

令和元年6月25日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07738

研究課題名(和文) イソフラボン腸内細菌代謝物エコール抱合体は消化管に作用し雌ラットの食欲を抑制する

研究課題名(英文) Isoflavone enteric bacterial metabolite equol conjugate acts on the digestive tract and suppresses appetite in female rats

研究代表者

岸田 太郎 (Kishida, Taro)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：80304658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：過食の防止は肥満をはじめ多くの生活習慣病の予防・治療において重要である。先に我々は大豆イソフラボン・ダイゼインを雌ラットに与えると飼料摂取量が低下することを見出し、血中濃度及び胆汁中濃度からダイゼインの腸内細菌代謝物エコールが活性本体であることを明らかにした。胆汁中濃度が高かったことから腸肝循環しながら消化管を介して食欲を抑制する可能性がある。本研究では胆汁中エコールがグルクロン酸及び硫酸で抱合されその抱合型には大きな性差があり作用に大きく関与していることが示唆された。また、エコールが胃排泄遅延を介して作用をもたらしている可能性が示唆され、胃排泄と関連がある視床下部遺伝子発現の変更も見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過食は肥満をはじめ多くの生活習慣病のもっとも大きな原因のひとつであり、過食の防止は生活習慣病の予防・治療において重要である。先に我々は大豆イソフラボンを雌ラットに与えると(50～150 mg/kg飼料)飼料摂取量が低下することを見出した。大豆イソフラボンはエストロゲン作用を持ち、食欲抑制はエストロゲン作用の一つだが大豆イソフラボンが卵巣摘出メスラットの飼料摂取量を低下させた際、卵巣摘出による子宮重量の萎縮は全く改善されなかった。我々はエストロゲン作用とは全く異なる機構が存在すると考えた。本研究は大豆イソフラボンが、腸肝循環しながら消化管を介して食欲を抑制する新しい機構の解明を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：The prevention of overeating is important in the prevention and treatment of many lifestyle-related diseases including obesity. We previously found that dietary daidzein, a major soy isoflavone, reduced food intake in female rats and revealed from the blood and bile levels that equol, an enteric bacterial metabolite of daidzein, is the active substance. Because the bile concentration is higher level, it is possible to suppress the appetite through the digestive tract while circulating in the enterohepatic circulation. In this study, it was suggested that bile equol was conjugated with glucuronic acid and sulfuric acid, and the conjugation type had sex difference and involved in the sex-specific action. In addition, it was suggested that equol might have an effect via gastric emptying delay, and changes in hypothalamic gene expression associated with gastric emptying were also seen.

研究分野：栄養科学

キーワード：大豆イソフラボン 食欲抑制 ラット 視床下部 胃排泄 腸肝循環

1. 研究開始当初の背景

大豆イソフラボンによる雌特異的な飼料摂取量の低下

過食は肥満をはじめ多くの生活習慣病のもっとも大きな原因のひとつであり、過食の防止は生活習慣病の予防・治療において重要である。先に我々は大豆イソフラボンを雌ラットに与えると(50~150 mg/kg 飼料)飼料摂取量が低下することを見出し¹⁾²⁾、これが主要な大豆イソフラボンのひとつダイゼインに特有な効果であることを明らかにした³⁾。さらに血中濃度からダイゼインの腸内細菌代謝物エコールが活性本体であることを明らかにした。大豆イソフラボンのエストロゲン作用についてはエストロゲン欠乏による骨粗鬆症の改善効果等の機構として⁴⁾議論されている。しかし、大豆イソフラボンが卵巣摘出メスラットの飼料摂取量を低下させた際、卵巣摘出による子宮重量の萎縮は全く改善されなかった¹⁾。また、エストロジオールの投与はオスおよび卵巣摘出メスの飼料摂取量を低下させたが、メスには効果はなかった¹⁾。

