

# 大豆イソフラボンの摂取が更年期女性の口腔内環境に 及ぼす効果に関する基礎的研究

日下部裕子\*

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
食品総合研究所食品機能研究領域食認知科学ユニット

## Basic Study About the Effect of Soy Isoflavon on the Oral Environment of Women in Menopause

Yuko KUSAKABE\*

Food Function Division, National Food Research Institute,  
National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba 305-8642

### ABSTRACT

Dry mouth is one of the many disorders that affect the quality of life, because it leads not only to higher incidence of caries but also changes in taste sensitivity. Dry mouth is a common symptom in menopausal women, and the administration of female hormones can be effective in improving symptoms. However, adverse defects of these hormones often lead to reluctance to in patient. Soy isoflavone is a potential alternative to hormonal therapy owing to their structural similarity to estrogen. Therefore, we compared the effects of female hormones, and soy isoflavones (genistain and fujiflavone), on the salivary system of ovariectomized mice. We evaluated their food and water consumption, saliva production, taste sensitivity, gene expression in the taste buds and salivary glands, and salivary protein production by comparing ovariectomized mice and sham-operated mice. The results show that the administration of female hormones and soy isoflavones restore the gene expression of submandibular gland protein C (Smgc), which is decreased by ovariectomy. This effect was correlated with their estrogenic activity. Furthermore, similar results were obtained for Smgc protein levels. Therefore, the analysis of Smgc expression in salivary glands is a suitable indicator of the effects of female hormones and soy isoflavones on salivary glands. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 153-158, 2015.

Key words : soy isoflavone, salivary gland, gene expression, female hormone, dry mouth

\* 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

ドライマウスは唾液分泌の減少により口腔内が乾燥し、う歯の発生、味覚感受性の変化などを引き起こすことで生活の質に大きく影響する疾患である。ドライマウスは更年期の女性に多い症状であることから、女性ホルモンと唾液分泌には密接な関係があると考えられており<sup>1)</sup>、その症状緩和には女性ホルモンの投与が有効であると考えられるが、同時に副作用を懸念もある。そうした背景から、女性ホルモン様の働きを持つファイトケミカルの一つであるイソフラボンが注目を集めているが、その有効性については、評価方法も確立されていないのが現状である。そこで、我々は、卵巣を摘出して人為的に閉経状態にしたハツカネズミを利用して、女性ホルモンが唾液や味覚などの口腔内環境に及ぼす影響を評価する系を構築し、その系の利用により大豆イソフラボンの口腔内環境への影響の評価を行うことを目的とした研究を行った。

## 方 法

### 実験動物

ハツカネズミC57/BL6Jはチャールスリバーより入手した。動物実験に当たっては、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物実験等実施規程に則り、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 実験動物委員会による承認を得て行った。飼料は合成飼料AIN-93Gに含まれるダイズ油をコーン油に置換したものをを用いた。卵巣摘出手術1週間後に、5～6匹に群分けし、それぞれの群について合成飼料のみあるいはイソフラボンを添加した餌で2～3週間飼育した。イソフラボンはフジフラボンP40(ダイゼイン(50%)、グリシテイン(40%)、ゲニステイン(10%)の3種類のイソフラボン混合物)(フジッコ)およびゲニステイン(LC Laboratories)を用いた。体重、摂食量、摂水量の測定は、個別に3～4日ごとに行った。

### 卵巣摘出手術

イソフルランによる麻酔下で、卵巣の摘出あるいは偽手術を行った。

### 女性ホルモンの投与

卵巣摘出手術の1週間後から、エストラジオール(Sigma-Aldrich)を皮下投与した(5 µg/kg/day)。

### 唾液採取

ペントバルビタール麻酔下でピロカルピン(1 mg/

kg)を腹腔内投与し、分泌された唾液をキャピラリーを用いて採取、測定した。

### RT-PCR

顎下腺を摘出し、キットを用いて(GEヘルスケア)RNAを採取した。抽出したRNAについて、Superscript IIIを用いた逆転写反応を行い、PCR反応に供した。PCRにより増幅されたDNA断片の定量は、電気泳動の撮影画像をCS analyzer(ATTO社)により解析した。

### ウェスタンブロット解析

摘出した顎下腺サンプルをCylLytic MT溶液(Sigma-Aldrich)に溶解させたものをウェスタンブロット解析に供した。たん白質濃度はPierce<sup>®</sup> BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。一次抗体として抗Smgc抗体(Everest Biotech Ltd)を、唾液サンプルについては1000倍、唾液腺サンプルについては5,000倍に希釈して用いた。二次抗体としてhorseradish peroxidaseラベルされた抗ヤギ抗体(GEヘルスケア)を2,500倍希釈して用い、Smgcたん白質をECL-Plusキット(GEヘルスケア)を用いてLightCapture(アトー)により発光を検出した。発光量は定量プログラムCS analyzer(アトー)を用いて定量した。

## 結 果

本研究を始める段階で、卵巣の摘出により顎下腺内のsubmandibular gland protein C(Smgc)遺伝子の発現が減少し、Smgc遺伝子の選択的スプライシング産物であるt-Smgcの発現が上昇することを見出していた<sup>2)</sup>。Smgcは顎下腺に局在が確認されている分子で<sup>3)</sup>、Smgc遺伝子は唾液たん白質のムチンの一種mucin19たん白質もコードしていることが明らかになっており<sup>4)</sup>、唾液や唾液分泌と深く関与すると考えられる。そこで、イソフラボンの摂取による口腔内環境の影響を評価する方法として、摂水量、唾液分泌量、Smgc遺伝子発現様式、Smgcたん白発現量の変化を解析することとした。イソフラボンとして0.1%ゲニステインを、大豆イソフラボンとして0.1%フジフラボンP40を用いた。

### イソフラボン摂取による摂水量の変化

ドライマウス症状が進んだ場合、口の中が渇く感覚から摂水量が増加すると想定し、摂水量を測定した。

卵巣摘出により、摂水量は増加する傾向を見せ、エストラジオール投与群では、摂水量の増加が抑制される傾向を示した。一方、フジフラボン摂取群では摂水量は卵巣摘出群よりも増加する傾向を示し、ゲニステイン摂取群では卵巣摘出群とほぼ同等の摂水量を示した (Fig. 1)。

### イソフラボン摂取による唾液分泌量の変化

腹腔内ピロカルピン投与による唾液分泌量を測定し、各群で比較した。卵巣摘出により唾液分泌量はわずかに減少する傾向があったが、女性ホルモン投与、イソフラボン摂取では減少、ゲニステイン摂取では増加と、女性ホルモン様の働きとは無関係な結果となった (Fig. 2)。

### イソフラボン摂取によるSmgc 遺伝子発現量の変化

顎下腺におけるSmgc遺伝子およびt-Smgc遺伝子の発現量をRT-PCRにより、半定量的に解析した (Fig. 3)。その結果、卵巣摘出によるSmgcの発現量の低下は、女性ホルモン投与で大きく改善することが明らかになった。イソフラボン摂取によるSmgcの発現量の改善は、ゲニステインの効果が大きく、フジフラボンによる効果は小さかった。卵巣摘出によるt-Smgcの発

現量の増加は、ゲニステインおよび女性ホルモン投与で改善する傾向が見られた。

### イソフラボン摂取によるSmgc たん白質発現量の変化

抗Smgc抗体を用いて、顎下腺および唾液について、卵巣摘出および女性ホルモンの投与によるSmgcたん白質発現量の変化をウェスタンブロットング法により解析した (Fig. 4)。唾液中のSmgcたん白質の量は、卵巣摘出により減少するが、女性ホルモンの投与で有意に増加し、ゲニステインの投与でも増加する傾向があることも明らかになった。一方、顎下腺内においては、Smgcたん白質は卵巣摘出により増加する傾向が観察された。また、女性ホルモンの投与によって増加し、ゲニステイン投与によって減少する結果となった。

### Smgc 遺伝子の発現の雌雄差

以上より、Smgcの発現に女性ホルモンが関わるということが強く示唆されたため、Smgcの雌雄による発現の差があるかどうかを検討した (Fig. 5)。まずRT-PCRを行ったところ、雄のSmgcの発現量が著しく低いことが明らかになった。また、ウェスタンブロットング法により、唾液および顎下腺中のSmgcたん白質量を解析したところ、唾液、顎下腺の両方でSmgcたん白質の発現量が低く、特に顎下腺では有意に低いこと

