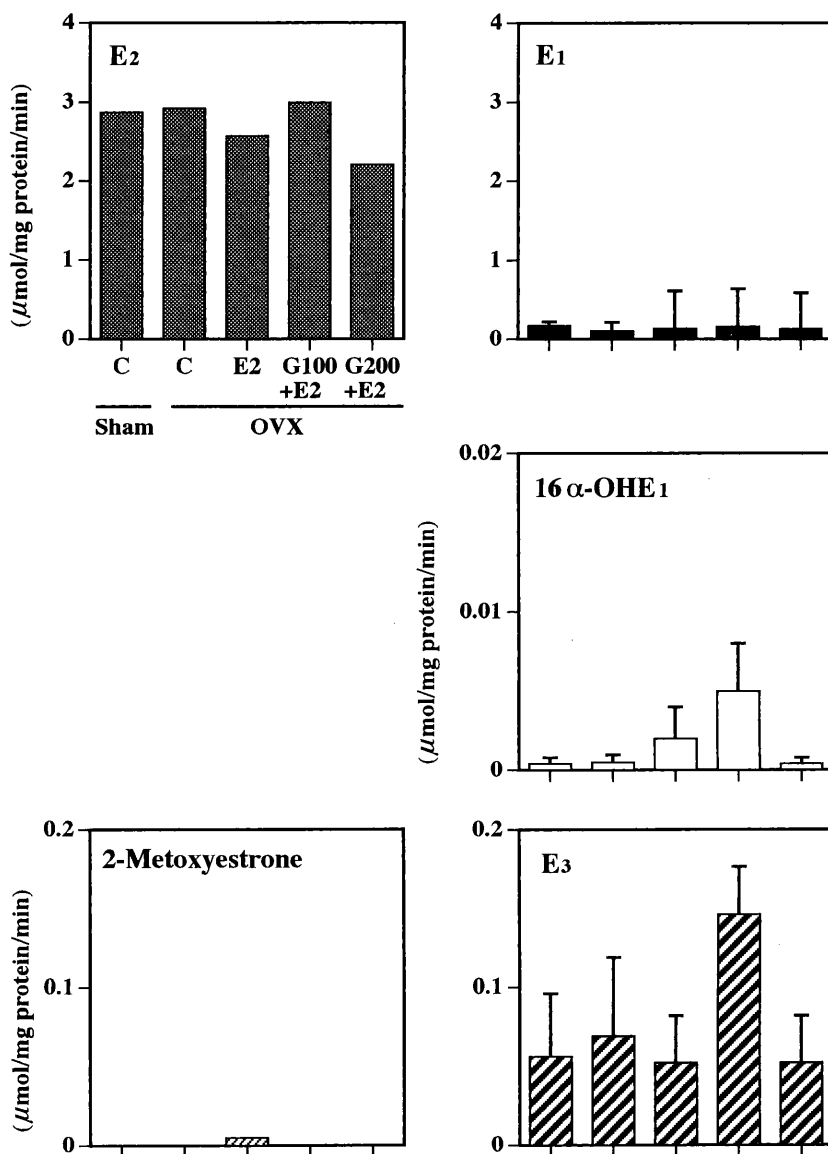


Fig. 2. The change of estradiol (E₂) metabolism by hepatic microsomes in mice fed test diets. Ovariectomized mice were fed one of the following four tests diets for 16 d : casein (C), C + 1 mg E₂/kg diet (E₂), E₂ + 100 mg genistein (E₂ + G100 diet) or E₂+200mg genistein (E₂ + G200 diet). The hepatic microsomes were incubated for 10 min in the solution containing estradiol.

