

エクオールのラット骨格筋への影響および蓄積量に関する研究

水野谷航*・下村健太・赤坂泰輝・中村真子・辰巳隆一・池内義秀

九州大学大学院農学研究科

Effect of Equol on Rat Skeletal Muscle Properties

Wataru MIZUNOYA*, Kenta SHIMOMURA, Taiki AKASAKA, Mako NAKAMURA,
Ryuichi TATSUMI and Yoshihide IKEUCHI

Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Equol, a soy isoflavone metabolite, is thought to be a candidate as a ligand for nuclear receptors such as estrogen-related receptor γ (ERR γ), which affects skeletal muscle properties. We addressed whether dietary equol administration affects skeletal muscle function and fiber type-related protein expression in rats. Seven-week-old male F344 rats were orally administered a solution with or without equol (10 mg/kg/day) for 5 weeks, then blood and tissue samples were collected. Muscle function was measured two days before sacrifice. Significant differences between the control group and the equol group were not found in muscle function and fiber type-related protein expressions. However, equol existed in plasma at more than 20 μ M which could be expected of ligand activity by nuclear receptors, though almost all the equol was in conjugated form. Equol accumulation was detected in skeletal muscle in three out of six rats administered equol. Furthermore, the accumulation tended to be high in electrically stimulated muscles. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 162-168, 2013.

Key words : soy isoflavone, equol, skeletal muscle, fiber type, nuclear receptor

骨格筋にはエストロゲン受容体 α (ER α)¹⁾, エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ)²⁾, ペルオキシソーム増殖活性化受容体 δ (PPAR δ)³⁾等の核内受容体が発現し, これらは骨格筋の代謝能力, 筋重量, 筋線維タイプ, ミトコンドリア合成, インスリン抵抗性といった

種々の骨格筋の特性に影響を及ぼすことが知られている。一方大豆イソフラボン類(ダイゼイン, ゲニステイン, グリシテイン, エクオール)はこれら核内受容体のリガンド活性を有することが知られている^{4,5)}。

エクオールは大豆イソフラボンの1種であるダイゼインが腸内細菌によって代謝され生成される物質で, ヒトにおいては日本人で約5割, 欧米人で約3割がエク

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

オールを産生できるとされている⁶⁾。エクオールは、女性ホルモン作用（エストロゲン様）の活性がダイゼインやゲニステインなどの大豆イソフラボンの主成分よりも高いとされ、そのエストロゲン様作用から、エクオールは閉経後の骨粗鬆症や更年期障害予防効果が期待されている⁷⁾。

前年度までの報告で^{8,9)}、7週齢Wistar系雄ラットに、精製大豆イソフラボン（ソヤフラボンHG, 不二製油）を重量比0.4%で配合した飼料あるいは対照飼料（AIN-93G）を4週間、摂食量を揃えて給餌した結果、大豆イソフラボン（S）群はコントロール（C）群に比べ、前脛骨筋重量の有意な低下、EDL筋のMyHC1比率（遅筋タイプ）の有意な増加、ヒラメ筋でミトコンドリアマーカー porinの発現量が増加している事を報告した。血清中のダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、エクオール濃度を測定した結果、摂取した大豆イソフラボンは、ラット血清中ではほとんどがエクオールとして存在していたことが分かった。従って骨格筋で生じた変化はエクオールによる影響と推測された。

そこで本研究ではエクオール精製標品をラットに経口投与し、筋線維タイプや筋重量への影響を見るとともにより多くの視点から骨格筋特性への影響を確認するために筋力、筋持久力の測定を行い、エクオールが骨格筋の特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

方 法

1. 試薬

(S)-エクオールはCayman Chemical製、(R,S)-エクオールはLC Laboratories製、 β -glucuronidase, partially purified sulfatase, recombinant glucuronidaseはSigma-Aldrich製の標品を購入した。

2. 実験動物

実験動物は7週齢の雄性 Fischer 344ラット（九動）を使用した。飼育環境は各群ステンレス製のケージにおいて室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明は8:00点灯、20:00消灯の12時間照明で飼育した。飼育期間中、水は自由に摂取させた。飼育は畜産化学研究室内の動物飼育室において九州大学の実験動物飼育規則に則して行った。

