

大豆イソフラボン-アグリコン摂取による脂質代謝調節および抗酸化機能の追究：
性別による調節作用の違い

長田恭一*・川上祐生・清澤朋子

弘前大学農学生命科学部

Function of Lipid Metabolism and Antioxidative Activity of Dietary Soybean Isoflavone Aglycone: Differences in Regulative Function between Male and Female Rats

Kyoichi OSADA, Yuki KAWAKAMI and Tomoko KIYOSAWA

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Hirosaki 036-8561

ABSTRACT

The regulative effects of aglycone (a soy isoflavone) on lipid metabolism and antioxidative function in male vs. female rats were examined in young and old Sprague-Dawley rats. Immature (4 wk) and mature (8 mo) male and female rats were fed either a diet containing a 0.1% isoflavone-aglycone rich powder or an isoflavone-free diet for 24 days. Hepatic antioxidative activities were higher in rats fed isoflavone vs. isoflavone-free diets in both sexes. Feeding isoflavones resulted in lower levels of lipid peroxide in immature male rats fed isoflavones, and decreased liver and serum peroxide concentrations in mature rats of both sexes. Liver and serum triglyceride concentrations were lower in all rats fed isoflavones, especially in the mature females. Tissue cholesterol concentrations were also lower in all rats fed isoflavones. Thus, dietary aglycone may enhance the biological antioxidative system when fed over the long-term, regardless of age or sex. Based on our observations, the regulation of lipid metabolism by dietary isoflavone may be more effective in female than in male rats. The residence time of isoflavone-metabolites derived from dietary soy isoflavones may be a factor in our observations. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 108-115, 2003.

Key words : isoflavone, aglycon, lipid metabolism, antioxidation, sex, rat

*〒036-8561 弘前市文京町3

大豆および大豆に含まれる種々の成分の生理機能、とくに、健康維持あるいは増進に貢献する作用は多岐にわたり、多くの生理活性が明らかにされている。中でも、大豆イソフラボン類の有効機能に関する研究は多く、とくに、骨代謝との関係、抗がんあるいはエストロゲン様作用等に焦点が当てられている¹⁻³⁾。しかし、摂取した大豆イソフラボン類が脂質代謝に与える直接的影響や生体内での抗酸化強化作用等はまだ不明な部分が多く、対象がヒトか実験動物、実験動物の種類による結果の相違が多く、その情報は混沌としている。最近、性別によって大豆イソフラボン類の吸収および生体内での滞留時間が異なる可能性が動物実験により指摘されている⁴⁾。雌では加齢に伴い、エストロゲンが減少することが知られている。イソフラボンは、その構造の類似性からエストロゲン様作用を示すため、雌雄間での生理作用が異なるのではないかと予想される。本研究では、性別ならびに年齢の異なるラットにイソフラボンを摂取させ、性別ならびに加齢による脂質代謝および抗酸化機能の変動に対するイソフラボンの摂取効果を比較検討した。

方 法

動物実験

4週齢あるいは8ヶ月齢のSprague-Dawley (SD) 系雌雄のラットを市販の固形飼料で1週間飼育した後、AIN93G純化飼料に、イソフラボン-アグリコン高含有粉末SoyActを0.3%添加（対照群は無添加）した飼料を24日間与えた。なお、飼料に用いたSoyActのイソフラボン濃度は、ダイゼイン13.0%、ゲニステイン16.6%、グリシテイン2.9%からなり、32.5%のイソフラボンを含むものであった。

飼育終了後、腹部大動脈より採血死させた後、血液ならびに組織を採取し、肝臓と血清の脂質代謝および抗酸化システム諸パラメータを測定した。さらに飼育期間中に糞を採取し、排泄された糞中ステロイド量を測定した。

肝機能への影響

肝機能の指標として、glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、glutamic pyruvic transaminase (GPT) および乳酸脱水素酵素 (LDH) の各レベルを市販測定キットを用いて測定した。

抗酸化酵素活性

抗酸化酵素活性は、血液より調製した赤血球のパンク溶液を用いてカタラーゼ (CAT) およびグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) およびスーパーオ