る⁵⁾。すなわち、2-OHE₁/16 α -OHE₁比が高いほど乳がんの発症は抑制される。本実験では、2-OHE₁については測定できなかったため、2-OHE₁/16 α -OHE₁比の変動を直接測定することはできなかったが、2-OHE₁の代謝物である2-metoxystroeneと16 α -OHE₁および16 α -OHE₁の代謝物である estriol (E₃)とを比較すると、2-metoxystroene に比べ16 α -OHE₁ および estriol (E₃)の方が量的には圧倒的に多かった。このことは

genistein には estrone (E₁) を発がん性の低い2-OHE₁への代謝を促進するような効果がなかったことを示している。しかし、本実験では2-OHE₁を測定していない。2-OHE₁から2-metoxystroene への代謝速度が極めて遅いならば、2-metoxystroene が少ないことも理解できる。2-OHE₁の測定、反応条件などの検討を含め今後の更なる検討が必要である。

要 約

肝ミクロソーム中のシトクローム P-450 量およびエストロゲン代謝に及ぼす大豆イソフラボンの影響を検討した。*Aspergillus awamori* で発酵処理することにより脱脂大豆中のイソフラボングリコシドは対応するアグリコンにほとんどが転換された。脱脂大豆 (SBM) 飼料を与えられたマウスのシトクローム P-450 量はカゼイン飼料を与えられたマウスのそれよりも有意に多く、凍結乾燥処理した発酵大豆 (FSBM-FD) 飼料を与えられたマウスのシトクローム P-450 量は SBM 飼料を与えられたマウスのそれよりも有意に多かった。しかし、脱イソフラボン処理をした発酵大豆 (FSBM-FD-R) 飼料を与えられたラットのシトクローム P-450 量はカゼイン飼料を与えられたマウスのそれと有意差がなかった。FSBM-FD と FSBM-FD-R を組み合わせ、飼料中のイソフラボンアグリコン量を段階的に変えた飼料をマウスに与えると、飼料中のイソフラボンアグリコン量が増えるにつれてシトクローム P-450 量は増加したが、飽和現象が認められた。2-OHE₁/16 α -OHE₁ 比に及ぼす影響をカゼイン飼料、これに estradiol を飼料 1 kg あたり 1 mg 添加した飼料 (E₂ diet)、E₂ diet に genistein として飼料 1 kg あたり 100 mg または 200 mg 加えた飼料 (G100 diet または G200 diet) を 16 日間与えた卵巣摘出マウスから調製した肝臓ミクロソームを estradiol を含む溶液中で反応させ検討したが、変動は認められなかった。

文 献

- 1) 飯樋洋二, 高橋信江, 岩間昌彦, 菅家祐輔 (1992): ラット肝薬物代謝系に及ぼす味その影響. 食品衛生学雑誌, **33**, 17-22.
- 2) 吉川敏一 (1998): フラボノイドの副作用. 「フラボノイドの医学」, 吉川敏一編, 講談社サイエンティフィク, 東京, pp. 170-176.
- 3) Barnes S (1995): Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, **125**, 777S-783S.
- 4) Peterson G (1995): Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr*, **125**, 784S-789S.
- 5) Michnovicz JJ and Bradlow HL (1994): Dietary cytochrome P-450 modifiers in the control of estrogen metabolism. In: *Food Phytochemicals I: Fruits and Vegetables*. American Chemical Society, pp. 283-292.
- 6) Omura T and Sato R (1964): The carbon monoxide binding pigment of liver: Evidence for its hemoprotein nature, solubilization, purification and properties. *J Biol Chem*, **239**, 2370-2379.
- 7) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-272.
- 8) Slavin JL, Karr SC, Hutchins AM and Lampe JW (1998): Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1492S-1495S.
- 9) Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C and Remesy C (1996): Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxoflavonoids. *Nutr Res*, **16**, 517-544.
- 10) Hutchins AM, Slavin JL and Lampe JW (1995): Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan

excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc*, **95**, 545-551.

11) Sariaslani FM and Kunz DA (1986) : Induction of

cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus* by soybean flour. *Biochem Biophys Res Commun*, **141**, 405-410.