3. 実験デザイン

実験1：エクオール経口投与後の血漿中エクオール濃度

体重約110 gのラットに頸静脈カニキュレーション手術を施し、エクオール溶液（ $43.2 \mu\text{g}$ (S)-エクオール, 0.54

mg (S)-エクオール, 1.08 mg (R,S)-エクオール for each rat)を経口投与後0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24時間にカニキュレより0.3 mLずつ採血を行った。血液はEDTA処理し、遠心分離後に血漿を得た。経口投与の溶媒には3%エタノール10%Tween80を含む1×PBSを使用した。その後、血漿中のエクオール濃度を後述するHPLC法で測定した。

実験2：エクオール経口投与と長期実験

まずラットはAIN-93Gに準ずる標準飼料（大豆油はコーン油に置換）を自由摂取させ6日間予備飼育を行った。その後、体重、増体量および摂食量が同程度になるように6匹ずつの2群に分け、1群は溶媒のみを与える対照群（C群）、もう1群は10 mg/kg/dayの (R,S)-エクオールを毎日経口投与する群（E群）とし、5週間飼育した。C群E群ともに、経口投与はイソフルラン麻酔下で行った。筋力測定や解剖時の代謝状態へ及ぼす摂食の影響を最小限にするために、飼料は17:00～9:00のみ与え、経口投与は9:30～10:00に行った。この実験条件ではエクオールによる摂食量の低下は誘導されないことが分かったため、飼育期間を通じて飼料は自由摂食とした。解剖の2日前に後述する筋力、筋持久力を測定した。5週間飼育終了後、三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン+ミタゾラム+ブトルファノール）を腹腔内投与し、麻酔をかけ、その後断頭と殺し、採血後内臓（心臓、肝臓、腎臓、脾臓）、脂肪組織（副精巣周囲、腎周囲、腸間膜、褐色脂肪）および6種類の筋肉（ヒラメ筋(Sol)、腓腹筋、足底筋、長趾伸筋(EDL)、前脛骨筋、大腿四頭筋）を採取し重量を測定した。筋肉はすぐに液体窒素で凍結させ、解析に用いるまで -80°C で保存した。また血液から分離した血漿を -80°C で保存し解析に用いた。

4. 筋力、筋持久力測定

本測定では、大阪府立大学の岩田晃准教授が開発したラットの筋力・筋持久力測定システムを利用した¹⁰⁾。本システムはひずみゲージを用いてラットの下腿部が発揮する力を測定する装置である。ひずみゲージは加えられた力に応じて発生する機械的な微小変化である「ひずみ」を電気信号として検出するセンサーである。実際の測定方法として、まず三種混合麻酔薬で麻酔を施したラットの右膝裏から脛骨神経を露出し、双極鉤電極（株式会社ユニークメディカル：KS207-024）を掛けた。次に右後肢の足首を90度の角度でひずみゲージを貼付した金属板に固定し、脛骨神経を電気刺激することで下腿部の筋肉を収縮させた。脛骨神経は、下腿筋群を支配している神経で、脛骨神経を刺激するとかかとを支点とし、足が下腿側へ回転

する（つま先を伸ばす）動きが発生する。その結果、足裏に接している金属板がひずみ、そのひずみがひずみゲージによって検出される。ただし金属板は十分に硬く、足が自由に回転することはできない。従って収縮様式としては、等尺性収縮が最も近い。ひずみゲージから得られた電気信号を、コンピュータ上で力に変換した。電気刺激としては、パルス幅1 msの矩形波、刺激間隔を3 ms（周波数250 Hz）、刺激パルス数を毎秒40回、刺激電圧を発揮張力がほぼ最大となる60 Vに設定し、100秒間刺激（100回の繰り返し強縮）を与えた。また1回目に発揮された筋力を最大発揮筋力とし、この値を100とした時の相対筋力の推移を筋持久力の指標とした。筋力測定後は神経露出のための傷口に縫合と消毒を施し、ケージに戻した。

5. ミオシン重鎖（MyHC）アイソフォーム組成のSDS-PAGE解析

特殊な組成のゲルを用いたSDS-PAGE法¹¹⁾、各筋組織中のMyHCアイソフォーム（MyHC1, 2A, 2X, 2B）を分離し、それらの割合をImageJで解析した。

