エクオール産生能の変動と胆汁酸の影響

武庫川女子大学　食物栄養科学部　食創造科学科

戸田 登志也

大豆食品に含まれるイソフラボンの一種ダイジン（D）は，ダイゼイン（De），ジヒドロダイゼイン（DHD）に代謝され，さらにエクオール（Eq）または*O*-デスメチルアンゴレンシン（*O*-DMA）に変換される。特にEqはエストロゲン活性が強いことから，種々の健康効果に影響する成分として注目を集めている。しかしながら，ヒトの場合，Eq産生者と非産生者が存在し，その産生能は個人によってほぼ固定的であると考えられている[1]。しかし，これまで行われてきた検討では，短期間隔の個人のEq産生能の変動について調べられた例はない。そこで，本研究では，被験者の尿中のイソフラボン代謝物量を，10ヵ月間継続的に分析し，個人のEq産生能の変化について検討した。

また申請者は，コール酸（CA）の投与により高脂肪食摂取時の腸内環境の変化を模したマウスにおいて，Eq産生の阻害およびデオキシコール酸（DCA）の増加を認めている[2]。ヒトの場合，脂質の過剰摂取により分泌量が増大する胆汁は，その一部（約5%）が大腸へ流入し，一次胆汁酸からさらに抗菌活性の強い二次胆汁酸に変換され，腸内細菌の構成バランスに強く影響すると考えられる[3]。本研究では，ヒトの主要な一次胆汁酸であるCAまたは二次胆汁酸であるDCAを培地に添加し，Eq産生者の糞便培養を行うことにより，in vitroで胆汁酸類のEq産生阻害活性を評価した。

【実験方法】

尿中イソフラボン代謝物の分析

被験者は20～30歳代健常女性7名とし，日常的な大豆食品の摂取制限は行わず，医薬品（特に抗生物質）の服用がないことを確認した。採尿に際し，調製豆乳（キッコーマン社製）200 mLを朝・夜に各１本（イソフラボンアグリコンとして90 mg/日を摂取），3日間連続して摂取した。3日目の早朝第1尿を排出後，第2尿から4日目の早朝第1尿までアリコートカップを用いて採取したものを24時間尿とした。また，3日目の夜，就寝前に完全に排尿後，夜間尿を含め4日目の早朝第１尿までを採取したものをオーバーナイト（ON）尿とした。採取した尿は，分析に供するまで-30℃で保存した。

イソフラボン代謝物の分析に際し，スルファターゼおよびグルクロニダーゼにより脱抱合処理を行い，Sep-Pak Light C18（Waters社製）により尿サンプルを精製した。HPLC（日立ハイテク社製）により，254 nm（D，De）および280 nm（DHD，Eq，*O*-DMA）においてイソフラボン代謝物を検出した。

培養法によるイソフラボン代謝の評価

安定的にEq産生能を示す被験者から採便を行い，グリセロール溶液に希釈後，供試まで-80℃で保存した。

ブレインハートインフュージョン培地にL-システイン，Dを含む大豆胚軸抽出物，各種胆汁酸類を濃度別に添加し滅菌後，糞便希釈液を添加した。アネロパック（三菱ガス化学社製）により嫌気的に37℃で4日間培養した。培養液を経時的にサンプリングし，イソフ

ラボン代謝物を酢酸エチルにより抽出し，HPLC分析を行った。

ヒトの消化管内の胆汁酸濃度を考慮し，CA（コール酸ナトリウム水和物，シグマ社製）は0～6.0 mmol/L，DCA（デオキシコール酸ナトリウム一水和物，ナカライテスク社製）は0～0.9 mmol/Lで検討を行った。

【実験結果および考察】

エクオール産生能の変動に関する評価

任意のひと月の 24 時間尿および ON 尿における各種 De 代謝物の割合（De, DHD, Eq, O-DMA の合計量に占める割合）を図 1 に示す。個人内では 24 時間尿および ON 尿の構成割合はほぼ一致した。被験者#1 および#6 は Eq が 50%以上を占め，高産生者とした。他の 5 名は低産生者とした。また，非産生者はいなかった。

ON 尿を連続 10 ヵ月採取し，尿中の De 代謝物量を分析した。Eq/De 比の月毎変動を図 2 に示す。高産生者である被験者#1 および#6 は，Eq 非産生の月はなかったが Eq/De 比の変動幅は大きかった。一方，低産生者の変動幅は小さかったものの，#5 以外の 4 名は Eq を検出できない月が存在した。このように，Eq の産生量によらず Eq/De 比，つまり Eq 産生能は短期間隔で変動しており，特に Eq 低産生者では，Eq 産生が確認できる時期と確認できない時期が比較的頻繁に入れ替わる可能性が示唆された。