キサイドディスムターゼ (SOD) 活性を測定した。一方、肝臓はミトコンドリア画分とサイトゾル画分を調製した後に、CAT、GSH-Px、SOD、グルタチオンレダクターゼ (GSSG-R) ならびにグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性を測定した。

その他の諸パラメータ分析

組織抗酸化諸パラメータは、血清と肝臓の過酸化脂質濃度はHPLC分析法⁵⁾に従ってチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 濃度として測定した。一方、血清と肝臓の α -トコフェロール濃度はHPLC分析法⁶⁾で測定した。脂質代謝諸パラメータは、血清と肝臓の各脂質濃度、肝臓のコレステロール生成と異化、およびリノール酸不飽和化律速酵素活性を既報⁷⁾に従って測定した。ゲニステインの血中濃度は、血清より抽出し、Nurmi et al.の方法⁸⁾に準じてHPLC-電気化学検出 (ECD) 法で測定した。糞中に排泄されたゲニステイン排泄濃度は、エタノール抽出後、HPLC-ECD法で測定した。

統計処理

得られた結果の有意差はSuper ANOVAを用いた2元配置分散分析により検定した。

結 果

動物実験

飼育後のラットグロースパラメータは、食餌摂取量の低い雌に合わせるペアフィーディングを行ったために、成熟群では体重は減少した。肝臓重量は雌の場合、イソフラボン摂取群が高い傾向にあった。

肝機能指標

血清のGOT、GPTおよびLDHレベルには大きな差は見られず、イソフラボン摂取でGOTレベルは低くなる傾向も認められ、イソフラボン摂取による肝機能障害は認められなかった。

抗酸化酵素活性

肝臓と赤血球のSOD活性は、成熟群では大きな差はなかったが、未成熟群のイソフラボン摂取群では活性が高い傾向にあり、とくに、雄の肝臓サイトゾル画分と赤血球SOD活性はイソフラボン摂取で有意に高くなった (Fig. 1)。肝臓と血球のCAT活性は、成熟群では大きな差はなかったが、未成熟群では、イソフラボン摂取群が高い傾向にあり、とくに、雌のサイトゾル画分ではイソフラボンの摂取により有意に高くなった。さらに、肝臓と赤血球GSH-Px活性は、成熟群では大きな差はなかったが、未成熟群のイソフラボン摂取群では活性が高い傾向にあり、とくに、雌の赤血球