6. Western blotting

ヒラメ筋、EDLからたん白質を抽出し、Western blottingにより、遅筋タイプの指標であるミオグロビン、代謝に関わるたん白質でPPAR δ の標的遺伝子であるUCP3(uncoupling protein-3)、ミトコンドリアマーカー porinの発現量を測定した。ローディングコントロールとして β -actinを測定した。

7. 血清および骨格筋の大豆イソフラボンの定量

血清あるいは腓腹筋にクエン酸ナトリウムバッファー（25 mM, pH 5.0）を加え、 β -glucuronidase, partially purified sulfatase, recombinant glucuronidaseの混合物を用いて37℃で60分酵素処理を行った。大豆イソフラボンを酢酸エチルで抽出した後、遠心濃縮し、残留物をメタノールで溶かしHPLC分析用サンプルとした。HPLCカラムにはYMC-Triart C18を用いた。移動相組成はギ酸を0.1%含むアセトニトリル水溶液とし、グラジエント条件は、0-65分までアセトニトリル濃度を15-30%まで上げ、65-70分までは30%保持とした。エクオールは282 nmの吸光からピークを同定し、定量した。

結果と考察

実験1：エクオール経口投与後の血漿中エクオール濃度

Fig. 1Aは体重約110 gのラットに43.2 μ g, 0.54 mg, 1.08 mgのエクオールを経口投与した後の血中エク

オール濃度の経時的変化を示している。1.08 mg（約10 mg/kg）の投与量で前回の大豆イソフラボン実験と同等以上の20 μ M程度の最大濃度に達した。これより経口投与されたエクオールは投与後30分で血中濃度のピークを迎え、その後約24時間をかけて低下していくことがわかった。この経過は血中濃度のピークが投与後0.5-1.0 hであることを示した報告と一致する¹²⁾。またFig. 1Bは10 mg/kgエクオールを経口投与し30分後の血中エクオール濃度を脱抱合酵素である β -glucuronidase, partially purified sulfatase, recombinant glucuronidase混合物の有無で比較した結

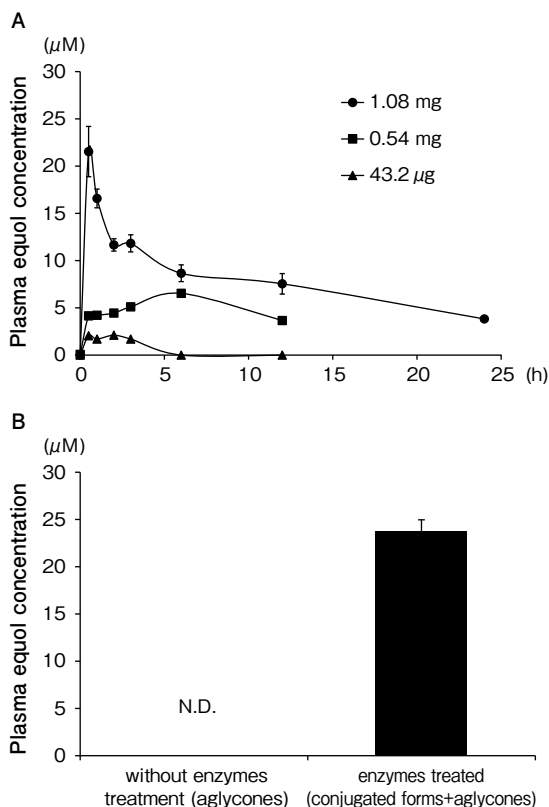


Fig. 1. Plasma equol concentrations in rats post oral gavage of an equol solution. (A) The dose was 43.2 μ g (n=1), 0.54 mg (n=1), 1.08 mg (n=3) for each rat. The body weight of rats was approximately 110 g. Results of 1.08 mg are expressed as means $\pm$ SE. (B) Comparison of equol concentration with or without β -glucuronidase, partially purified sulfatase and recombinant glucuronidase in sample preparation. The result suggests almost all equol existed as conjugated form in rat plasma. N.D., not detected.

果である。同一個体の血漿サンプルで、酵素処理を行った場合のみエクオールが検出されたことから、血中ではエクオールはほぼ100%抱合体として存在していることが分かった。この結果も経口摂取したエクオールは99%以上が抱合体であるとの報告と一致していた¹²⁾。生体では多くのフラボノイド類はグルクロン酸あるいは硫酸抱合体で存在していると言われており、生理的な活性も大きく異なると言われている。従って、今後フラボノイドを生体で評価する場合、常に抱合化による影響を考慮する必要があるであろう。

実験2：エクオール経口投与長期実験

Table 1は5週間毎日、10 mg/kgのエクオールを経口投与した後のC群とE群の体重と総摂食量の平均を示している。これらの値に2群間で差は見られなかった。データは示していないが、飼育期間中も同様に差は見られなかった。Table 1には採取した各組織の重量も示した。2群間で各臓器、骨格筋重量に有意な差は見られなかった。しかし、体重で補正した白色脂肪組織重量（副精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪、腸間膜脂肪）の合計はC群に比べE群で有意な減少が見られた（C

群 48.63 ± 2.02 vs E群 43.13 ± 1.22 g/kg, $p < 0.05$)。この変化は、過去にエクオールで脂肪組織重量が低下したとする報告と一致する¹³⁾。脂肪組織重量が低下した機序については不明であるが、肝臓や脂肪組織等の筋以外の組織でエクオールが生理作用を発現する経路が存在することを示唆している。Fig. 2Aは最初の1回目を最大発揮筋力とし、最大発揮筋力を100とした相対筋力の推移（筋持久力）を示している。最大発揮筋力および筋持久力は2群間で差は見られなかった。Fig. 3はラットのEDLとSolにおけるSDS-PAGEによるミオシン重鎖の解析結果である。どちらの筋肉においても、2群間でMyHC組成に違いは見られなかった。Western blottingによりEDLとSolにおける、ミトコンドリアマーカであるporin、速筋タイプの増加因子と考えられているFOXO1、遅筋タイプ増加因子と考えられているPGC1 α 、脱共役たん白質であるUCP3、酸素の貯蔵体で遅筋に多いmyoglobinのたん白質発現量を調べたが、全ての因子においてEDL、Solともに2群間で有意な差は見られなかった（data not shown）。

以上に示すように、血中には抱合体であるが $20 \mu\text{M}$

Table 1. Body weight and organ weights in rats administered 10 mg/kg/day equol for five weeks

Variable (g)	Control	Equol
Initial body weight	138.5 $\pm$ 11.0	137.4 $\pm$ 4.5
Final body weight	200.3 $\pm$ 5.9	193.4 $\pm$ 7.6
Body weight gain	61.7 $\pm$ 4.6	56.3 $\pm$ 7.1
Total food intake	416.6 $\pm$ 16.5	410.7 $\pm$ 13.9
Food efficiency †	0.147 $\pm$ 0.006	0.134 $\pm$ 0.013
EDL	0.098 $\pm$ 0.004	0.092 $\pm$ 0.003
Soleus	0.089 $\pm$ 0.003	0.084 $\pm$ 0.003
Gastrocnemius	1.039 $\pm$ 0.014	1.007 $\pm$ 0.044
Plantaris	0.224 $\pm$ 0.444	0.219 $\pm$ 0.678
TA	0.353 $\pm$ 0.010	0.345 $\pm$ 0.014
Quadriceps	1.764 $\pm$ 0.045	1.709 $\pm$ 0.083
Epididymal fat	3.731 $\pm$ 0.169	3.287 $\pm$ 0.197
Perirenal fat	3.214 $\pm$ 0.175	2.697 $\pm$ 0.208
Mesenteric fat	2.792 $\pm$ 0.203	2.379 $\pm$ 0.108
Brown adipose tissue	0.218 $\pm$ 0.013	0.226 $\pm$ 0.016
Liver	5.495 $\pm$ 0.359	5.497 $\pm$ 0.381
Spleen	0.476 $\pm$ 0.017	0.437 $\pm$ 0.033
Kidneys	1.473 $\pm$ 0.053	1.443 $\pm$ 0.051
Testes	2.700 $\pm$ 0.081	2.610 $\pm$ 0.104
Heart	0.641 $\pm$ 0.018	0.625 $\pm$ 0.026

Values are means $\pm$ SE for 6 rats. Left (intact) muscles were weighed. EDL; extensor digitorum longus, TA; tibialis anterior. † food efficiency = body weight gain (g)/total food intake (g)