大豆イソフラボンが、腸肝循環しながら消化管を介して食欲を抑制する可能性があるダイゼインを摂取した際、エコールは血中よりもはるかに多く胆汁中に存在することが見出された。これまでの検討で、ダイゼイン摂取時に採取した胆汁を、ダイゼインを摂取させていないラットの十二指腸より注入したところ、注入開始 12 時間目以降飼料摂取量が低下する傾向が見られた。この際、食欲抑制ホルモンコレシストキニン(CCK)の小腸粘膜遺伝子発現が有意に上昇し、プレプログルカゴン(PPG)およびペプチド YY(PYY)にも上昇の傾向が見られた⁶⁾。しかし、コレシストキニン感受性を欠損することにより過食性の肥満を引き起こす OLETF ラットにおいてもダイゼインおよびエコールの混餌投与により飼料摂取量の低下が認められ、コレシストキニンの関与は否定された。

遊離エコールをラット十二指腸に注入しても飼料摂取量は低下しなかった。

先の胆汁注入実験とまったく同様の系で遊離エコールを注入したが、飼料摂取量が低下することは無かった。この際血中の総エコール濃度はダイゼイン混餌投与で飼料摂取量の低下が観察された際と同レベルに速やかに上昇していた。

大豆イソフラボンは抱合体として生体内に存在し、抱合体タイプは雌雄で大きく異なる。大豆イソフラボン摂取時血中に存在するイソフラボンはグルクロン酸または硫酸抱合体であることが報告されている。エコールについてはまだ報告はほとんど無いが、ダイゼイン摂取時にオスラットでは尿中排泄されたダイゼインの約 3 分の 2 がダイゼイン硫酸抱合体、の約 3 分の 1 がダイゼイングルクロン酸抱合体であったが、メスラットではほとんどがグルクロン酸抱合体であり、硫酸抱合体はごく僅かであった⁷⁾。エコールでも抱合体タイプが雌雄で異なる可能性は高い。

1) Kishida T, Ebihara K, et. al. 上原記念生命科学財団研究報告集, 19 : 121-123, 2005.

2) Kishida T, Ebihara K, et. al. Obesity, 16(2), 290-297, 2008.

3) Kishida T, Ebihara K, et. al. Soy Protein Research, Japan 8, 56-62, 2005.

4) Kurzer MS, Xu X., Annu Rev Nutr;17:353-381, 1997.

5) Kishida T, Ebihara K, et. al. Soy Protein Research, Japan 10, 55-58, 2007.

6) 藤谷 美菜、岸田 太郎、海老原清 et. al. 第 14 回日本食物繊維学会講演要旨集 82-83, 2009.

7) Bayer T, Dekant W, et. al., Toxicol Sci;62:205-211, 2001.

2. 研究の目的

申請の研究は次の(1)(2)のプロセスにより大豆イソフラボンの腸内細菌代謝物・エコールが抱合体として、腸肝循環しながら消化管を介して食欲を抑制する機構を解明することを目指した。また、(2)の検討過程で新たに作用機構との関連が示唆された、大豆イソフラボン摂取による胃排泄の遅延について検討した。

- (1) 雌雄ラットのダイゼイン摂取時の胆汁中エコール抱合体タイプの特定
- (2) 抱合型エコールが消化管および視床下部の食欲制御機構に与える影響
- (3) 抱合型エコールが、胃排泄に及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) 雌雄ラットのダイゼイン摂取時の胆汁中エコール抱合体タイプの特定

56 匹の 6 週齢オス SD 系ラットと 63 匹の 6 週齢メス SD 系ラット(日本 SLC 株式会社、春野支所)を室温(22±1℃) 12 時間の明暗サイクル(明記 3:00-15:00)に保ち、ステンレス製ケージ内で個別飼育した。実験動物搬入時から環境に馴化させ、その後 AIN-93 組成に基づくコントロール(C)飼料をオス(n=7)メス(n=8)、ダイゼイン(D150)(150 mg/kg 飼料)飼料をオス(n=26)メス(n=28)、ダイゼイン(D300)(300 mg/kg 飼料)をオス(n=26)メス(n=28)に群分けを行い、自由摂取で 2 週間飼育を行った。飲料水は自由摂取させた。体重は本飼育開始時と胆汁採取日に記録し、飼料摂取量は毎日記録した。麻酔下開腹後胆管に注射針(21 G 1/2" TERUMO)で穴を開け、胆汁採取用カニューレ(Polyethylene Tubing I.D.0.58 mm O.D.0.965 mm INTRAMEDIC、ファイコンチューブ(0.5-1.0)富士システムズ株式会社)を挿入し胆汁を 1.5 ml