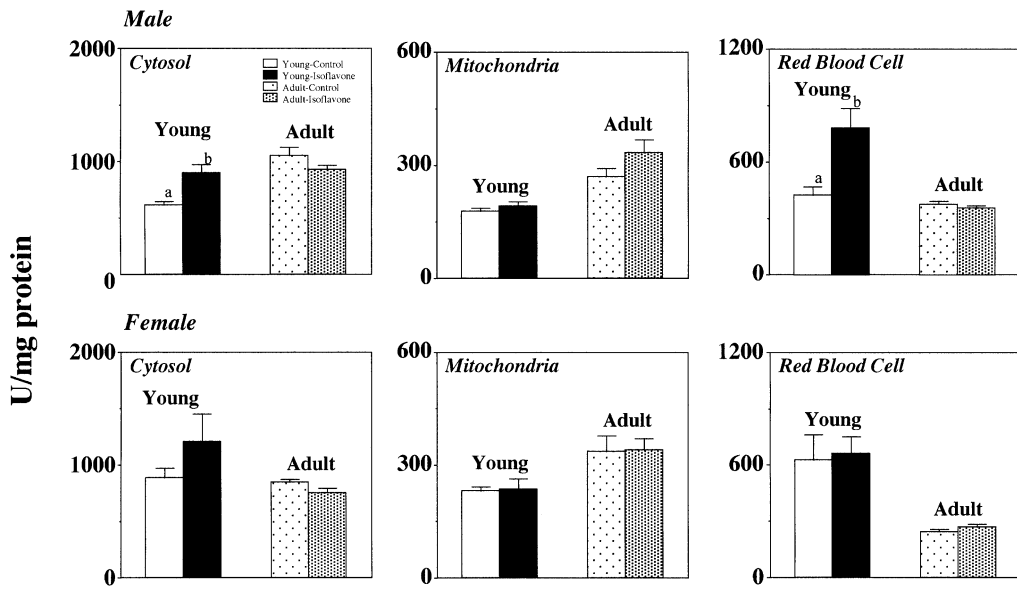


Fig. 1. Effects of dietary soy isoflavone on superoxide dismutase activity of liver and red blood cells in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations: Control, rats fed isoflavone-free diet; Isoflavone, rat fed 0.1% isoflavone added diet.

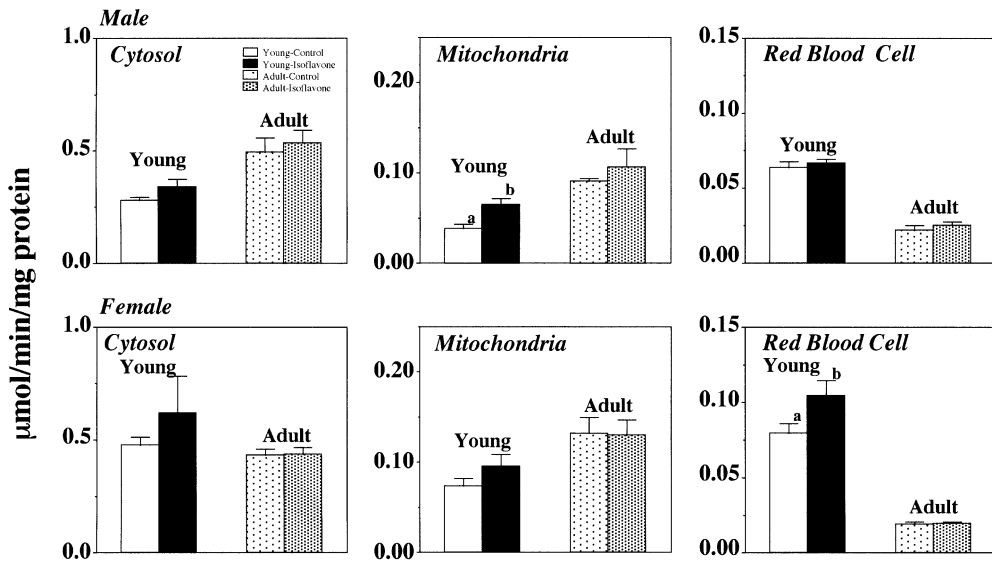


Fig. 2. Effects of dietary soy isoflavone on glutathione peroxidase activities of liver and red blood cells in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations are the same as in Fig. 1.

GSH-Px活性はイソフラボン摂取で高くなった (Fig. 2)。肝臓GSSG-R活性は、雄では大きな差はなかったが、未成熟群の雌では、イソフラボンの摂取により非摂取の場合と比べて高くなった。肝臓GST活性は、未成熟群では、イソフラボン摂取群が高い傾向にあった。

組織過酸化脂質濃度

肝臓と血清の過酸化脂質 (TBARS) 濃度は、イソフラボンの摂取で低くなる傾向にあり、とくに、血清TBARS値は、未成熟群の雄と成熟群の雌の場合、イソフラボン摂取群が有意に低くなった (Fig. 3)。