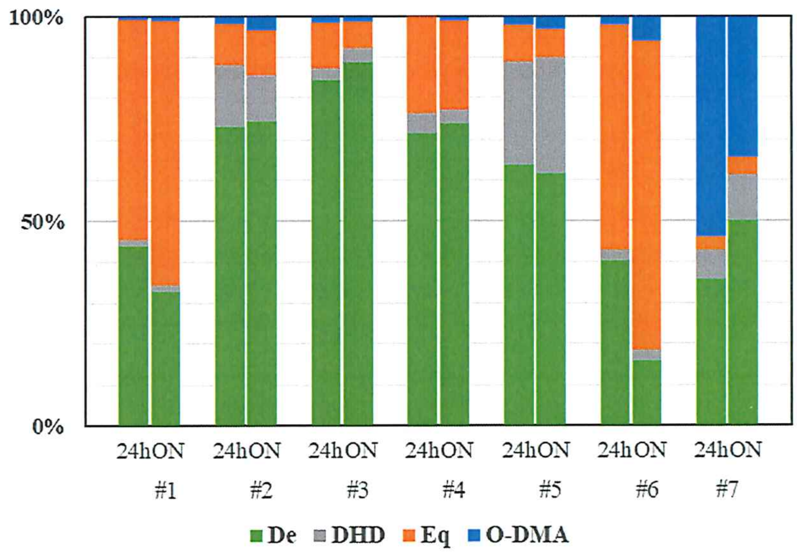

図 1. 24 時間尿および ON 尿における各種 De 代謝物の割合

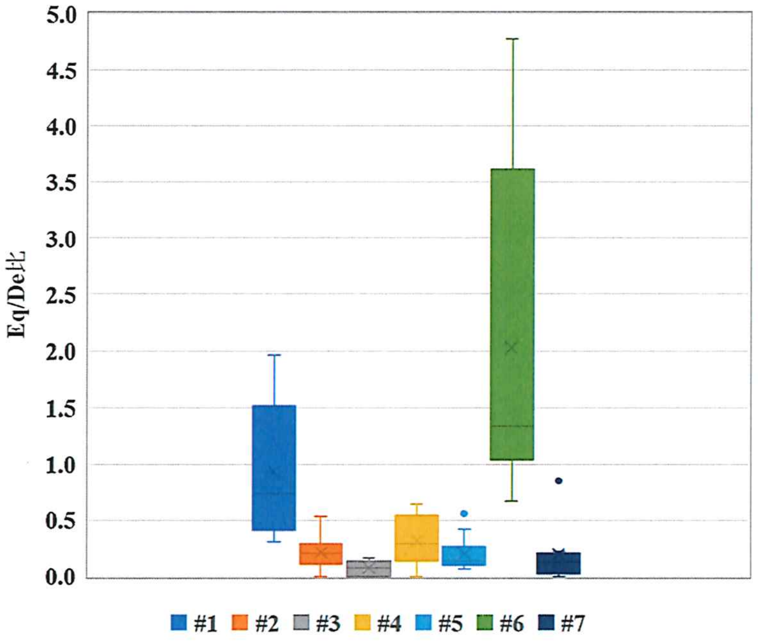

図 2. ON 尿における Eq/De 比の月毎変動
(×は被験者ごとの平均値，上下の－は最小値・最大値，
箱の上下は第一・第三四分位点，箱内部の一は中央値を示す。)

胆汁酸類のエクオール産生阻害活性の評価

個人内で Eq 産生能が短期的に変動する要因の一つとして，食事因子が考えられる。特に脂質の過剰摂取により分泌量が増大する胆汁酸は，その一部が大腸へ流入し，腸内細菌の構成バランスに影響することが報告されている。そこで，安定的に Eq 産生能を示す被験者の糞便サンプルを用いた培養により，胆汁酸類がイソフラボン代謝におよぼす影響について検討した。

胆汁酸非添加において，D は De，DHD，Eq と順に代謝され，4 日目にはほぼすべてが Eq に変換された。胆汁酸類を濃度別に添加したところ，4 日目においても Eq 産生が認められない場合があった。胆汁酸類の Eq 産生阻害活性を比較するため，培養 4 日目の Eq 産生量を図 3 に示す。CA は，2 mmol/L では Eq 産生量に影響をおよぼさなかったが，4 mmol/L 以上で Eq 産生を阻害した。DCA は，0.6 mmol/L 以下では Eq 産生量に影響しなかったが，0.9 mmol/L で Eq 産生を阻害した。乳酸菌やビフィズス菌などの腸内細菌に対する抗菌活性は，CA よりも DCA で強いことが報告されている [3,4)]。Eq 産生菌類に対しても DCA でより強い Eq 産生阻害が示された。以上のことから，胆汁酸は Eq 産生菌に影響をおよぼすと考えられた。

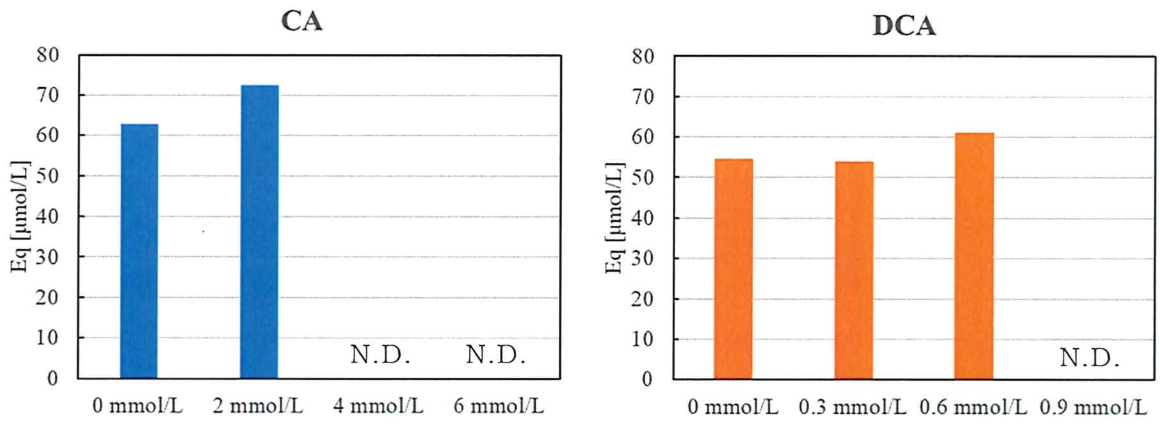

図 3. 培養 4 日目における Eq 産生量

【要約】

被験者 7 名の尿中イソフラボン代謝物量について，任意のひと月の 24 時間尿および ON 尿を分析した結果，両者の De 代謝物の構成割合はほぼ同様の傾向を示した。Eq の割合が 50%以上を占めた 2 名を高産生者，他の 5 名を低産生者とした。非産生者はいなかった。

ON 尿を連続 10 ヵ月採取した結果，高産生者 2 名はすべての月で Eq が検出されたが，Eq/De 比の変動幅は大きかった。一方，低産生者の変動幅は小さかったものの，4 名に Eq が検出できない月があった。このように，Eq/De 比は変動しており，産生能が確認できる時期と確認できない時期が比較的頻繁に入れ替わる可能性が示唆された。

個人内の Eq 産生能の変動要因の一つとして食事因子が考えられる。特に高脂肪食摂取により大腸への流入が増大する胆汁酸に着目し，培養法によって，生理学的濃度における胆汁酸類の Eq 産生阻害活性を評価した。その結果，胆汁酸類は Eq 産生を阻害し，さらにコール酸よりもデオキシコール酸が強い阻害活性を示すことが明らかになった。以上のことから，胆汁酸類が短期的にも Eq 産生に影響をおよぼす可能性が示唆された。

【謝辞】

本研究の遂行に多大なご支援をいただきましたタカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。

【文献】

1) Lucía Guadamuro, Susana Delgado, Begoña Redruello, Ana B. Flórez, Adolfo Suárez, Pablo Martínez-Camblor and Baltasar Mayo. Equol status and changes in fecal microbiota in menopausal women receiving long-term treatment for menopause symptoms with a soy-isoflavone concentrate. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-10(2015).

2) Hiroko Yoshioka, Masamichi Watanabe, Fumio Nanba, Toshio Suzuki, Satoru Fukiya, Atsushi Yokota and Toshiya Toda. Administration of Cholic Acid Inhibits Equol Production from Daidzein in Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 66, 571–576 (2020).

3) 横田篤. 胆汁酸を責任分子と想定した西欧食による腸内細菌叢崩壊機構の解明. *IFO Res. Commun*, 30, 47-56 (2016).

4) Yuan Tian, Wei Gui, Imhoi Koo, Philip B. Smith, Erik L. Allman, Robert G. Nichols, Bipin Rimal, Jingwei Cai, Qing Liu and Andrew D. Patterson. The microbiome modulating activity of bile acids. *GUT MICROBES*, 11(4), 979–996 (2020).