ずつ採取した。採取した胆汁は-60 で保存した。

胆汁中エコール濃度測定：strataXにメタノール1 mLを通した後、加水分解バッファー（酢酸ナトリウム 0.082 g、アスコルビン酸 0.01 g、EDTA・2Na 1 mg /10 mL MilliQ 水、pH 5.0）1 mLを通した。その後、加水分解バッファー100 μ L、グルクロニダーゼ（ β -Glucuronidase from *Helix pomatia* Type H-2、シグマアルドリッチジャパン）8 μ L およびスルファターゼ（Sulfatase solution from *Helix pomatia*、シグマアルドリッチジャパン）4 μ L の混合液を strataX に通し回収した。総エコール濃度を測定する場合、回収した混合液112 μ L をエッペンに分注し、-60 で保存しておいた胆汁サンプル1 μ L、内部標準ホルモノネチン（5 μ g/mL）10 μ L、内部標準ゲニステイン（5 μ g/mL）10 μ L を加え混合し、37 に設定した恒温槽の中で少なくとも15時間放置し脱抱合させた。脱抱合させずに、遊離体エコール、エコール抱合体濃度を測定する場合、加水分解バッファー100 μ L をエッペンに分注し、胆汁サンプルを1 μ L、内部標準ホルモノネチン（5 μ g/mL）10 μ L、内部標準ゲニステイン（5 μ g/mL）10 μ L を加え混合し、37 に設定した恒温槽の中で少なくとも15時間放置した。その後0.1%ギ酸アセトニトリル 1214 μ L（酵素を加えていないサンプルは1100 μ L）を加え混合し、超音波粉碎機で抽出した後、4、15分間、12000 rpm、遠心分離機（MX-160、TOMY）で遠心し、上清を試験管に移した。残渣に0.1%ギ酸アセトニトリルを395 μ L 加えもう一度抽出を行い、上清を同じ試験管に回収した。回収した上清を遠心エバポレーター（CC-105、TU-105、TOMY）で蒸発乾固させ、移動相 B10%（スタート移動相）100 μ L で再構成し、フィルター（0.20 μ m）を通しバイアルに移したものを LC-Tof-MS 分析用サンプルとした。LC-Tof/MS、LC-Q-Tof/MS/MS(UPLC、Acquity ultra performance LC、Waters) (XEVO G2-S QToF、Waters)による分析の条件は以下に示す。

Column : Xterra MS C18(5 μ m, 2.1 \times 150 mm)

Mobile phase A: 0.1% formic acid / water, Mobile phase B: 0.1% formic acid / acetonitrile

0 min: Mobile phase A 90%, Mobile phase B 10%

12-14 min: Mobile phase A 40%, Mobile phase B 60%

20 min: Mobile phase A 90%, Mobile phase B 10%

Column temperature : 40

Flow rate : 0.50 mL/min

Injection volume : 7.5 μ L

Ionization mode : Electro spray ionization, negative-ion mode

Capillary voltage : 2500 V

Cone gas : 50 L/h

Desolvation Gas : 1000 L/h

Collision energy : 15-30 eV

総胆汁中胆汁酸測定：0.01 M のタウロコール酸を0、5、10、20、30 μ L、メタノールを順に30、25、20、10、0 μ L 加え全量を30 μ L にしたものを標準液とした。0.05 M CAPSbuffer（ ）と、0.5 M セミカルバジド溶液（ ）を使用直前に 19 : 1 の割合で混合し、この溶液20 mL に対して NAD を25 mg 加えたものを保存液として使用した。胆汁サンプル5 μ L とメタノール95 μ L をエッペンに分注し、よく混合した後遠心分離（4、3分、15000 rpm）した。上澄みを胆汁酸測定用マイクロプレートに5 μ L ずつ分注し、保存液：酵素溶液 = 27 : 1 の混合液を8 チャンピペットで265 μ L ずつ加えた。次にマイクロプレートインキュベーターで37、30分保温した。保温したサンプルを室温に戻し5~10分放置した後、340 nm で吸光度を測定した。

(2) 抱合型エコールが消化管および視床下部の食欲制御機構に与える影響

42匹の6週齢メス SD ラット(日本 SLC 株式会社、春野支所)を室温 22 \pm 1、12 時間の明暗サイクル(明期 20:30-8:30)で、ステンレス製ゲージ内において個別飼育した。

実験動物搬入翌日に、すべてのラットに卵巣摘出(OVX)手術を行った。術後、4日間手術の影響による回復、環境に対する馴化を AIN-93 組成に基づくコントロール飼料、飲水ともに自由摂取で飼育を行った。その後、3食制の食餌パターンに馴化させるために9日間9:00-10:00(1食目)、12:00-13:00(2食目)、15:00-16:00(3食目)のスケジュールで飼育を行った。馴化は回復期間の4日目の16:00から翌日の1食目を摂取するまで絶食をさせて、馴化を開始している。これは、3食制の馴化に対応させるために行っている。3食制に馴化後、コントロール群(C150、C300)、ダイゼイン(D150、D300)群(150 mg/kg diet、300 mg/kg diet)各 n=8 に群分けし、本飼育を C150、D150 群は15日間、C300、D300 群は5日間行い、2食目の食前に解剖を行った。

解剖日では断頭後脳を摘出し、視床下部を採取した。採取した視床下部は、エッペンチューブに入れ液体窒素で凍結した後、分析まで-80 で保存した。食道と胃を切り離し、幽門部分で小腸と分離し、胃を摘出して全重量(g)を測定した。小腸を摘出し、脱イオン水で内容物を洗い出した後、粘膜を回収し分析まで-80 で保存した。腸間膜脂肪組織、卵巣周囲脂肪組織および腎臓周囲脂肪組織を摘出し、その重量(g)を測定した。

視床下部サンプル全量にセパゾール RNA Super G (8-キノリノール含有、ナカライ、100ml、Code:09379-84)を900 μ L を加え、ホモジナイズし、室温で5分間静置した。これにクロロホルム 200 μ L を加え、転倒混和し、室温で3分間静置し、遠心分離(13,600 rpm、4、15分間)した。上層 500 μ L を1.5 mL エッペンチューブに採取し、これにグリコーゲン 2 μ L とイソブ

ロパノール 500 μ L を加え、転倒混和し、室温で 10 分間静置した。遠心分離 (13,600 rpm、4、10 分間) して Total RNA を沈殿させた後、上清を取り除き、氷冷した 75% エタノールを 1 mL 加えて洗浄した。その後、遠心分離 (13,600 rpm、4、5 分間) し、上清を取り除き、沈殿を 2 分間乾燥させた。これに氷冷した MilliQ 水 50 μ L を加え、完全に溶解し、氷冷した。10 \times DNase buffer 10 μ L、RNase inhibitor 1 μ L、DNase 0.4 μ L、MilliQ 水 38.6 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間ディネーターした。MilliQ 水 260 μ L とフェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコールの混合液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25:24:1 (v/v/v)) 100 μ L を加え、転倒混和し、遠心分離 (13,600 rpm、20、10 分間) した。上層約 250 μ L を 1.5 mL エッペンチューブに採取し、100% エタノール 250 μ L および 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 10 μ L を加え、転倒混和し、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。その後、遠心分離 (13,600 rpm、4、10 分間) し、上清を取り除き、氷冷した 75% エタノールを 1 mL 加えて洗浄した。この洗浄をもう一度行い、遠心分離 (13,600 rpm、4、5 分間) し、上清を取り除き、沈殿を 2 分間乾燥させた後、氷冷した MilliQ 水 10 μ L を加え、完全に溶解し、Total RNA 溶液とした。ホルムアルデヒド変性アガロースゲル (1% アガロース、Seaken GTG アガロース (タカラ)、MilliQ 水 62.2 mL、5 \times MOPS バッファー (0.2 mM MOPS 83.72 g、50 mM 酢酸ナトリウム三水和物 13.6 g、0.5 M EDTA (pH8.0) 20 mL/2 L MilliQ 水、pH 7.0) 20 mL、ホルムアルデヒド 17.8 mL) をゲル板に流し込み少なくとも 90 分間以上静置し、ゲルを固めた。泳動バッファーは 1 \times MOPS バッファーとした。Total RNA 溶液 1 μ L に、5 \times MOPS バッファー、ホルムアルデヒド、ホルムアミドおよび MilliQ 水の混合液 (4:7:20:7 v/v/v/v) を 15.1 μ L 混合し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間ディネーターした後、急冷し、さらに 0.1% 臭化エチジウムを加えた 5 \times dye-グリセロール (グリセロール 25 mL、0.5 M EDTA 100 μ L、プロモフェノールブルー 200 mg/50 mL MilliQ 水) 2 μ L を加えた後、ゲルにアプライした。泳動は 98 V で行った。泳動後、300 nm UV を照射し、5 S、18 S および 28 S リボゾーマル RNA の存在を確認した。Total RNA 抽出液 1 μ L に DEPC 処理水 (ナカライテスク) 18 μ L、25 mM MgCl₂ (日本ジーン) 8 μ L、10 \times RNA PCR Buffer (100 mM Tris-HCl 0.788 g、KCl 1.86375 g/30 mL MilliQ 水) 4 μ L、dNTP Mix (ロツシュ) 4 μ L、AMV RTase (タカラ、1 U/ μ L DEPC 処理水) 2 μ L、Oligo-dT primer (ノバゲン、2.5 pmol/ μ L DEPC 処理水) 2 μ L および RNase inhibitor (タカラ) 1 μ L を混合し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) によって反応 (30、10 分間、55、20 分間、95、5 分間、5、5 分間) し、cDNA を合成した。cDNA サンプル 2 μ L に DEPC 処理水 6 μ L、THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (東洋紡) 10 μ L、および測定する目的遺伝子のプライマー 2 μ L (DEPC 処理水 90 μ L に sense、antisense Primer をそれぞれ 5 μ L 混合したもの) を混合した後、PCR 用プレート (ファストジーン 96 well PCR プレート、日本ジェネティクス株式会社) に分注した。この混合液を StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) によってディネーター (95、10 分間)、PCR [変性 (95、15 秒)、アニーリング、伸長反応 (60、1 分間)] を行った。全サンプルの蛍光強度の上昇した傾きが揃っている Threshold Cycle (Ct) 値を記録し、Ct 値から目的遺伝子発現量を求め、mRNA の収量を補正するため、ハウスキーピング遺伝子である β -actin の遺伝子発現量に対する比 (相対遺伝子発現量) を算出した。