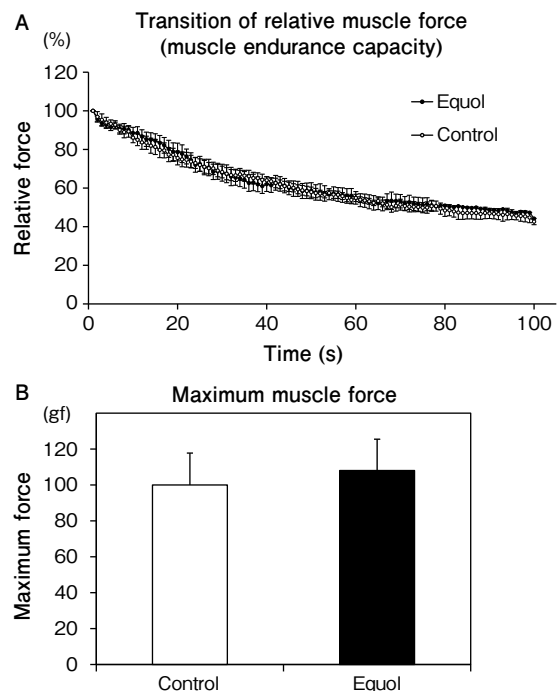


Fig. 2. Effect of five-week administration of 10 mg/kg/day equol on maximum isometric tetanic force and muscle endurance capacity of rats. There was no significant difference between control and equol group. Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

を超えるエクオールが一時的に存在していた。それにも関わらず筋組織において筋機能や関連するたん白質発現に対する影響は、全く観察されなかった。この理由については二つ考えられ、抱合体化されたエクオールは完全に生理活性を失っており、通常飼育下では再度アグリコンとはならず生体外へ排出されている可能性、そしてもう一つは血中に高濃度で存在しても筋細胞まで到達しない可能性である。そこで、後者の可能性を検討するために、筋組織にエクオールが蓄積していたかどうかを確認した。結果、E群では6個体中3個体の大腿四頭筋において検出可能なレベルのエクオールの蓄積が確認された (Table 2)。エクオール定量に際し、脱抱合化酵素処理をしなかった場合はE群でも全くエクオールが検出されなかったことから、アグリコンの形態では蓄積されていないことが分かった (data not shown)。また解剖時には断頭による放血を実施しているため残存している血液の影響はわずかである。今回は、筋組織全てを解析に供したが、筋組織のどの部位 (血管内壁、筋線維間隙、筋細胞内等) にエクオールが局在していたか、現段階では分かっていない。今後、特異抗体の作出や組織切片のレーザーマイクロダイセクションの応用で、エクオールの局在 (筋細胞まで到達していたのか) を明らかにすることが可

能と考える。

玉ねぎに含まれるフラボノイドの1種であるケルセチンは損傷した血管に入り込み動脈硬化を抑制することが知られている¹⁴⁾。本研究で行ったラットの筋力・筋持久力測定は、神経電気刺激により骨格筋に対し、強力な筋収縮を誘導する。実際測定終了後の脚部は明確な浮腫が観察される。筋損傷の程度は評価していないが、損傷が誘導されている前提で、電気刺激をかけた右腓腹筋と刺激をかけていない左腓腹筋のエクオール蓄積量を比較したところ、大腿四頭筋でエクオールが検出されたE群の3個体で、刺激をかけた右腓腹筋でのみエクオールの蓄積が確認された (Fig. 4)。エクオールが検出された個体内で、大腿四頭筋 (Table

Table 2. Equol concentrations in quadriceps muscles of rats administered 10 mg/kg/day equol for five weeks.

Rat	Control	Equol
	$\mu\text{mol/kg wet tissue}$	
#1	N.D.	0.17
#2	N.D.	0.21
#3	N.D.	0.43
#4	N.D.	N.D.
#5	N.D.	N.D.
#6	N.D.	N.D.

N.D., not detected.