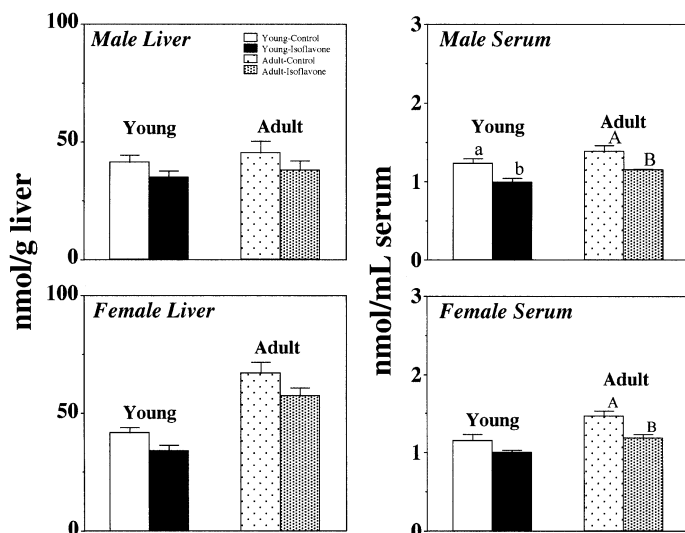


Fig. 3. Effect of dietary soy isoflavone on the levels of liver and serum TBARS values in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations are the same as in Fig. 1.

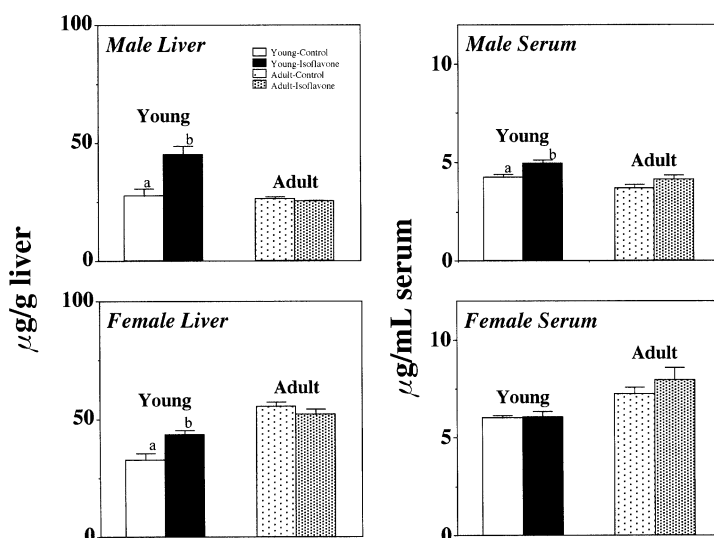


Fig. 4. Effects of dietary soy isoflavone on the levels of liver and serum α -tocopherol in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations are the same as in Fig. 1.

ビタミンE濃度

肝臓ビタミンE濃度は、未成熟群では、雌雄いずれもイソフラボンの摂取により高くなったが、血清では大きな差はなかった (Fig. 4).

脂質代謝酵素活性

Cholesterol 7 α -hydroxylase活性は、雌雄間で差があり、雄よりも雌の方が高くなった。また、対照群と比べて、イソフラボン摂取群の活性は高い傾向にあった。

脂質成分

肝臓脂質濃度を測定した結果、TG濃度は、イソフラボン摂取群は低くなる傾向にあり、とくに、雌では成熟、未成熟両群いずれもイソフラボン摂取群は低くなった。総コレステロール濃度は、成熟群では、イソフラボン摂取群が低くなる傾向にあり、とくに、雄では有意に低下した (Fig. 5).

血清脂質濃度は、TG濃度は、イソフラボンの摂取

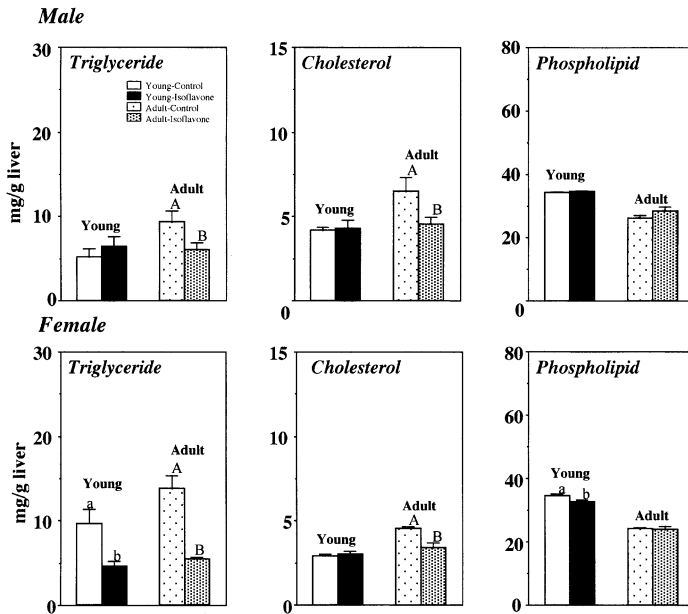


Fig. 5. Effects of dietary soy isoflavone on the levels of liver lipids in Rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations are the same as in Fig. 1.