凍結乾燥した小腸粘膜サンプル 0.2 mg に氷冷したメタノール 1000 μ L を加え、20 秒間ボルテックスし、ソニックで 30 分間抽出した。2000 g、4、10 分間、遠心分離機 (MX-160、TOMY) で遠心し、上澄み溶液を試験管に移した。氷冷メタノールでの抽出をさらに 2 回繰り返し、同様に試験管に移し、遠心エバポレーター (CC-105、TU-105、TOMY) で蒸発乾固させた。メタノール:1% 酢酸 = 40:60 溶液 100 μ L で再溶解し、HPLC 分析サンプルとした。HPLC 分析は (1) と同様に行った。

(3) 抱合型エコールが、胃排泄に及ぼす影響

70 匹の 6 週齢メス SD ラット (日本 SLC 株式会社、春野支所) を室温 22 \pm 1 $^{\circ}$ C、12 時間の明暗サイクル (明期 20:30-8:30) で、ステンレス製ゲージ内において個別飼育した。

実験動物搬入翌日に、すべてのラットに卵巣摘出 (OVX) 手術を行った。術後、4 日間手術の影響による回復、環境に対する馴化を AIN-93 組成飼料、飲水とともに自由摂取で飼育を行った。その後、22 時間制限食、12 時間制限食、3 時間制限食、2 時間制限食、1 時間制限食の飼育環境に馴化させるために 10 日間飼育を行った。摂取開始時間は各制限食条件ともに 9 時から摂取開始とした。各制限食の馴化後、それぞれコントロール群 (C)、ダイゼイン (D) 群 (300 mg/kg diet) 各 n=6 に群分けし、本飼育を 7 日間行い、胃内容物排出量を測定した。

解剖日ではすべての制限食条件のラットを 1 時間 (9:00-10:00) のみ自由摂取可能とした。その後、2 時間絶食をさせてから、断頭により屠殺した。食道と胃を切り離し、幽門部分で小腸と分離し、胃を摘出して全重量 (g) を測定した。測定後、1 晩オープンで乾熱させピーカー重量を測定したピーカーに胃の内容物を取り出し、胃内容物湿重量 (g) を測定した。解剖後、すぐに恒量を 24 時間程度行い再度ピーカー重量の測定をした。この重量からピーカーのみの重量を引くことで得られた重量を胃内容物乾燥重量として算出した。さらに胃内容物湿重量から胃内容物乾燥重量を引くことにより得られた重量を水分量として算出した。

