

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700761

研究課題名（和文）大豆イソフラボンの安全で有効な摂取基準の確立

研究課題名（英文）Establishment of safely and effectively consumption methods of soy isoflavone

研究代表者

小林彰子 (KOBAYASHI SHOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90348144

研究成果の概要（和文）：イソフラボンの過剰摂取は内分泌攪乱のリスクがあることから摂取基準が定められている。大豆イソフラボンには、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、およびこれらの配糖体が存在するが、腸管における吸収率に関しては同等とされ区別されていない。本研究では、構造別イソフラボンの詳細な消化管吸収機作を解析し、吸収特性を比較検討することを目的とした。消化管吸収機作の解析には腸管のモデルとしてヒト結腸がん由来 Caco-2 を用いた。速度論的に透過機作を解析した結果、大豆イソフラボンアグリコンは、pH 依存型の高い吸収特性を示した。Caco-2 における物質の吸収は受動輸送と能動輸送の両経路が混在している。そこで、受動輸送のみを観察することができる人工脂質膜 (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA) を用いてこれらアグリコンの吸収性を調べた。イソフラボンアグリコンは、PAMPA においても効率的に吸収されたことから、受動輸送において高吸収性を示すことが示唆された。これらのイソフラボンアグリコンは実際の消化管内でも高吸収性を示す可能性が高いことから、摂取する際には注意が必要である。また、イソフラボン以外のフラボノイドアグリコンの詳細な透過機構を同様に解析した。フラバノンの PAMPA における透過速度は化学計算ソフト (Marvin Sketch program : [http:// www. chemaxon. com/marvin](http://www.chemaxon.com/marvin)) によって算出された logD 値と正の相関を示した。Caco-2 および PAMPA において pH 依存型の透過性が観察され、計算ソフトによる分子型存在比より、これらの化合物は pH 分配仮説により速やかに受動輸送されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Excessive ingestion of isoflavones may result in endocrine disruption, hence a maximum intake level needs to be established. Soy isoflavones contain isoflavone aglycones, such as genistein, daidzein, and glycitein, and their glycosides, which are considered to have the same intestinal permeability. In this study, we aimed to evaluate in detail the absorption mechanisms of these isoflavones, and examine by comparing the characteristics of absorption. We performed in vitro studies using Caco-2 cells and an artificial membrane permeation assay (PAMPA) with different pH gradients and iso-pH conditions. The permeability coefficients of some isoflavone aglycones were greater in the presence of a proton gradient than its absence. Furthermore, passive and active transports were observed in Caco-2 cells. Evaluation of passive transport by PAMPA suggested that isoflavone aglycones were transported efficiently by passive diffusion. These aglycones have been suggested to have high permeability in the human intestine. Therefore, care should be taken when consuming these compounds. Furthermore, we evaluated the absorption of other flavonoid aglycones in the same manner. A comparison of the permeability characteristics among flavanones using Caco-2 cells and PAMPA as well as consideration of their physicochemical properties, suggested that the flavanones were transported efficiently via passive diffusion according to the pH-partition hypothesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学

キーワード：イソフラボン, 消化管吸収, 人工脂質膜, Caco-2, pH 分配仮説

1. 研究開始当初の背景

大豆イソフラボンは生体内でエストロゲンレセプターと結合し、がん細胞増殖抑制、発がん抑制、骨密度の改善など様々な生理機能を発揮する。特に閉経後のエストロゲン分泌の低下した女性に対し、骨粗鬆症および乳癌などの予防効果が期待されており、大豆イソフラボンを強化・濃縮した特定保健用食品が開発されている。日本人はこれまで伝統的に大豆製品を習慣的に摂取してきたが、大豆イソフラボンのみを濃縮した食品を摂取した食経験はなく、有効性と安全性について確立されていなかった。そのような流れの中、2006年、食品安全委員会により「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の考え方」が発表された。この中で大豆イソフラボンの上限摂取量が定められたが、極めて暫定的なもので、「今後の研究の進展により、科学的知見に基づき、より適切な上限値が将来設定されることを期待する」と記されている。この検討書では、残念ながら消化管吸収性については触れられていない。大豆イソフラボンには、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、およびこれらの配糖体が存在するにもかかわらず、現在のところ腸管における吸収率に関しては同等とされ区別されていない。

