

腸内フローラのイソフラボン代謝変換に及ぼす 大豆ペプチドの影響の解明

田村 基^{*1}・篠原敦子¹・深津智香¹

¹独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Effects of Soy Peptides on Metabolism of Isoflavone by Fecal Flora from Mice

Motoi TAMURA¹, Atsuko SHINOHARA¹ and Tomoka FUKATSU¹

¹National Food Research Institute, Tsukuba 305-8642

ABSTRACT

We investigated the effects of soy peptides on the *in vitro* and *in vivo* equol production from daidzein by fecal flora in mice. In fecal suspension from the mice, equol concentrations were lower in the control fecal suspension than in the fecal suspension supplemented with 2 mg soy peptides HI-NUTE DH per 200 μ L. Male 5-week-old mice were fed a soy peptides-daidzein diet or a casein-daidzein diet for 20 days. In fecal suspension from the mice fed an experimental diet, equol concentrations were significantly higher in the fecal suspension from the mice fed the soy peptides-daidzein diet for 7 and 14 days than in the fecal suspension from the mice fed the casein-daidzein diet for 7 and 14 days. *In vitro* equol productivity from daidzein by fecal flora in mice fed the soy peptides-daidzein diet has increased as the days go by. The plasma equol concentration was significantly higher in the soy peptides-daidzein group. The cecal concentration of equol present as aglycone was significantly greater in the soy peptides-daidzein group. We demonstrate that the ingestion of soy peptides may enhance equol production by having an impact on the metabolic activity of the intestinal microflora. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 110-115, 2008.

Key words : soy peptides, daidzein, equol, mouse

イソフラボンは、大豆に含まれ、種々の生活習慣病予防効果が期待されるフラボノイドの一種である。ダイゼイン (daidzein) やゲニステイン (genistein) は、イソフラボンに属している。味噌や醤油などの大豆製

品では、イソフラボンのアグリコンであるダイゼインやゲニステインの割合が多く、逆に、豆腐では、イソフラボン配糖体の割合が多いことが知られている。配糖体は、そのままの形では消化管から吸収されにくいといった報告もあり、イソフラボンの吸収・代謝には、消化管で常在する腸内フローラ（腸内細菌叢）の役割

*〒305-8642 つくば市観音台2-1-12

が重要であることが示唆されてきている¹⁾。エコール (equol) は、ダイゼイン (daidzein) の腸内フローラの代謝産物の一つである。エコール生産能は、個人差が大きいことが知られている。欧米では、60%~70%程度のヒトでエコール生産能が低いことが報告されている^{2,3)}。エコール生産に關与する腸内フローラの個々人の違いが、これらエコール生産能の個人差を生み出していると考えられている。ヒト試験において、大豆加工食品を摂取したヒトの血漿コレステロールおよび血漿トリグリセリド低下効果が顕著であったのは、エコール生産能が高いヒトであったということが報告されている⁴⁾。また、乳がんリスクの低さとエコール生産量の多さに相関があるという報告⁵⁾やエコール生産能が高い人で男性の前立腺がんのリスクが低いことが報告されていて⁶⁾、心臓血管疾患予防や乳がん、前立腺がん予防と、エコール生産能には、何らかの関連性がある可能性が強く示唆されている。こういったことから、エコール生産に關与する腸内細菌群が、イソフラボン類の機能性発現を含めて、生体内で重要な役割を担っていると思われる。しかし、具体的にどういった腸内細菌が、イソフラボン類代謝変換に關与しているのかに關しての情報は非常に乏しいのが現状である。大豆ペプチドは多様なアミノ酸を含み腸内フローラにとって重要な栄養源と考えられる。しかし、腸内フローラのイソフラボン代謝性に及ぼす大豆ペプチドの影響については解明されていない。そこで、本研究では、マウスを用いて、腸内フローラのイソフラボンの代謝変換に及ぼす大豆ペプチドの影響を解明する。

方 法

試験1. *In vitro*における糞便フローラのエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドハイニユートDHの影響の検討

動物試験

*In vitro*における糞便フローラのエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドの影響を検討するために、5週齢ICR系雄性マウス7匹にMF食を3週間自由摂食させた後、AIN93M食に切り替えて5週間自由摂食させて、*in vitro*での嫌気性インキュベーションにおけるマウス糞便希釈液のダイゼインからエコールへの生産性を、大豆ペプチドハイニユートDHを添加した場合と、非添加の場合とについて比較検討した。