解剖当日の 1 時間の飼料摂取量も測定を行い以下の式により胃内容物排出率、胃内容物排出量を算出した。

胃内容物排出率 (%) = { (1 時間の飼料摂取量 - 胃内容物乾燥重量) / 1 時間の飼料摂取量 } \times 100

胃内容排出量(g)=1時間の飼料摂取量-胃内容物乾燥重量

4. 研究成果

(1) 雌雄ラットのダイゼイン摂取時の胆汁中エコール抱合タイプの特定

体重、体重増加量、飼料摂取量

Tof/MSによる胆汁分析

本実験については D300 群でのみダイゼインの雌特異的な食欲抑制作用が確認されたため、D300 群の胆汁サンプルを用いて測定を行った。濃度測定に用いた検量線は $R^2 > 0.98$ を示した。胆汁中の総エコール濃度はオスに比べてメスで有意に高く、その内主な抱合体として定量したグルクロン酸抱合体濃度がメスで有意に高かった。硫酸抱合体について有意差はなかった。また、およそではあるが、オスとメスの総エコール濃度の差はグルクロン酸抱合体濃度の差と同等であった。LC-Tof/MS によって定量すると、エコールグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体濃度の合計は総エコール濃度に匹敵せず、この2種類以外の未知の抱合体が存在する可能性があった。そこで、LC-Tof/MS から得られた TIC から、エコールの抱合体として考えられる化合物の精密質量を用いて探索を行ったところ、硫酸グルクロン酸抱合体(精密質量:498.083)と思われるピーク(497.075 m/z)が確認された。このピークを標的としてエネルギーを加え、どのようなフラグメントイオンが生成されるか観察すると、417.118 m/z、321.044 m/z、241.088 m/z のスペクトルが確認された。オスとメスのすべての群で胆汁中胆汁酸濃度を測定した。メスでは C 群と比較して、D150、D300 両群で減少傾向が見られた。オスでは C 群に対し、D150 群で増加傾向が確認され、D300 群で有意差は無かった。

(2) 抱合型エコールが消化管および視床下部の食欲制御機構に与える影響

C150、D150 群においては体重で群間の有意な差は見られなかった。しかし、15 日間の体重増加量では有意な減少、総飼料摂取量においては減少傾向が D150 群で見られた。3 食制のそれぞれの日々の飼料摂取量については、主に3食目にダイゼインによる食欲抑制作用が見られた。

C300、D300 群においても体重で群間の有意な差は見られなかった。さらに、5 日間の総飼料摂取量においても群間で有意な差は見られなかった。しかし、D150 群と同様に5日間の体重増加量においては D300 群で有意な減少が見られた。さらに、3 食制における各1時間の飼料摂取量では2食目のみにダイゼインの食欲抑制作用が見られた。C150、D150 群においては腎周囲脂肪組織重量、卵巣周囲脂肪組織重量、腸間膜周囲脂肪組織重量、白色脂肪組織重量で群間の有意な差は見られなかった。しかし、胃全重量において D150 群で有意な増加が見られた。C300、D300 群においては卵巣周囲脂肪組織重量、腸間膜周囲脂肪組織重量で群間の有意な差は見られなかった。しかし、腎周囲脂肪組織重量においては D300 群で減少傾向が見られ、白色脂肪組織重量でも減少傾向が見られた。しかし、胃全重量においては有意な差は見られなかった。

C150、D150 群においては食欲促進因子である orexin mRNA 量が D150 群で減少傾向が見られ、食欲抑制因子である urocortin mRNA 量、CRH mRNA 量が D150 群で有意な増加が見られた。C300、D300 群においてはどの食欲調節因子でも群間で有意な差が見られなかった。C150、D150 群と C300、D300 群ともに小腸粘膜中にイソフラボン存在しなかった。

