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および共存食品成分の影響の解明

田村　基*[1]・岩見　卓[1]・堀　幸子[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 Peptide and Coexistent Food Components on the Metabolism of Isoflavone by Fecal Flora

[1]Motoi TAMURA, [1]Tadashi IWAMI, [1]Sachiko HORI

[1]National Food Research Institute, Tsukuba 305-8642

ABSTRACT

We investigated the effects of soy oligosaccharides on equol production in mice fed a soy peptide-supplemented diet. We also investigated the effects of soy peptide on *in vitro* incubation of daidzein with human fecal flora. Mice were administered either soy oligosaccharides plus isoflavones (the SOI group) or isoflavones (the control CI group) daily for 18 days before dissection. The plasma equol concentration was higher in the group. In *in vitro* incubation of daidzein with fecal flora of mice, equol concentration was slightly higher in the SOI group. Our data suggest that the coadministration of soy peptide and soy oligosaccharides promotes equol production or absorption in mice. When we investigated equol production in *in vitro* incubation of daidzein with human fecal flora, the addition of soy peptide HI-NUTE DH to the fecal suspension increased equol production in an equol producer. However, equol non-producers did not become equol producers by the addition of soy peptide HI-NUTE DH. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 89-93, 2009.

Key words : soy peptides, daidzein, equol, mouse, soy oligosaccharides

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ているフラボノイドの一種である．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[2)]．近年，心臓血管疾患予防や乳がん，前立腺がん予防と，エコール生産性とには，何らかの関連性がある可能性が強く示唆されている．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．大豆ペプチドハイニュートDHが，マウス糞便フローラのエコール生産性を高める可能性が示唆されている．しかし，大豆ペプチドのマウスのエコール生産性に対する影響が，共存食品成

*〒305-8642　つくば市観音台２丁目1-12

分によってどのように変動するかについては解明されていない．Raffinoseやstachyoseは大豆オリゴ糖の主要成分であり，*Bifidobacterium bifidum*以外のビフィズス菌に選択的に利用されることが知られている[3]．大豆オリゴ糖のマウスへの投与は，マウスの腸内フローラに影響を及ぼすと考えられる．そこで，大豆ペプチド含有食を給餌したマウスのエコール生産性に及ぼす大豆オリゴ糖の影響を検討した．ところで，大豆ペプチドハイニュートDHが，マウス糞便フローラのエコール生産性を高める可能性が示唆されているが，ヒト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については検討されていない，そこで，健常人の糞便希釈液のエコール生産性に及ぼす大豆ペプチドの影響についても検討を行った．

方　　法

試験１．大豆ペプチドハイニュートDH添加食給餌マウスの血漿イソフラボン類濃度およびマウス糞便フローラのエコール生産に及ぼす大豆オリゴ糖の影響の検討

動物試験

８週齢のICR系雄マウス（各群７匹）にAIN-93M食を24日間与えた後，10%大豆ペプチドハイニュートDH添加食（Table 1）を与え，脱イオン水に大豆オリゴ糖とソヤフラボンHGを溶解した溶液（ソヤフラボンHG 20 mg/mL，大豆オリゴ糖濃度5%）をマウス一匹につき0.2 mLを18日間連続で経口投与して飼育した（SOI group）．対照群には，SOI groupと同じ餌組成の大豆ペプチド添加食を与え，脱イオン水にソヤフラボンHGのみを溶解した溶液（ソヤフラボンHG 20 mg/mL）をマウス一匹につき0.2 mLを18日間連続で経口投与して飼育した（CI group）．飼育試験終了後にマウスを解剖し，肝臓，内臓脂肪，血液を採取し，HPLCで血漿イソフラボン類濃度を測定した．また，解剖二日前にマウス糞便をサンプリングし，SOI groupとCI groupの糞便希釈液の*in vitro*での嫌気性インキュベーションにおけるダイゼインの代謝性を比較検討した．マウスは，ステンレス製ケージで飼育し，飼育室の環境は，温度24±0.5℃，湿度65%で，12時間の明暗サイクルとした．なお，大豆オリゴ糖の組成は，stachyose 74.2%（w/w），raffinose 21.7%（w/w）であり，カルピス株式会社より恵与されたものを用いた．