*in vitro*での糞便希釈液の嫌気性インキュベーション方法

*in vitro*での嫌気性インキュベーションは、以下の方法に従って行った。まず、滅菌試験管を用いてマウ

スの糞便を採取した後、マウス糞便を秤量し、糞便重量に対して30倍量の嫌気性反応液を添加し、滅菌済みガラスホモジナイザー中で、糞便とこの嫌気性反応液をホモジナイズして糞便希釈液を作製した。糞便希釈液200 μ L当たり1 μ LのDMSOに溶解したダイゼイン(20 mg/mL)を添加し、大豆ペプチドハイニユートDH 1 mg (ハイニユートDH 1 mg添加群) もしくは大豆ペプチドハイニユートDH 2 mg (ハイニユートDH 2 mg添加群) を添加した。ハイニユートDH非添加群を対照群とした。反応液調整後、嫌気培養を行った。嫌気培養は、炭酸ガスを用い、37℃、24時間行った。

反応液のイソフラボン類測定方法

反応終了後、反応液をメタノール：酢酸(100:5 V:V)で抽出し、5,000 g、5分間遠心し、上澄を孔径0.2 μ のフィルターでろ過して、ろ過液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515を検出器としたHPLCにインジェクトし、反応液のイソフラボン類濃度を測定した。

なお嫌気性反応液の組成は以下の組成とした。

ブレインハートインフュージョン (Difco)	37 g
カンテン (Difco)	1.0 g
L-cystein · HCl · H ₂ O	0.5 g
Na ₂ CO ₃	4.0 g
精製水	1,000 mL

嫌気性反応液調整方法：上記各成分を加熱して水に溶かし、試験管に9 mLずつ分注し、試験管内を無酸素ガス注入装置を利用してO₂ free-CO₂ ガスを吹き込みながら素早くブチルゴム栓をし、ブチルゴム栓押さえをし、121℃15分間高压蒸気滅菌することで調整した。

試験2. 食餌性イソフラボン投与時のマウス血漿イソフラボン類濃度、盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度およびマウス糞便フローラのエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドハイニユートDHの影響の解明

動物試験

5週齢ICR系雄マウス14匹を大豆ペプチドハイニユートDH-ダイゼイン投与群(DH群、7匹)とカゼイン-ダイゼイン投与群(C群、7匹)に分けて試験食で20日間自由摂食で飼育した。大豆ペプチドハイニユートDH-ダイゼイン食には、大豆ペプチドハイニユートDH20%、ダイゼイン0.1%が含まれていた。カゼイン-ダイゼイン食には、カゼイン20%、ダイゼイン0.1%が含まれていた。(Table 1) 試験食給餌開始後3日目と7日目と14日目に滅菌試験管を用いてマウスの糞便を採取し、*in vitro*で糞便希釈液をダイゼインとともに嫌気的にインキュベーションした。飼育試験終

了後マウスの解剖を行った。解剖時、マウスにジエチルエーテル深麻酔を施し、採血し、血漿を採取し、さらに、盲腸内容物も採取した。

in vitroでの糞便希釈液の嫌気性インキュベーション方法

マウス糞便を秤量し、糞便重量に対して30倍量の嫌気性反応液を添加し、滅菌済みガラスホモジナイザー中で、糞便とこの嫌気性反応液をホモジナイズして糞便希釈液を作製した。糞便希釈液200 μ L当たり1 μ LのDMSOに溶解したダイゼイン (20 mg/mL) を添加して反応液を調整後、炭酸ガスを用い、37°C、24時間で嫌気培養を行った。

反応液のイソフラボン類測定方法

反応終了後、反応液をメタノール：酢酸 (100：5v：v) で抽出し、5,000 g、5分間遠心し、上澄を孔径0.2 μ のフィルターでろ過し、ろ過液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515を検出器としたHPLCにインジェクトし、反応液のイソフラボン類濃度を測定した。

血漿イソフラボン類濃度、血漿総コレステロール濃度および盲腸内容物イソフラボン類アグリコン類濃度測定方法

飼育試験終了後マウスを解剖し、血漿を採取した、採取した血漿は、血漿イソフラボン類濃度測定および血漿コレステロール濃度測定に用いた。血漿イソフラボン類濃度は、血漿200 μ Lに200 μ LのグルクロニダーゼType H-5 (Sigma, MO, USA, 35 mg/mL in 0.2 M酢

酸緩衝液) を添加し、37°Cで2時間インキュベーションを行った。反応終了後、9倍量のメタノール：酢酸 (100：5v：v) で抽出し、5,000 g、10分間遠心し、上澄をナス型フラスコに移して、エバポレーターを用いて濃縮し、濃縮物を400 μ Lの80%メタノールに溶解し、溶液を孔径0.2 μ のフィルターでろ過し、ろ過液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515を検出器としたHPLCで測定した。また、大豆ペプチドハイニユートDH-ダイゼイン投与マウスとカゼイン-ダイゼイン投与マウスの血漿総コレステロール濃度は、コレステロールE-テストワコー (和光純薬、大阪、日本) のキットを用いて測定した。さらに、マウス盲腸内容物を採取し、盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度についても測定した。盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度は、盲腸内容物に1 mLのメタノール：酢酸 (100：5v：v) を添加し、2分間激しくボルテックスし、5,000 g、10分間遠心し、上澄を孔径0.2 μ のフィルターでろ過し、ろ過液20 μ LをフォトダイオードアレイJASCO MD 1515を検出器としてHPLCで測定した。

結果と考察

試験1. において、*in vitro*における糞便フローラのエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドハイニユートDHの影響を検討した。*in vitro*でのマウス糞便希釈液のエコール生産性は、大豆ペプチドハイニユートDHを反応液200 μ Lあたり、2 mg添加した場合は、1 mg添加した場合や非添加の場合に比べて高い傾向があった。(Fig. 1) マウス糞便希釈液への大豆ペプチドハイ

Table 1. Composition of the experimental diet

Ingredient	Soy peptides-daidzein (DH) diet (%)	Casein-daidzein (C) diet (%)
Soy peptides		
HI-NUTE DH	20	—
Casein	—	20
L-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	14.9	14.9
Sucrose	50	50
Corn oil	5	5
Cellulose powder	5	5
Mineral mixture ¹	3.5	3.5
Vitamin mixture ²	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2
Daidzein	0.1	0.1

1) Mineral mixture was prepared according to the AIN-76 formulation.

2) Vitamin mixture was prepared according to the AIN-76 formulation.

3) Daidzein was purchased from LC laboratories (Sigma, MO, USA). (Daidzein purity>98%)

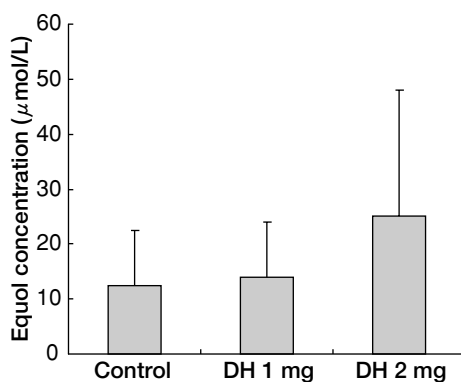


Fig. 1. Equol concentrations of the control fecal suspension from mice and the fecal suspension supplemented with 1 or 2 mg soy peptides HI-NUTE DH. Values are means $\pm$ SD.

ニュートの添加量が増すにつれて糞便フローラのエコール生産性が増加する傾向が認められたことから、食餌として高含有量の大豆ペプチドハイニュートDHをマウスに与えた場合、*in vivo*における腸内フローラのエコール生産性が向上する可能性が考えられた。そこで、試験2では、0.1%ダイゼイン含有大豆ペプチドハイニュートDH食給餌マウス（DH群）と0.1%ダイゼイン含有カゼイン食給餌マウス（C群）とで食餌性イソフラボン投与時のマウス血漿イソフラボン類濃度、盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度およびマウス糞便フローラのエコール生産性について比較検討した。嫌気条件下での*in vitro*でのマウス糞便希釈液のエコール生産性は、飼育開始後3日目では、DH食群とC群との間に有意差は認められなかったが、7日目と14日目では、DH食群の糞便希釈液のエコール生産性がC群に比べて有意に高い結果となり（Fig. 2）、0.1%ダイゼイン含有大豆ペプチドハイニュートDH食の摂食期間が増加するに従って、マウス糞便フローラのエコール生産性が高まる可能性が示唆された。飼育開始後20日目にマウスの解剖を行って、血漿と盲腸内容物を採取し、血漿イソフラボン類濃度と盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度の測定を行ったところ、マウス血漿エコール濃度は、DH群がC群に比べて有意に高い結果となった。（Fig. 3）また、盲腸内容物のエコールアグリコン濃度もDH群がC群に比べて有意に高い結果となった。（Fig. 4）有意差は認められなかったものの、盲腸内容物のダイゼインアグリコン