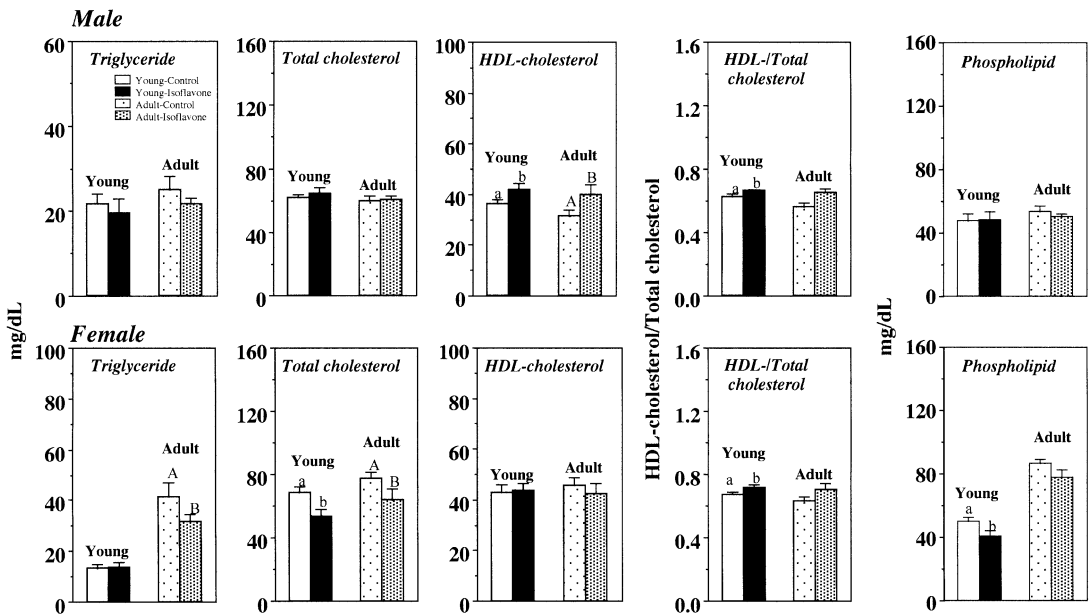


Fig. 6. Effects of dietary soy isoflavone on the levels of serum lipids in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA). Abbreviations are the same as in Fig. 1.

で低くなる傾向にあり、とくに、成熟群の雌ではイソフラボン摂取群が有意に低くなった。総コレステロール濃度は、成熟群および未成熟両群ともに雌の場合、対照群と比べて、イソフラボン摂取群は低くなった。

また、HDL-cholesterol/total cholesterolの比率は、成熟群では明確な差はなかったが、未成熟群では、イソフラボン摂取群が高くなった (Fig. 6)。

各組織脂肪酸組成を調べ、 $\Delta 6$ desaturation indexを

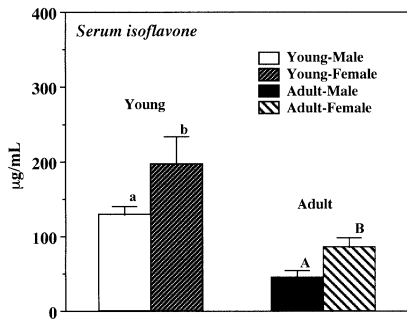


Fig. 7. Effect of dietary soy isoflavones on the levels of serum isoflavones in rats. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 rats in each group. ^{ab}Values without a common superscript letter in each group are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA).