2. 研究の目的

大豆中のイソフラボンは配糖体として、発酵食品中にはアグリコンで存在しているなど、食品によって存在形態が異なる。しかし「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の考え方」の中では、このような存在形態ごとの吸収性については全く考慮されていない。経口摂取成分は消化管から生体内に取り込まれた後に生理機能を発揮することから、消化管吸収性を明らかにする

ことは有効性・安全性確保のために必須であるといえる。本研究では、安全で効果的な大豆イソフラボンの摂取法を確立するため、構造別イソフラボンの詳細な消化管吸収機作を解析し、吸収特性を比較検討することを目的とした。さらにイソフラボン以外のフラボノイドアグリコンについても詳細に吸収特性を検討した。

3. 研究の方法

消化管吸収機作の解析には腸管のモデルとしてヒト結腸がん由来 Caco-2 を用いた。主要な大豆イソフラボンとしては、3種のアグリコンであるゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインおよびその配糖体（ゲニスチン、ダイジン、グリシチン）、配糖体のアセチル化体、及びマロニル化体が知られている。味噌、納豆等の大豆発酵食品にはアグリコンが多く、それ以外のほとんどの大豆製品には配糖体として主に存在する。本研究ではこれらのアグリコンおよび配糖体の腸管吸収について検討した。本研究で用いた大豆イソフラボンアグリコンの構造式を図1に示す。

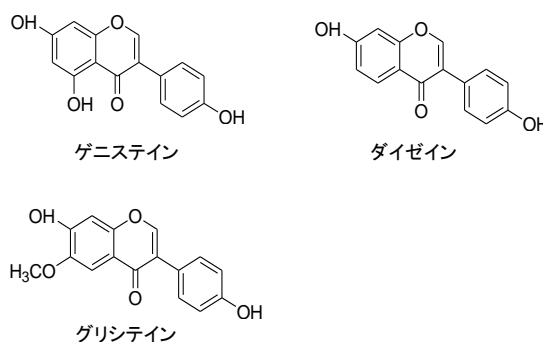


図1. 主要な大豆イソフラボン（アグリコンのみ）の構造式

Caco-2 細胞をトランズウエルの透過性フィルター上に播種し、2 週間以上培養し充分分化させ、単層膜を完成させた。この Caco-2 細胞単層膜を用いて、時間依存、pH 依存、濃度依存性透過試験を行い、速度論的に吸収機作を解析した。受動輸送は、人工脂質膜 (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA) を用いて解析し、Caco-2 透過試験の結果と比較した。PAMPA および Caco-2 の透過速度は以下の計算式で算出した。

$$\text{Log } P_{\text{app-PAMPA}} = \text{Log} \left\{ C \cdot \frac{[\text{drug}]_{\text{acceptor}}}{[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}} \right\}, \text{ where } C = \frac{(V_D \cdot V_A / (V_D + V_A)) \text{Area} \cdot \text{time}}{[\text{drug}]_{\text{initial, donor}}}$$

$$\text{Log } P_{\text{app-Caco-2}} = \text{Log} \left\{ C \cdot \frac{[\text{drug}]_{\text{acceptor}}}{[\text{drug}]_{\text{initial, donor}}} \right\}, \text{ where } C = \frac{(V_A / \text{Area} \cdot \text{time})}{[\text{drug}]_{\text{initial, donor}}}$$

Caco-2 および PAMPA におけるイソフラボン透過量はクロマトリック式 HPLC-ECD で測定した。

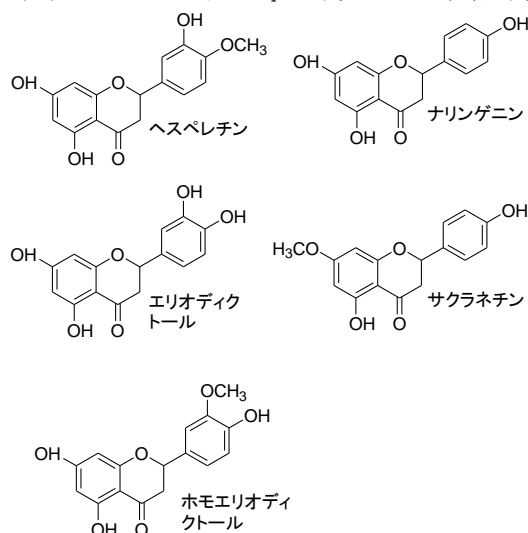
4. 研究成果

[大豆イソフラボンの消化管吸収機作の解明]