(3) 抱合型エコールが、胃排泄に及ぼす影響

3 時間制限食においては体重、体重増加量、総飼料摂取量で群間の有意な差は見られなかった。しかし、日々の飼料摂取量の推移においてはダイゼイン摂取による食欲抑制作用が3日目、7日目で見られた。12 時間制限食においては体重、体重増加量、総飼料摂取量でダイゼイン摂取による有意な減少がみられた。さらに、日々の飼料摂取量の推移においてダイゼイン摂取による食欲抑制作用が4日目から継続的にみられた。22 時間制限食においても12 時間制限食と同様のダイゼイン摂取による作用が見られた。

胃重量、水分量、胃内容物乾燥重量は3時間制限食ではすべての群間で有意な差は見られなかった。同様に、12 時間制限食でも群間で有意な差は見られなかった。しかし、22 時間制限食では胃重量においてダイゼイン摂取で有意な減少がみられたが、他の分析項目においては群間で有意な差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Dietary daidzein induces accumulation of S-equol in enterohepatic circulation to far higher levels than that of daidzein in female rats with and without ovariectomy

FUJITANI M, MIZUSHIGE T, BHATTARAI K, Sudhashree ADHIKARI^{1,3}, Junji ISHIKAWA⁴, and Taro KISHIDA¹,
Biomedical Research (Tokyo) in press

Dietary daidzein, but not genistein, has a hypocholesterolemic effect in non-ovariectomized and ovariectomized female Sprague-Dawley rats on a cholesterol-free diet.

Bhattarai K, Adhikari S, Fujitani M, Kishida T
Bioscience, biotechnology, and biochemistry 81(9) 1805-1813 2017.

〔学会発表〕(計 9 件)

阿部恭大・泉智明・岸田太郎．ダイゼインの雌ラット特異的食欲抑制機構解明を目的とした 3 食制飼育条件の確立．第 70 回日本栄養・食糧学会大会．講演要旨集 216．神戸．2016 年 5 月．

小林拓広・阿部恭大・岸田太郎．ダイゼイン代謝物であるエコールは視床下部での Urocortin mRNA の上昇を引き起こすことでメスラットの飼料摂取量を低下させる．第 46 回日本農芸化学会中四国支部講演会．高知．講演要旨集 47 (WEB ONLY)．2016 年 9 月．

小林拓広・阿部恭大・藤谷美菜・岸田太郎．雌ラットにおいてダイゼイン代謝物エコールは視床下部 Urocortin mRNA を増加させ、飼料摂取量を低下させる．第 49 回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会．徳島．講演要旨集 23．2016 年 10 月．

阿部恭大・小林拓広・藤谷美菜・岸田太郎．ダイゼインは胃内容排出を遅延させ、飼料摂取量を減少させた．日本農芸化学会 2017 年度大会．京都．講演要旨集 210 (WEB ONLY)．京都．2017 年 3 月．

小林 拓広・阿部 恭大・藤谷 美菜・岸田 太郎．ダイゼイン摂取は胃内容排出を遅延させることで雌特異的に飼料摂取量を低下させる．第 71 回日本栄養・食糧学会大会．講演要旨集***．沖縄 2017 年 5 月．

小林拓広・阿部恭大・岸田太郎．ダイゼイン代謝物であるエコールは視床下部での Urocortin mRNA の上昇を引き起こすことでメスラットの飼料摂取量を低下させる．第 46 回日本農芸化学会中四国支部講演会．高知．講演要旨集 47 (WEB ONLY)．2016 年 9 月．

阿部恭大・小林拓広・藤谷美菜・岸田太郎．ダイゼインは胃内容排出を遅延させ、飼料摂取量を減少させた．日本農芸化学会 2017 年度大会．京都．講演要旨集 210 (WEB ONLY)．京都．2017 年 3 月．

雌ラットにおいてダイゼイン摂取は胃内容排出の遅延を介して食欲を抑制するのか？

吉良 真結, 阿部 恭大, 小林 拓広, 藤谷 美菜, 岸田 太郎
第 72 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 岡山 2018 年 5 月

屋敷 哲良、小林 拓広、吉良 真結、藤谷 美菜、岸田 太郎．卵巣摘出ラットにおいてダイゼイン摂取は非 空腹時の食欲を低下させ、視床下部 urocortin 遺伝子発現を増加させる、第 73 回日本栄養・食糧学会大会．講演要旨集．静岡 2019 年 5 月．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。