血漿イソフラボン類，血漿総コレステロール濃度測定方法

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総コレステロール濃度測定に用いた．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）を用いて測定した．血漿イソフラボン類濃度測定の前処理として，血漿200 μLに200 μL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℃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（100：5 V：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 μLの80%メタノールに溶解し，溶液を穴径0.2 μのフィルターでろ過し，ろ過液20 μLをHPLCで測定した．検出器には，フォトダイオードアレイJASCO MD 1515を用いた．

***In vitro*でのマウス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 μL当たり1 μL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℃，35時間で嫌気培養を行った．

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_2O	0.5 g
Na_2CO_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O_2 free-CO_2 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分間高圧蒸気滅菌することで調整した．

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，上澄を穴径0.2 μのフィルターでろ過してろ過液20 μLをHPLCで測定した．検出器には，フォトダイオードアレイJASCO MD 1515を用いた．

試験２．*In vitro*でのヒト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ュートDH添加の影響の検討

健常人（成人男性二人と成人女性一人）の新鮮糞

Table 1. Composition of the experimental diet

Conponent of the 10% soy peptide diet	g/1,000 g
Tert-butylhydroquinone	0.014
Choline bitartrate	2.5
L-Cystine	3
Vitamin mix (AIN-93)	10
Mineral mix (AIN-93M)	35
Cellulose	50
Sucrose	100
Casein	100
HI-NUTE DH	100
Lard	70
Cornstarch	397.486
α-Cornstarch	132

便を滅菌容器にサンプリングし，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，滅菌ホモジナイザーと嫌気性培養液で糞便をホモジナイズし，糞便希釈液を作製した．糞便希釈液200 μL当たり1 μL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ュートDH2 mg添加したものをハイニュートDH2 mg添加群とし，ハイニュート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時間行い*in vitro*での嫌気性インキュベーションにおける糞便希釈液のダイゼインからのエコール生産性を大豆ペプチドを添加した場合と非添加の場合とで比較検討した．

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，上澄を穴径0.2 μのフィルターでろ過してろ過液20 μLをHPLCで測定した．検出器には，フォトダイオードアレイJASCO MD 1515を用いた．

結果と考察

10%大豆ペプチドハイニュートDH添加食に加え，ソヤフラボンHG 20 mg/mL（大豆オリゴ糖濃度5%）をマウス一匹につき0.2 mLを18日間連続で経口投与して飼育したSOI groupと10%大豆ペプチドハイニュートDH添加食に加え，ソヤフラボンHG 20 mg/mLをマウス一匹につき0.2 mLを18日間連続で経口投与して飼育したCI groupとで，血漿イソフラボン類濃度，血漿総コレステロール濃度，内臓脂肪量，肝臓重量，盲腸内容物量について比較した．さらに，解剖二日前にマウス糞便をサンプリングし，SOI group とCI group

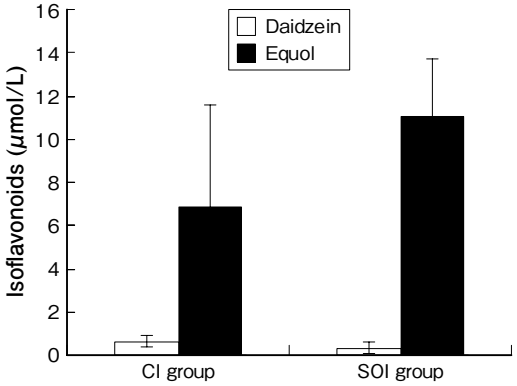

Fig. 1. Plasma isoflavonoids (aglycones+metabolites) of the mice in the CI group or the SOI group. Values are means ± SD.