算出したところ、雌では、対照群よりもイソフラボン摂取群が低くなる傾向にあった。

糞中ステロイド排泄量

糞中への酸性ステロイド排泄レベルは、対照群と比べてイソフラボン摂取群は高い傾向にあった。また、糞中への中性ステロイド排泄レベルは、対照群はイソフラボン摂取群よりもコプロスタノール排泄濃度が高く、イソフラボン摂取群は対照群よりもコレステロール排泄濃度が高くなった。

血清中のイソフラボン濃度

血清中のイソフラボン濃度は、未成熟群および成熟群の両群ともに、雄よりも雌の方が高くなった (Fig. 7)。

考 察

高濃度のイソフラボン摂取による肝臓萎縮や肥大は認められず、肝機能障害はなかったため、イソフラボンの積極的摂取については問題ないものと考えられた。

抗酸化酵素活性は、成熟群では大きな差はなかったが、未成熟群ではイソフラボン摂取群が高くなる傾向にあった。さらに、赤血球SODおよびGSH-Px活性は成熟群で低くなる傾向を確認した。このように、抗酸化酵素活性は加齢に伴い低下し、生体内の抗酸化システムが弱体化するために、過酸化脂質レベルが上昇するとの報告⁹⁾と一致する結果になった。よって、成熟期に至る前に生体内抗酸化システムをイソフラボンのような抗酸化食品成分の積極的な摂取は、老化防止に有効ではないかと考えられる。生体内のビタミンE濃度を調べた結果、成熟群では、明確ではなかったが、未成熟群のイソフラボン摂取群では非摂取群と比べて

そのレベルは高くなった。このように、成熟群では、未成熟群よりも摂取したイソフラボンの抗酸化強化作用を受けにくいのもかもしれない。また、未成熟群と比べて、成熟群は加齢に伴い抗酸化酵素活性が弱体化している可能性があるため、生体内の過酸化反応進行は成熟群の方が大きいと予想される。この点も考慮しなければならないと思われるが、本研究で得られたTBARS値は成熟度の違いで大きな差はなかった。さらに、リン脂質ヒドロパーオキシドレベルについても測定し、比較検討するべきかもしれない。

肝臓のcholesterol 7 α -hydroxylase活性は、イソフラボン摂取により高くなる傾向にあり、この結果を反映して、糞中への酸性ステロイド排泄量は、イソフラボン摂取により高くなる傾向にあった。この結果は、Greaves et al. のサルを用いた投与実験の結果とは異なった¹⁰⁾。動物種が異なるために生じた矛盾と思われるが、さらなる追試を行う必要がある。

血清脂質レベルは、TG濃度がイソフラボンの摂取で低くなった。とくに、成熟群の雌ではその効果が著しかった。肝臓脂質においてもイソフラボン摂取群のTG濃度は低くなり、とくに、雌ではその効果が大きかった。茶カテキンは、 β 酸化反応を高め、肥満症や冠状動脈心疾患のリスクを減少させると報告されている¹¹⁾。イソフラボン摂取によるTG濃度低下は、 β -酸化系の酵素活性に何らかの影響を及ぼしているためかもしれないが、それについては現在のところ明確な知見はない。また、イソフラボン摂取によるTG濃度低下は、高脂血症や肥満症を予防し、心臓疾患などの疾病のリスクを軽減させる可能性を示唆するものであるが、動物の中には、イソフラボン摂取による影響がない場合もあり、人への応用についてはさらなる研究が必要と思われる。

イソフラボン摂取群の肝臓および血清のコレステロールレベルは低くなる傾向にあった。これは、イソフラボンの摂取により酸性ステロイドの排泄が促進されたため、生体内のコレステロールレベルが低下したのではないかとと思われる。また、糞中に排泄された中性ステロイドは、イソフラボン摂取によりコレステロールからコプロスタノールへの変換が抑制された。これは摂取したイソフラボンが、腸内細菌叢に何らかの影響を及ぼしているためであると思われる。

血清のイソフラボンレベルは成熟度に関わらず、雄と比較して雌の方が高くなった。Chang et al. は、等量のイソフラボンを摂取させた後に肝臓のゲンステインレベルを測定した結果、雄よりも雌の方が高いことを指摘している⁴⁾。すなわち、イソフラボンが女性ホ

ルモンであるエストロジェンと構造が類似しており、雄よりも雌の方が何らかのレセプターを有している、生体に取り込まれやすいのか、あるいは、滞留時間が長くなるためではないかと思われるが、現在のところ、この原因を明確にした知見はない。

以上のように、本研究では、イソフラボン摂取によりラットの生体内抗酸化システムは強化され、その効果は成熟群よりも未成熟群で著しいことが明らかとなったが、雌雄間での差は明確ではなかった。一方、イ

ソフラボンの脂質代謝調節機能を調べたところ、TG濃度とコレステロールレベルは低下する傾向にあった。この効果は、雄と比較して雌の方で顕著であった。これは、雌の場合、生体内にイソフラボンが保持されやすく、かつ、イソフラボンのエストロジェン様作用によって摂取効果が発揮されやすいのではないかと推測している。これらのメカニズム解明については、長期摂取と短期摂取の比較を含めたさらなる研究が必要と思われる。

要 約

大豆イソフラボンの摂取による脂質代謝調節および抗酸化機能について、性別による調節機能の違いとそのメカニズムを追究した。雌雄の4週齢および8ヶ月齢のSD系ラットに、イソフラボンを0.1%添加（対照は無添加）したAIN純化飼料を24日間与えた。肝臓の抗酸化諸酵素活性は、若齢群の場合、雌雄ともにイソフラボン摂取で高くなった。肝臓過酸化脂質濃度は、若齢群の雄の場合、イソフラボン摂取により低くなる傾向にあった。加齢群の場合は、雌雄の肝臓と血清過酸化脂質濃度はイソフラボン摂取で低くなった。血清脂質レベルについては、TG濃度はイソフラボンの摂取で低くなり、とくに、加齢群の雌でその効果が著しかった。同様の傾向が肝臓脂質レベルでも観察された。組織コレステロール濃度は、いずれの場合もイソフラボン摂取で低くなる傾向にあった。以上のように、イソフラボンの長期摂取では、雌雄、加齢に関係なく生体内抗酸化システムは強化され、脂質代謝調節作用は雄よりも雌の方が効果的である可能性が予想された。その原因として、摂取したイソフラボン代謝産物の生体内滞留時間が関係しているものと思われる。

文 献

- 1) Kumar NB, Cantor A, Allen K, Riccardi D and Cox CE (2002): The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer*, **94**, 1166-1174.
- 2) Wietrzyk J, Boratynski J, Grynkiewicz G, Ryczynski A, Radzikowski C and Opolski A (2001): Antiangiogenic and antitumor effects in vivo of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res*, **21**, 3893-3896.
- 3) Mei J, Yeung SS and Kung AW (2001): High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5217-5221.
- 4) Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR and Doerge DR (2000): Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, **130**, 1963-1970.
- 5) Fukunaga K, Suzuki T and Takama K (1993): Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr*, **621**, 77-81.
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎 (1975): 血清中のトコフェロール同族体の高速液体クロマトグラフィーによる定量. *ビタミン*, **49**, 259-263.
- 7) Osada K, Kodama T, Yamada K, Nakamura S and Sugano M (1998): Dietary oxidized cholesterol modulates cholesterol metabolism and linoleic acid desaturation in rats fed high-cholesterol diets. *Lipids*, **33**, 757-764.
- 8) Nurmi T and Adlercreutz H (1999): Sensitive high-performance liquid chromatographic method for profiling phytoestrogens using coulometric electrode array detection: Application to plasma analysis. *Anal Biochem*, **274**, 110-117.
- 9) Cand F and Verdetti J (1989): Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging

rats. *Free Radic Biol Med*, **7**, 59-63.

- 10) Greaves KA, Wilson MD, Rudel LL, Williams JK and Wagner JD (2000): Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr*, **130**, 820-826.
- 11) Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T and Tokimitsu I (2002): Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity : stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1459-1464.