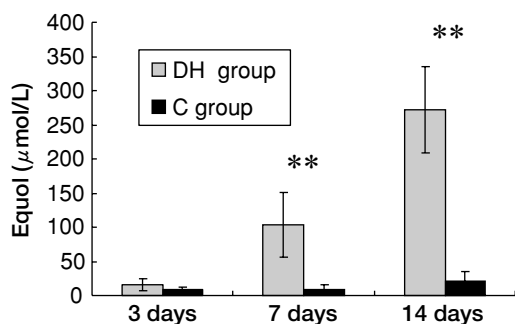


Fig. 2. Equol and daidzein concentrations of the control fecal suspension from mice fed the 0.1% daidzein-casein diet (C) or the 0.1% daidzein-soy peptides HI-NUTE DH diet (DH). *In vitro* incubation of daidzein with fecal flora was conducted on the third day, the seventh day, and the 14th day after starting to feed the experimental diet. Values are means $\pm$ SD. **Significantly different ($p < 0.01$) from the C group.

濃度はDH群がC群に比べて低い傾向が認められた。本研究結果では盲腸内容物のエコールアグリコン濃度がDH群はC群に比して有意に高い結果となった。大豆ペプチドハイニュートDHを摂食し続けたDH群のマウスで*in vitro*のマウス糞便希釈液のエコール生産性

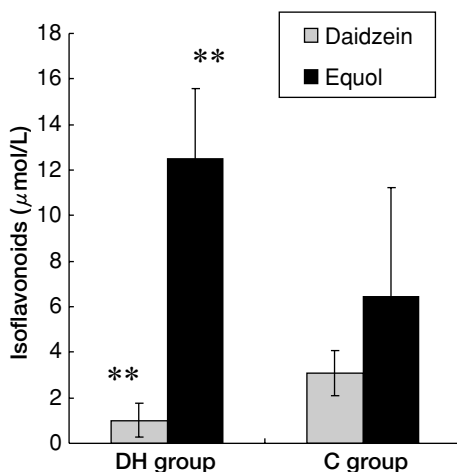


Fig. 3. Plasma isoflavonoids (aglycones+metabolites) of the mice in the 0.1% daidzein-casein diet group (C) or the 0.1% daidzein-soy peptides HI-NUTE DH diet group (DH). Values are means $\pm$ SD. **Significantly different ($p < 0.01$) from the C group.

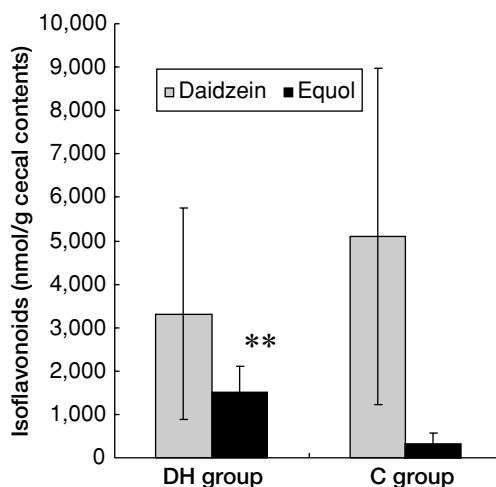


Fig. 4. Cecal isoflavonoids (aglycones) of the mice in the 0.1% daidzein-casein diet group (C) or the 0.1% daidzein-soy peptides HI-NUTE DH diet group (DH). Values are means $\pm$ SD. **Significantly different ($p < 0.01$) from the C group.