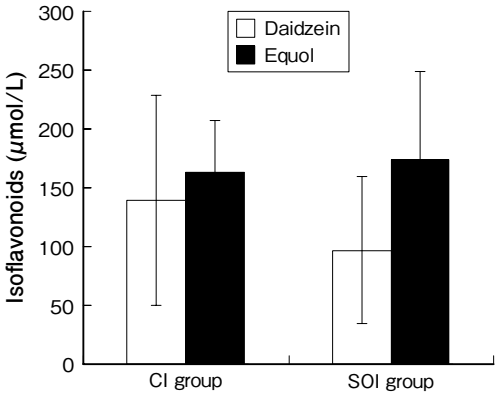

Fig. 2. Equol and daidzein concentrations of the fecal suspension from mice in the CI group or the SOI group. Values are means ± SD.

の糞便希釈液の*in vitro*での嫌気性インキュベーションにおけるダイゼインの代謝性を検討したところ，マウス血漿エコール濃度は，大豆オリゴ糖投与群（SOI group）で非投与群（CI group）よりも高い傾向があった（p=0.062）．血漿ダイゼイン濃度は，大豆オリゴ糖投与群（SOI group）で非投与群（CI group）よりも低い傾向があった（p=0.054）（Fig. 1）．一方，*in vitro*でのマウス糞便希釈液とダイゼインとの嫌気性インキュベーションにおいても血漿エコールの場合と同様SOI groupの方が少し高い傾向にはあったが，その差はわずかであった（Fig. 2）．血漿コレステロール濃度（SOI group=226.5 ± 61.3 mg/dL，CI group=242.9 ± 38.4 mg/dL），内臓脂肪量（SOI group=1.8 ± 0.6 g，CI group=1.5 ± 0.6 g），肝臓重量（SOI group=2.0 ± 0.2 g，CI group=2.1 ± 0.15 g），盲腸内容物量（SOI

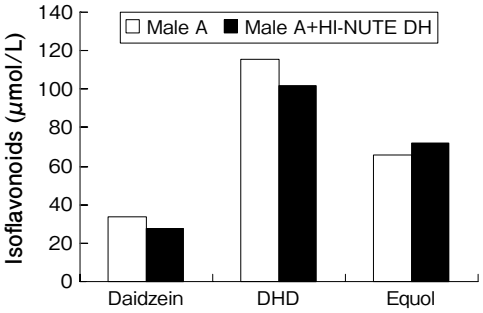

Fig. 3. Equol and daidzein concentrations of the fecal suspension from a human male equol producer (A). The fecal suspension was supplemented with the HI-NUTE DH or not supplemented with the HI-NUTE DH. DHD (dihydrodaidzein).

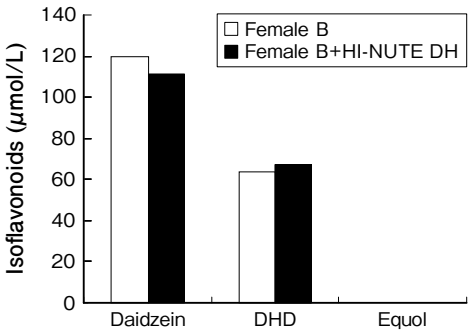

Fig. 4. Equol and daidzein concentrations of the fecal suspension from a human femaleman-equol producer (B). The fecal suspension was supplemented with the HI-NUTE DH or not supplemented with the HI-NUTE DH. DHD (dihydrodaidzein).

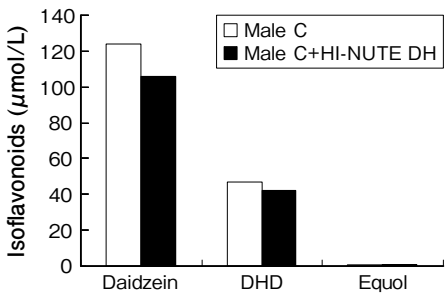

Fig. 5. Equol and daidzein concentrations of the fecal suspension from a human male equol producer (C). The fecal suspension was supplemented with the HI-NUTE DH or not supplemented with the HI-NUTE DH. DHD (dihydrodaidzein).