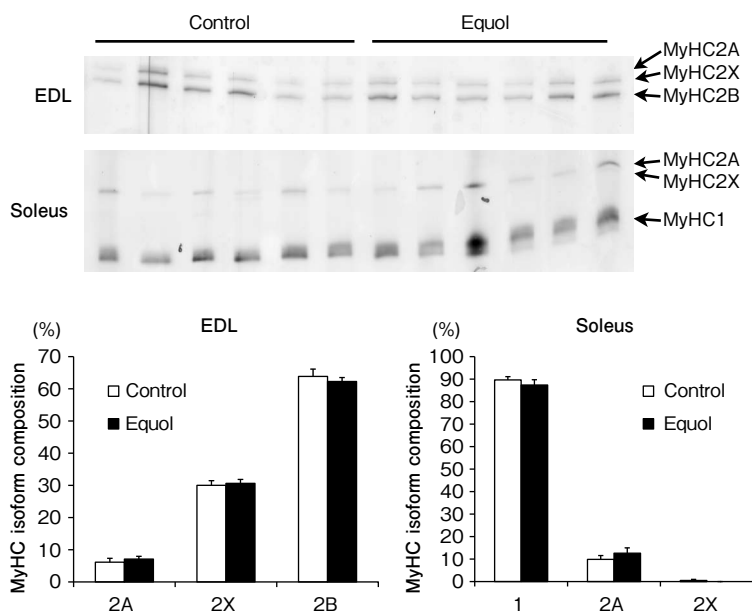


Fig. 3. Effect of five-week administration of 10 mg/kg/day equol on myosin heavy chain (MyHC) isoform compositions in EDL and soleus muscles of rats. There was no significant difference between control and equol group. The blurred MyHC1 bands in soleus were treated as a single band in densitometric analysis. Values are means $\pm$ SE for 6 rats.

2) と電気刺激をかけた腓腹筋 (Fig. 4) の蓄積量を比較すると、3個体とも電気刺激をかけた腓腹筋の蓄積量の方が高値であった。このことから運動をさせ筋損傷を誘導した方がエクオールが蓄積しやすくなると推測された。Kawaiらによると、マクロファージは β -glucuronidase 活性を有しているの、抱合化されたエクオールも脱抱合される経路は存在する。筋損傷によって、マクロファージが損傷部位で増加すれば、局所的に脱抱合されたエクオールが、筋組織で増加する可能性が考えられる。従って、抱合体に代謝されるフラボノイド類の生理活性を調べるには、損傷や炎症反応を組み合わせると、無処理区とは異なる影響が見られるかもしれない。

以上より、結論として5週間のエクオール経口投与

では、大豆イソフラボン摂取によってみられた筋線維タイプの変換や筋重量、ミトコンドリアマーカーの発現量などの骨格筋特性の変化は再現されなかった。最大発揮筋力や筋持久力にもエクオール投与の影響はみられなかった。しかし白色脂肪組織重量はエクオール投与群で有意に減少しており、筋以外の組織まで目を向けるとエクオールによる影響は観察された。骨格筋中にはエクオールが存在、蓄積していることがわかったが、全てのエクオールは活性型のアグリコンではなく不活性型の抱合体であった。以上より核内受容体のリガンドとして知られるエクオールが骨格筋に何らかの変化を起こさせるためには抱合体ではなくアグリコンの形態で、筋細胞に到達させることが必要であると考えられた。

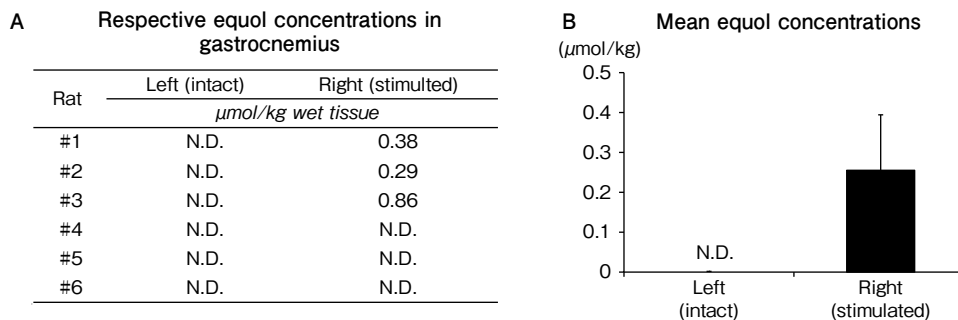


Fig. 4. Equol concentrations in intact or stimulated muscles of rats administered 10 mg/kg/day equol for five weeks. (A) Equol concentrations of all rats used in the experiment. Three out of six rats showed detectable amount of equol in stimulated gastrocnemius muscles. (B) Mean value of equol concentrations. The samples in which equol was not detected were analyzed as zero. N.D., not detected.

謝 辞

本研究に際しエクオールの入手先と活性に関する情報を提供下さいました九州大学大学院農学研究 院 立花宏文教授と蒲池祥子様に深謝いたします。

要 約

骨格筋にはエストロゲン受容体 (ERs)、エストロゲン関連受容体 (ERRs)、ペルオキシソーム増殖活性化受容体 (PPARs) 等の核内受容体が存在し、これらは筋重量や筋線維タイプといった骨格筋の特性に影響を及ぼすことが知られている。一方、大豆イソフラボンはいずれも核内受容体のリガンド活性を有することが知られている。これまでに粗精製大豆イソフラボンを与えたラットで遅筋タイプの増加と筋重量の低下が観察され、また血中にダイゼインの代謝産物エクオールが最も多く存在することがわかった。そこで本研究では、エクオールが骨格筋の特性にどのような影響を与えるか検討した。ラットにエクオールを10 mg/kg経口投与すると、30分後の血中エクオール濃度は核内受容体リガンド活性が期待できる20 μM を超えることがわかった。しかし5週間10 mg/kgエクオールを投与した結果、大豆イソフラボン摂取によってみられた骨格筋特性の変化は再現されなかった。筋力や筋持久力も2群間に差はみられなかった。E群の骨格筋中にはエクオールが存在して

いることがわかったが、全て抱合体の形態であった。以上より、核内受容体のリガンドとして知られるエクオール10 mg/kg投与はラット骨格筋特性にほとんど影響を与えないことがわかった。筋細胞にエクオールを作用させるには何らかの方法でアグリコンの形態に変換させることが必要であると考えられた。また筋力測定に用いた側と用いていない側の腓腹筋のエクオール含量を調べたところ刺激側のみで蓄積が確認されたことから、運動をさせ筋損傷、再生を誘導した方がエクオールが蓄積しやすくなると推測された。

文 献

- 1) Ribas V, Nguyen MT, Henstridge DC, Nguyen AK, Beaven SW, Watt MJ and Hevener AL (2010): Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**, E304-319.
- 2) Rangwala SM, Wang X, Calvo JA, Lindsley L, Zhang Y, Deyneko G, Beaulieu V, Gao J, Turner G and Markovits J (2010): Estrogen-related receptor γ is a key regulator of muscle mitochondrial activity and oxidative capacity. *J Biol Chem*, **285**, 22619-22629.
- 3) Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H and Evans RM (2004): Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biol*, **2**, e294.
- 4) Dang Z and Lowik CW (2004): The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *J Bone Miner Res*, **19**, 853-861.
- 5) Hirvonen J, Rajalin AM, Wohlfahrt G, Adlercreutz H, Wahala K and Aarnisalo P (2011): Transcriptional activity of estrogen-related receptor γ (ERR γ) is stimulated by the phytoestrogen equol. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **123**, 46-57.
- 6) Liu B, Qin L, Liu A, Uchiyama S, Ueno T, Li X and Wang P (2010): Prevalence of the equol-producer phenotype and its relationship with dietary isoflavone and serum lipids in healthy Chinese adults. *J Epidemiol*, **20**, 377-384.
- 7) Jackson RL, Greiwe JS and Schwen RJ (2011): Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor β agonist. *Nutr Rev*, **69**, 432-448.
- 8) 水野谷航, 下村健太, 佐藤祐介, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀 (2012): 大豆イソフラボンが骨格筋線維型に及ぼす影響. 大豆たん白質研究, **32**, 157-161.
- 9) 水野谷航, 下村健太, 赤坂泰輝, 佐藤祐介, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀 (2013): 大豆イソフラボンがラット骨格筋の線維タイプおよび筋重量に及ぼす影響. 大豆たん白質研究, **33**, 160-164.
- 10) Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M and Kami K (2010): Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Muscle Nerve*, **41**, 694-701.
- 11) Mizunoya W, Wakamatsu J, Tatsumi R and Ikeuchi Y (2008): Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Anal Biochem*, **377**, 111-113.
- 12) Schwen RJ, Nguyen L, Plomley JB and Jackson RL (2012): Toxicokinetics and lack of uterotrophic effect of orally administered S-equol. *Food Chem Toxicol*, **50**, 1741-1748.
- 13) Blake C, Fabick KM, Satchell KD, Lund TD and Lephart ED (2011): Neuromodulation by soy diets or equol: anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. *BMC Neurosci*, **12**, 28.
- 14) Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, Kobayashi M, Kanayama M, Uchida K and Terao J (2008): Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*, **283**, 9424-9434.