が向上していった結果と一致する。これらのことはDH群マウスの盲腸内容物のエコール生産能が高まったことを示唆するものであろう。しかも、血漿エコール濃度についてもDH群マウスはC群マウスよりも有意に高い結果となったことから、大豆ペプチドハイニユートDHの摂取は、*in vitro*と*in vivo*のいずれにおいてもマウスのエコール生産性に寄与するものであろう。しかし、大豆ペプチドハイニユートDHに含まれるどの成分が腸内フローラの代謝活性に影響したかは今後の研究課題の一つである。*In vitro*のマウス糞便希釈液のエコール生産性は、飼育開始後3日目では、DH食群とC群の間に有意差は認められなかったことを考えると、大豆ペプチドハイニユートDHのマウスのエコール生産性向上への寄与は一定期間以上の摂取が必要であると考えられる。また、血漿総コレステロール濃度はDH群とC群で有意な差は認められなかった。(Fig. 5)。しかし、ダイゼイン添加大豆ペプチド食は、ダイゼイン添加カゼイン食に比べて血漿エコール濃度が有意に高かった。エコールの、内因性コレステロールに及ぼす影響については、更なる検討が必要であると考えられる。

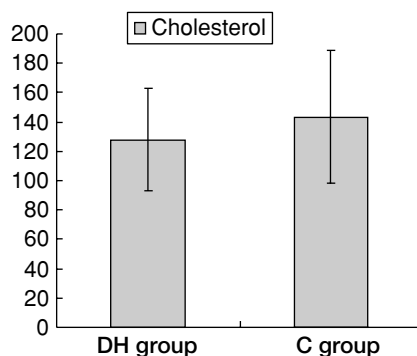


Fig. 5. Plasma total cholesterol concentration (mg/100mL) of the mice fed the 0.1% daidzein-casein diet (C) or the 0.1% daidzein-soy peptides HI-NUTE DH diet (DH). Values are means $\pm$ SD.

要 約

*In vitro*における糞便フローラのエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドハイニユートDHの影響を検討したところ、*in vitro*でのマウス糞便希釈液のエコール生産性は、大豆ペプチドハイニユートDHを反応液200 μ Lあたり、2 mg添加した場合は、1 mg添加した場合や非添加の場合に比べて高い傾向があった。また、0.1%ダイゼイン含有大豆ペプチドハイニユートDH食給餌マウスと0.1%ダイゼイン含有カゼイン食給餌マウスとでマウス血漿イソフラボン類濃度、盲腸内容物のイソフラボン類アグリコン濃度およびマウス糞便フローラのエコール生産性を比較したところ、嫌気条件下での*in vitro*のマウス糞便希釈液のエコール生産性は、飼育開始後3日目では、両群に有意差は認められなかったが、7日目と14日目では、0.1%ダイゼイン含有大豆ペプチド食群の糞便希釈液のエコール生産性が有意に高い結果となり、摂食期間が増加するに従って、糞便フローラのエコール生産性が高まる可能性が示唆された。飼育開始後20日目のマウス血漿エコール濃度と盲腸内容物のエコールアグリコン濃度は、0.1%ダイゼイン含有大豆ペプチド食群で有意に高い結果となった。以上の研究結果から、大豆ペプチドハイニユートDHが、マウスの糞便フローラのエコール生産性を高めることで、血漿や盲腸内におけるエコール濃度を高める可能性が示唆された。

文 献

- 1) Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G and Cassidy A (2003): Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br J Nutr*, **89**, S45-58.
- 2) Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wähälä K, Thomas WK and Lampe JW (2006): Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr*, **136**, 1347-1351.
- 3) Lampe JW, Karr SC, Hutchins AM and Slavin JL (1998): Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 335-339.

- 4) Meyer BJ, Larkin TA, Owen AJ, Astheimer LB, Tapsell LC and Howe PR (2004): Limited lipid-lowering effects of regular consumption of whole soybean foods. *Ann Nutr Metab*, **48**, 67-78.
- 5) Ingram D, Sanders K, Kolybaba M and Lopez D (1997): Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, **350**, 990-994.
- 6) Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, Hayashi K, Miki T, Mikami K, Mori M, Sakauchi F, Washio M, Ito Y, Suzuki K, Wakai K and Tamakoshi A; JACC Study Group (2004): Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer Sci*, **95**, 65-71.