group=0.19±0.04 g, CI group=0.18±0.07 g）については大きな違いは認められなかった．*In vitro*でのマウス糞便希釈液とダイゼインとの嫌気性インキュベーションにおけるエコールとダイゼインの濃度比の平均は，CI groupでは15.9，SOI groupでは78.7あり，SOI groupで高い傾向が認められ，大豆ペプチドハイニュートDHと大豆オリゴ糖の同時投与は，マウスのエコール生産を促進させる可能性が示唆された．大豆オリゴ糖は多糖資化能を有する腸内細菌によって利用され，大豆オリゴ糖を利用した腸内細菌が産生する酸によって腸内環境が酸性に傾く場合がある．腸内環境の変化や大豆オリゴ糖への資化能の違いによって腸内フローラの構成が変動することが数多く報告されている[4～6]．大豆オリゴ糖のSOI groupへの投与が，マウスの腸内環境の変化をもたらし，エコール生産性に影響を及ぼしたのかもしれない．一方，今回，大豆オリゴ糖はソヤフラボンHGと同時にマウスに経口投与した．そのため，消化管におけるイソフラボンの代謝や吸収に対してオリゴ糖が何らかの作用を及ぼしている可能性も否定は出来ない．消化管機能に対する大豆オリゴ糖の直接的な作用を検討するのは，今後の重要な課題の一つであろう．

試験２．において，*in vitro*におけるヒト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ュートDHの影響を検討した．健常人（成人男性二人と成人女性一人）の新鮮糞便の糞便希釈液とダイゼインとの*in vitro*での嫌気性インキュベーションでは，成人男性一人がエコール生産性で，他の二人は，エコール非生産性であった．大豆ペプチドハイニュートDHの糞便希釈液への添加で，エコール生産性成人男性の糞便希釈液のエコール生産性は向上したが（Fig. 3），エコール非生産性成人女性（Fig. 4）と成人男性（Fig. 5）の糞便希釈液では，エコール生産性が向上することは無かった．これらの結果から，大豆ペプチドハイニュートDHはエコール生産能を有するヒト糞便フローラのエコール生産性を促進する作用はあるが，エコール生産能を有しないか，非常に低いヒト糞便フローラのエコール生産性を向上する作用は有しないことが推察された．

要　　約

大豆ペプチド添加食を給餌したマウスのエコール生産性に及ぼす大豆オリゴ糖の影響を検討したところ，マウス血漿エコール濃度は，大豆オリゴ糖投与群（SOI group）で非投与群（CI group）よりも高い傾向があった．マウス糞便希釈液とダイゼインとの嫌気性インキュベーションにおいても血漿エコールの場合と同様SOI groupの方がエコール濃度が高い傾向にはあったが，その差はわずかであった．大豆ペプチドハイニュートDHと大豆オリゴ糖の同時投与はマウスのエコール生産を促進させる可能性が示唆された．しかし，マウスの血漿総コレステロール濃度や内臓脂肪重量は，SOI groupとCI groupとで大きな違いは認められなかった．一方，健常人（成人男性二人と成人女性一人）の新鮮糞便の糞便希釈液とダイゼインとの*in vitro*での嫌気性インキュベーションでは，成人一人がエコール生産性で，他の二人は，エコール非生産性であった．大豆ペプチドハイニュートDHの糞便希釈液への添加で，エコール生産性の糞便希釈液のエコール生産性は向上したが，エコール非生産性糞便希釈液では，エコール生産性が向上することは無かった．

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）Bowey E, Adlercreutz H and Rowland I (2003): Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human. ***Food Chem Toxicol***, **41**, 631-636.

3）Hayakawa K, Mizutani J, Wada K, Masai T, Yoshihara I and Mitsuoka T (1990): Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. ***Microb Ecol Health Dis***, **3**, 293-303.

4）Benno Y, Endo K, Shiragami N, Sayama K and Mitsuoka T (1987): Effects of raffinose intake on human faecal microflora. ***Bifidobact Microflora***, **6**, 59-63.

5）Wada K, Watanabe J, Mizutani J, Tomoda M, Suzuki H and Saitoh Y (1992): Effects of soybean oligosaccharides in a beverage on human fecal flora and metabolites. ***J Agri Chem Soc Japan***, **66**, 127-135.

6）Saito Y, Takano T and Rowland I (1992): Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora *in vitro* culture. ***Microb Ecol Health Dis***, **5**, 105-10.