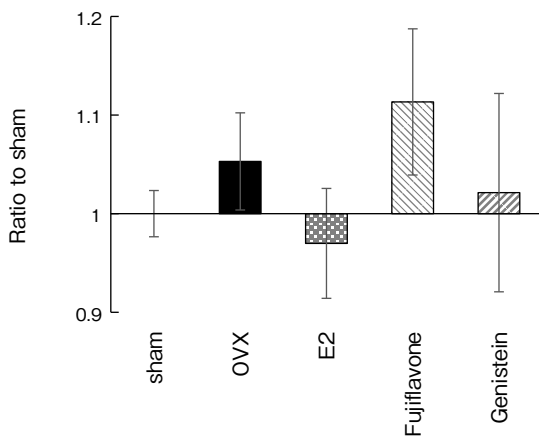


Fig. 1. Comparison of the amount of water intake between ovariectomized and sham-treated mice. Ovariectomized mice were treated with estradiol (E2), 0.1% fujiflavone, or 0.1% genistein. Ovariectomized mice without treatment are shown as OVX. The relative amount of water intake was determined by comparison with the average water intake of sham-treated mice, which was defined as 1 (n=5-14). Values are expressed as means  $\pm$  SE.

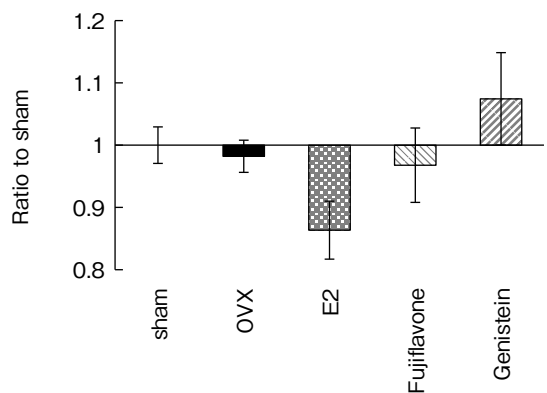


Fig. 2. Comparison of the amount of saliva between ovariectomized and sham-treated mice. Ovariectomized mice were treated as in Fig. 1. The saliva secreted into the oral cavity was collected for 15 min using capillaries after intraperitoneal injection of pilocarpine (0.1 mg/kg). The relative amount of saliva was determined by comparison with that in the sham-treated mice, which was defined as 1 (n=6-28). Values are expressed as means  $\pm$  SE.

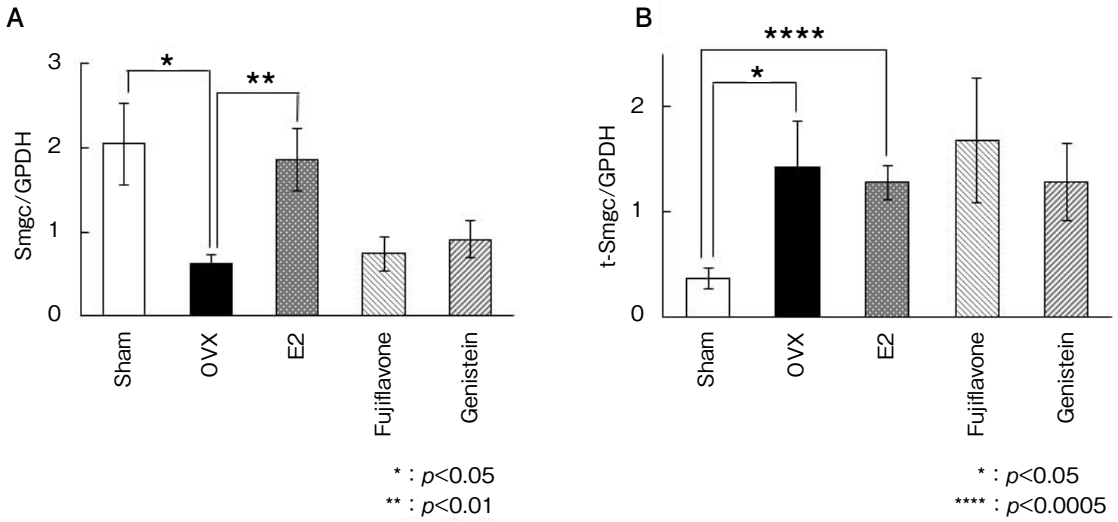


Fig. 3. Comparison of the expression of Smgc (A) and t-Smgc (B) mRNA between ovariectomized and sham-treated mice. Ovariectomized mice were treated as in Fig. 1. The bar graph shows the amplicon band intensity determined by densitometry (n=6-12, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0005$ , Student's *t*-test). Values are expressed as means  $\pm$  SE.

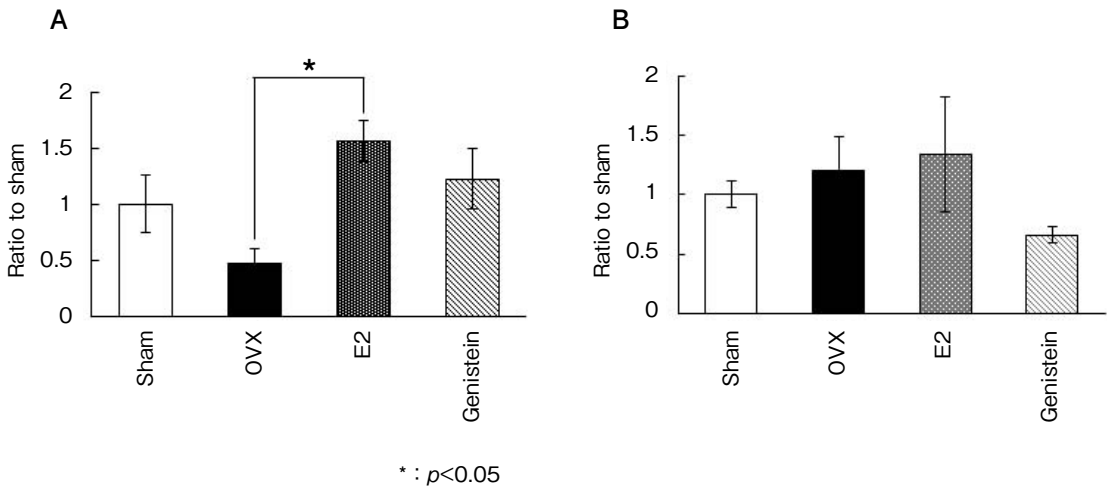


Fig. 4. Comparison of the amount of Smgc protein in saliva (A) and the submandibular gland (B) between ovariectomized and sham-treated mice. Ovariectomized mice were treated as in Fig. 1. The bar graph shows the band intensity determined by a chemiluminescent immune assay. The relative amount of the Smgc protein was determined by comparison with that of the sham-treated mice, which was defined as 1 (n=6-15, \* $p < 0.05$ , Student's *t*-test). Values are expressed as means  $\pm$  SE.

が明らかになった。

## 考 察

本研究では、大豆イソフラボンが唾液分泌に与える影響の評価を多面的に行った。データの量が不十分、且つイソフラボンの効果が観察されなかったため本報告書では割愛するが、味覚感受性および味覚受容体の発現量の変化の解析も同時に行ったことを申し添える。一連の実験の結果、顎下腺におけるSmgc遺伝子の発現量が女性ホルモンおよび大豆イソフラボンの摂取により増加することを見出した。イソフラボンの女性ホルモン様の効果は、ゲニステイン、グリシテイン、ダイゼインの順に強いとされており、フジフラボンに含まれるゲニステインは10%に過ぎない。Smgcの発現量が女性ホルモン投与、ゲニステイン摂取、フジフラボン摂取の順であることは、Smgcの発現が女性ホルモンにより制御されていることを強く示唆している。また、Smgcの発現量の測定がイソフラボンの唾液腺への影響を評価するツールとして有効であるこ

とを示唆するものである。

本研究の大きな目標は、ヒトの更年期女性のドライマウス症状におけるイソフラボンの効果の評価方法を確立することである。そこで、本研究では摂水量、唾液分泌量といった生体を傷つけない方法で評価することを検討した。しかしながら、女性ホルモンや大豆イソフラボンの投与が唾液分泌に与える影響を直接見出すことはできなかった。卵巣摘出による唾液の減少が非常に限定されていたこと、唾液の測定結果は個体差がかなり大きく、安定した結果を得ることが困難だったことが原因として挙げられる。一方、唾液中のSmgcたん白質量については、有意差はつかなかったものの、ゲニステイン摂取によるSmgcたん白質の増加を観察することができた。検出に用いた抗体には、非特異的なバンドの検出もあるなどの問題も残されており、より特異性の高い抗体を用いれば、唾液により、顎下腺の状態を評価することも可能になり、食品に含まれるイソフラボンを摂取することによるドライマウス症状の改善効果の評価も行えるようになるのではないかと考えている。

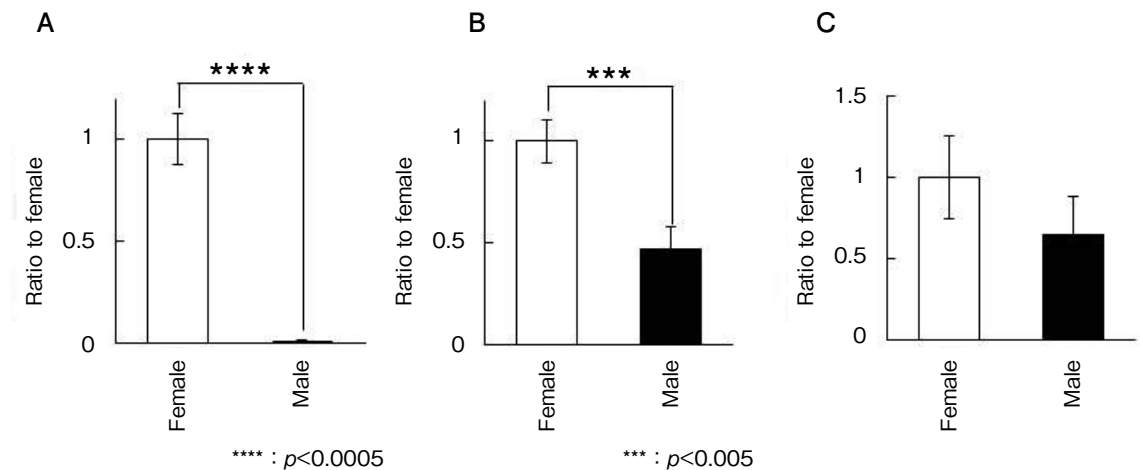


Fig. 5. The expression of Smgc in male mice. Comparison of Smgc mRNA in the submandibular gland (A) and protein in the submandibular gland (B) and saliva (C) between male and female mice is shown. The relative amounts of Smgc mRNA and protein were determined by comparison with those of the females, which were defined as 1 ( $n=6-25$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0005$ , Student's *t*-test). Values are expressed as means  $\pm$  SE.

## 要 約

口腔内が乾燥するドライマウスは、う歯の発生率を高くするばかりでなく味覚の感受性を変化させることから、生活の質に大きく影響する疾患の1つである。ドライマウスは更年期の女性に多い症状であり、女性ホルモンの投与がその改善に有効であると考えられるが、同時に副作用の懸念も存在する。そこで、女性ホルモンのエストロゲンと似た化学構造を有する大豆イソフラボンが代替物として期待されている。我々は、卵巣を摘出することにより人為的に閉経状態にしたハツカネズミを利用し、女性ホルモンおよび大豆イソフラボンの口腔内環境への影響の評価を行った。摂食・摂水量、唾液量、味覚感受性、味蕾および唾液腺における遺伝子発現様式、唾液たん白質などについて、卵巣を摘出したハツカネズミに女性ホルモンの投与あるいはイソフラボンを摂取させることによる変化を解析した。その結果、女性ホルモンの投与およびイソフラボンの摂食は唾液分泌や食行動には影響を及ぼさなかったが、Smgcの顎下腺における発現量および唾液中に含まれる量を改善させる傾向にあることが明らかになった。また、その効果は女性ホルモン様の効果の強さに比例していた。よって、顎下腺におけるSmgc遺伝子の発現量、および唾液中のSmgcたん白質量が唾液腺における女性ホルモンの影響を示すマーカーとして適していると考えられた。

## 文 献

- 1) Suri V (2014): Menopause and oral health. *J Mid-life Health* **5**, 115-120.
- 2) 日下部裕子 (2015): プロジェクト研究成果シリーズ (農林水産技術会議事務局), 529, 300-304.
- 3) Ball WD, Hand AR, Moreira JE and Johnson AO (1988): A secretory protein restricted to type I cells in neonatal rat submandibular glands. *Dev Biol*, **129**, 464-475.
- 4) Culp DJ, Latchney LR, Fallon MA, Denny PA, Denny PC, Couwenhoven RI and Chuang S (2004): The gene encoding mouse Muc19: cDNA, genomic organization and relationship to Smgc. *Physiol Genomics*, **19**, 303-318.