大豆イソフラボンアグリコンは、Caco-2 透過試験において、配糖体に比べて pH 依存型の高い吸収特性を示した。そこで、イソフラボンアグリコンがなぜ高吸収であるのかを明らかにするため、さらにそのメカニズムを検討した。Caco-2 における物質の吸収は受動輸送と能動輸送の両経路が混在している。そこで受動輸送のみが観察できる PAMPA による受動輸送機作を検討した。イソフラボンアグリコンは、PAMPA においても pH 依存型の高吸収性を示したことから、受動輸送経路を介して高吸収性を示すことが示唆された。それぞれの大豆イソフラボンの logD 値を化学計算ソフト (Marvin Sketch program : <http://www.chemaxon.com/marvin>) により算出した。logD 値と PAMPA 透過性との間に相関性が示唆されたことから、これらのイソフラボンアグリコンは実際の消化管内でも、高吸収性を示す可能性が高く、大豆発酵食品やイソフラボンをアグリコン型で強化した食品を大量に摂取する際には注意が必要である。

[イソフラボン以外のフラボノイドの消化管吸収機作の解明]

イソフラボンアグリコンは Caco-2 および PAMPA において高い吸収性を示したことから、イソフラボン以外の生理活性フラボノイドアグリコン (ヘスペレチン、ナリンゲニン、エリオディクトール、サクラネチン、ホモエリオディクトール) においても同様に検討した。これらの化合物の化学構造式を図 2. に示す。PAMPA による透過速度は化学計算ソフト (Marvin Sketch program : <http://www.chemaxon.com/marvin>) によって算出された logD 値と正の相関を示した (図 3)。また、ヘスペレチン、ナリンゲニン、エリオディクトール、およびホモエリオディクトールは、PAMPA においても pH 依存型の透過性が観察され、計算ソフトによる分子型存在比より、これらの化合物は pH 分配仮説により速やかに受動輸送されていることが示唆された。小腸の頂側膜には Na⁺/H⁺ 逆輸送体があり、頂側膜におけるグリコカリックスの存在で H⁺ 濃度が保たれている。それにより、細胞近傍は消化管管腔内よりも低い pH 環境となり、微環境



microclimate pH (pH6.1~6.8) が維持されている。従って、これらのフラバノンアグリコンも実際の消化管において高い吸収性を示すことが示唆された。

図 2. 本研究で用いたフラバノンアグリコンの化学構造式

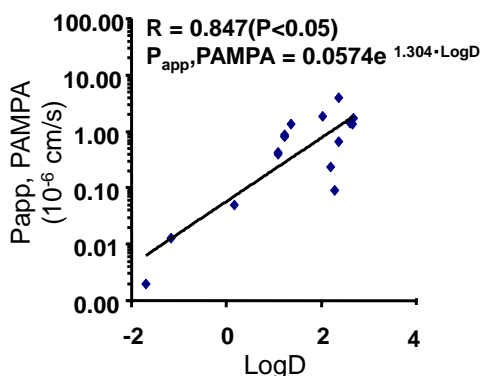


図3. PAMPA透過性とLogDとの相関性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Kobayashi S, Nagai T, Konishi Y, Tanabe S, Morimoto K and Ogihara T, Transport mechanisms of flavanone aglycones across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 査読有, **64**, 2012, 30-35.

[学会発表] (計1件)

1. 小林彰子、永井俊匡、小西豊、田辺創一、森本かおり、荻原琢男、フラバノンの消化管細胞および人工脂質膜における吸収機作の解析, 日本農芸化学会, 2011年3月26日, 京都女子大学(震災のため誌上発表)。

[図書] (計1件)

1. 小林彰子, 森本かおり, 荻原琢男, 食品成分と薬物の相互作用, *BIOINDUSTRY*, **28**, 2011, 30-35.

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

小林彰子 (KOBAYASHI SHOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教

授

研究者番号: 90348144

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし