

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580206

研究課題名(和文) フィトエストロゲン代謝性腸内細菌の機能性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the functionality of the phytoestrogen-metabolizing intestinal bacteria

研究代表者

田村 基 (Tamura, Motoi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：70353943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大豆イソフラボンや植物リグナンはフィトエストロゲンに属する。本研究では、エコール産生菌のマウスへの投与が、生理食塩水を投与したマウスに比べてダイゼインと植物リグナンの両方を含む食餌を給餌したマウスのエコール産生性を向上させることを見出した。また、リグナン代謝菌3株とイソフラボン代謝菌2株のマウスへの混合投与は、生理食塩水を投与したマウスに比べて腸内菌叢の植物リグナンからエンテロジオールへの産生を高めることを見出した。リグナン代謝菌投与とリグナン代謝菌+イソフラボン代謝菌投与とでは、ダイゼインと植物リグナンの両方を含む食餌を給餌したマウスの脂質代謝に対して異なる影響を及ぼす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Soy isoflavone and plant lignan are belong to the phytoestrogens. In this study, we found that the administration of equol-producing bacteria to the mice fed the diet containing daidzein and plant lignan increased the equol production as compared to the mice administrated physiological saline. Co-administration of three lignan-metabolizing bacteria and two isoflavone-metabolizing bacteria to the mice increased the enterodiol production as compared to the mice administrated physiological saline. Our results suggest that the administration of lignan-metabolizing bacteria to the mice fed the diet containing daidzein and plant lignan affects the lipid metabolism of mice differently from the administration of lignan-metabolizing bacteria plus isoflavone-metabolizing bacteria to the mice fed the diet containing daidzein and plant lignan.

研究分野：農学

キーワード：フィトエストロゲン エコール ダイゼイン 植物リグナン エンテロジオール マウス 腸内菌叢
脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

フィトエストロゲンのエストロゲン作用により、乳癌予防効果や骨粗鬆症予防効果が期待されている。エコールやエンテロラクトンは腸内菌叢のフィトエストロゲンの代謝産物であり、エコールやエンテロラクトン産生に関与する腸内菌叢が、生体内で重要な役割を担っていると考えられている。しかし、イソフラボン代謝菌やリグナン代謝菌が腸内菌叢のエンテロラクトン産生性やエコール産生性に及ぼす影響は明確にされていない。フィトエストロゲン代謝菌の生理機能に及ぼす影響を解明することは意義深いと考えられている。

2. 研究の目的

以上を踏まえ次の課題に取り組むこととした。

- (1) イソフラボン類とリグナン類の一斉定量法の開発およびイソフラボン代謝菌のマウスへの投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明
- (2) リグナン代謝菌のマウスへの投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明
- (3) イソフラボン代謝菌とリグナン代謝菌のマウスへの同時投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明

3. 研究の方法

本研究では、LC/MS/MS を用いたイソフラボン類の一斉定量法を応用してイソフラボン類とリグナン類の一斉定量法を検討した。マウスの血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿リン脂質濃度は、和光純薬のキットを用いて測定した。糞便重量は糞便を全て採取し、凍結乾燥して重量を測定した。肝臓脂質重量と糞中脂質含量は Bligh and Dyer 法で測定した。In vitro での糞便のエストロゲン代謝性は、嫌気性培養液でホモジナイズした糞便希釈液に エストラジオールを添加し、37 °C において Anaeropak® (三菱ガス化学) で嫌気培養を行い、培養液の抽出物を LC/MS/MS で測定した。動物試験は ICR 系雌マウスを用い、試験食にはイソフラボンの一つダイゼインと植物リグナンの一つセコイソラリシレジノールの含有率が高いアマニ抽出物を添加した試験食を用いた。尿中のイソフラボン類とリグナン類は、マウスを解剖一週間前に代謝ケージに移した後、尿を採取し、尿を脱抱合処理・抽出したものを HPLC や LC-MS/MS で測定した。腸内菌叢の解析には、

T-RFLP 法を用いた。

4. 研究成果

(1) イソフラボン類とリグナン類の一斉定量法の開発およびイソフラボン代謝菌のマウスへの投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明

イソフラボン類とリグナン類の LC/MS/MS による一斉分析の検討を行った。イオン化法として APCI (大気圧化学イオン化) 法を用いたところ、ダイゼイン、ゲニステイン、ジヒドロダイゼイン、エコールとセコイソラリシレジノールジグルコシド、セコイソラリシレジノール、エンテロジオール、エンテロラクトンの一斉分析が可能であった。

LC/MS/MS によるエコール(図 1 - 1)とエンテロジオール(図 1 - 2)の一斉分析における検量線

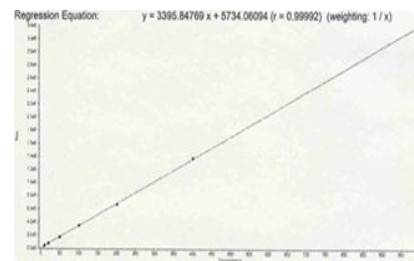


図 1 - 1. エコール検量線

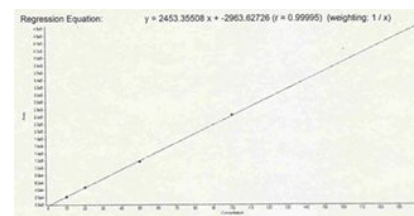


図 1 - 2. エンテロジオール検量線

マウスに大豆イソフラボンの一つダイゼイン 0.015% と植物リグナンを含むアマニ抽出物 0.02% を両方含む食餌をマウスに給餌した。マウスは各群 7 匹ずつとし、一方のマウスにはイソフラボン代謝菌の一つエコール産生菌を経口投与し、もう一方のマウスには対照群として生理食塩水を経口投与した。経口投与は一日一回とし、解剖までに、合計 19 回投与した。解剖一週間前にマウスを代謝ケージに移し、マウスの糞便を採取した。尿中イソフラボン類とリグナン類濃度とを HPLC で測定した。飼育試験終了後マウスを解剖し、内臓脂肪重量、血漿脂質濃度を測定し、盲腸を採取した。T-RFLP 法による分子生物学的手法を用いて盲腸内菌叢の構成を解析した。さらに、糞便を採取して、糞便を嫌気性希釈液で希釈し、この糞便希釈液に - エストラジオールを

添加して嫌気培養を行った。また、糞便脂質重量についても測定した。

T-RFLP 法による腸内菌叢の構成については二群間で有意な差は認められなかった。糞便脂質含有率は、エコー産生菌投与群は対照群に比べて高い傾向が認められた ($P=0.07$)。血漿トリグリセリド濃度や血漿総コレステロール濃度には違いが認められなかったものの、体重当たりの内臓脂肪重量は、エコー産生菌投与群 (0.058 ± 0.006) は対照群 (0.073 ± 0.006) に比べて低い傾向が認められた ($P=0.105$)。尿へのエンテロジオール排泄量やジヒドロダイゼイン排泄量には、二群間で有意な差が認められなかった。しかし、尿へのエコー排泄量に関しては、エコー産生菌投与群は、生理食塩水投与群に比べて有意に高い結果となり (図 2)、エコー産生菌は、ダイゼインと植物リグナンの両方を含む食餌を給餌したマウスのエコー産生性を向上させる可能性が示唆された。しかし、糞便菌叢の -エストロジオール代謝性については、二群間で有意な差は認められなかった。

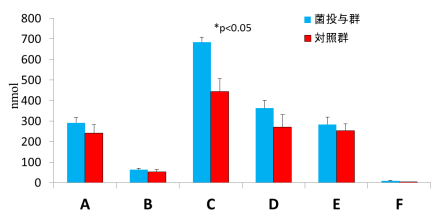


図 2. エコー産生菌投与群と対照群の尿へのフィトエストロゲン排泄量 (A: ダイゼイン、B:ジヒドロダイゼイン、C: エコー、D:セコイソラリシレジノール、E: エンテロジオール、F:エンロラクトン)

(2) リグナン代謝菌のマウスへの投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明

マウスに大豆イソフラボンの一つダイゼイン 0.015%と植物リグナンを含むアマニ抽出物 0.02%を両方含む食餌をマウスに給餌した。マウスは各群 7 匹ずつとし、一方のマウスには 3 種類のリグナン代謝菌 (3 種類の混合培養でセコイソラリシレジノールジグルコシドからエンテロジオールを産生) をあらかじめ生理食塩水中で混合してからマウスに経口投与し、もう一方のマウスには対照群として生理食塩水を経口投与した。経口投与は一日一回とし、解剖までに、合計 12 回投与した。解剖一週間前にマウスを代謝ケージに移し、マウスの糞便を採取した。糞便は採取後凍結乾燥して、糞便乾燥重量を測定した。尿中イソフラボン類とリグナン類濃度とを HPLC で測定した。飼育試験終了後マウスを解剖し、盲腸を採取し、内臓脂肪重量、血漿脂質濃度を測定し、肝臓を採取して肝臓脂質重量を測定した。また、凍結乾燥した糞便をフードミルで粉碎し、糞便中の脂質重量を測定した。

有意差はなかったものの、リグナン代謝菌投与群では、生理食塩水投与群に比してエコー濃度は少し高い傾向が認められた。リグナン代謝菌投与群は生理食塩水投与群に比べてジヒドロダイゼイン濃度が少し低い傾向が認められた。尿中のエンテロジオール濃度はリグナン代謝菌投与群で高い傾向が認められ、リグナン代謝菌がリグナン代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された (図 3)。

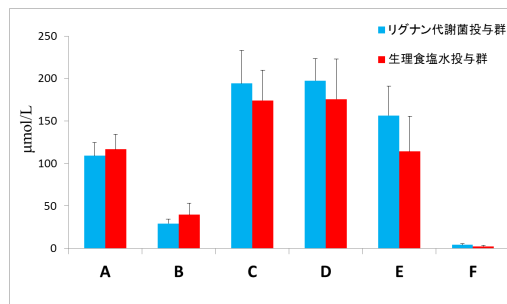


図 3. リグナン代謝菌投与群と対照群尿中フィトエストロゲン濃度

(A: ダイゼイン、B:ジヒドロダイゼイン、C: エコー、D:セコイソラリシレジノール、E: エンテロジオール、F:エンロラクトン)

内臓脂肪重量に関しては二群間で大きな差は認められなかった。血漿コレステロール値はリグナン代謝菌投与群で低い傾向が認められた ($P=0.146$)。糞便の脂質含有率はリグナン代謝菌投与群が生理食塩水投与群に比べて高い傾向が認められた (図 4)。リグナン代謝菌投与群では生理食塩水投与群に比べて血漿コレステロール値が低い傾向が認められ、糞便脂質含有率が高い傾向が認められたことから、リグナン代謝菌投与は、マウスの脂質代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

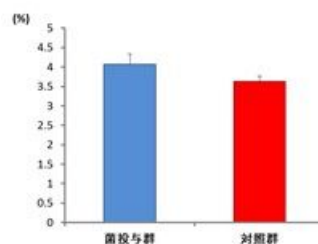


図 4. リグナン代謝菌 3 種混合投与群と対照群の糞便脂質含有率 (糞便は飼育試験最終日に採取した糞便を利用)

(3) イソフラボン代謝菌とリグナン代謝菌のマウスへの同時投与が、イソフラボンと植物リグナンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明

マウスに大豆イソフラボンの一つダイゼイン 0.2%と植物リグナンを含むアマニ抽出物 0.4%を両方含む食餌を給餌した。マウスは各群 7 匹ずつとした。フィトエストロゲン代謝菌投与群 (リグナン代謝菌とイソフラボン代謝菌の混合投与群) にはリグナン代謝菌 (3 株

を混合)とエコーラ産生菌、ジヒドロダイゼイン産生菌を滅菌生理食塩水で混合して解剖前日まで一日一回、11日間連続で経口投与した。対照群には生理食塩水を解剖前日まで一日一回、11日間連続で経口投与した。解剖一週間前にマウスを代謝ケージに移し、マウスの糞便を採取した。糞便は採取後凍結乾燥して、糞便乾燥重量を測定した。尿中イソフラボン類とリグナン類濃度とを LC-MS/MS で測定した。飼育試験終了後マウスを解剖し、盲腸を採取し、内臓脂肪重量、血漿脂質濃度を測定し、肝臓を採取して肝臓脂質重量を測定した。また、凍結乾燥した糞便をフードミルで粉碎し、糞便中の脂質重量を測定した。

フィトエストロゲン代謝菌投与群では、生理食塩水投与群に比して尿中エンテロジオール濃度が有意に高値を示した。投与したジヒドロダイゼイン産生菌やエコーラ産生菌がマウス腸内菌叢のエンテロジオール産生を阻害していない可能性が示唆された。しかし、ジヒドロダイゼイン濃度やエコーラ濃度はフィトエストロゲン代謝菌投与群と生理食塩水投与群とでは尿中濃度に有意な差は認められなかった(図 5)。

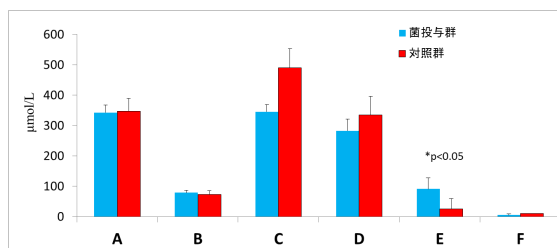


図 5. エコーラ産生菌・ジヒドロダイゼイン産生菌とリグナン代謝菌 3 株の合計 5 株の投与群と対照群の尿中フィトエストロゲン濃度(A: ダイゼイン、B:ジヒドロダイゼイン C:エコーラ、D:セコイソラリシレジノール、E:エンテロジオール、F:エンロラクトン)

これら 5 株を混合投与したマウスでは、非投与マウスに比べてエコーラ産生性やジヒドロダイゼイン産生性が強化されることは無かったことから、リグナン代謝性の腸内細菌 3 株が、イソフラボン代謝に関与するマウス腸内菌叢のダイゼイン代謝性を抑制している可能性が示唆された。内臓脂肪重量に関しては二群間で大きな差は認められなかった。肝臓脂質重量や糞便脂質含有率の値は、二群間で有意な差は認められなかった。しかし、血漿リン脂質 (P=0.163) と血漿コレステロール (P=0.143) の値は、菌投与群は対照群に比べて高い傾向が認められた。リグナン代謝菌のみの投与の場合は、非投与群に比べて血漿コレステロール値は低い傾向があったことから、リグナン代謝菌とリグナン代謝菌+イソフラボン代謝菌では、脂質代謝に対して異なる影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、糞便の菌叢の構成は、Lactobacillales の占有率が菌投与群の方が非投与群に比べて低い

傾向が認められたことから (P=0.081)(図 6)、投与したフィトエストロゲン代謝菌群が消化管内で Lactobacillales に抑制的に作用する可能性が示唆された。

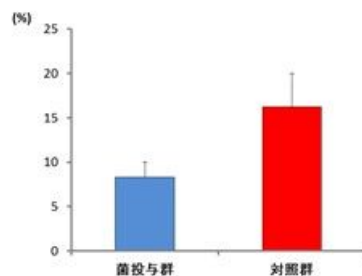


図 6. エコーラ・ジヒドロダイゼイン産生菌とリグナン代謝菌 3 株の合計 5 株の投与群と対照群の糞便の腸内菌叢に対する Lactobacillales の占有率 (%)

(4) 結語

本研究では、APCI (大気圧化学イオン化) 法を用いたダイゼイン、エコーラ、ジヒドロダイゼイン、セコイソラリシレジノールジグルコシド、セコイソラリシレジノール、エンテロジオール、エンテロラクトンの一斉分析を可能にした。

エコーラ産生菌単独投与は、ダイゼインと植物リグナンの両方を含む食餌を給餌したマウスのエコーラ産生性を向上させる可能性を見出した。また、植物リグナン(セコイソラリシレジノールジグルコシド)をエンテロジオールに代謝するリグナン代謝菌混合物をマウスに投与した場合と非投与の場合とでは、リグナン代謝菌投与群の方でエンテロジオール濃度が高い傾向が認められたものの有意差は認められなかった。ところが、リグナン代謝菌 3 株とイソフラボン代謝菌 2 株をマウスに混合投与した場合は、腸内菌叢の植物リグナンからエンテロジオールへの産生を高める結果となった。これら 5 株を混合投与したマウスでは、非投与マウスに比べてエコーラ産生性やジヒドロダイゼイン産生性を高めることはなかったことから、リグナン代謝性の腸内細菌 3 株が、イソフラボン代謝に関与するマウス腸内菌叢のダイゼイン代謝性を抑制している可能性が示唆された。また、リグナン代謝菌だけをマウスに投与するよりもリグナン代謝菌とイソフラボン代謝菌を同時にマウスに投与した方がエンテロジオール濃度を高める傾向があったことから、投与したイソフラボン代謝菌が腸内菌叢のエンテロジオール産生に寄与している可能性が考えられる。

糞便の脂質含有率は、エコーラ産生菌投与群や、リグナン代謝菌投与群では非投与群に比べて高い傾向があったにも関わらず、イソフラボン代謝菌+リグナン代謝菌投与群では、非投与群と大きな差は認められなかった。リ

グナン代謝菌のみの投与の場合は、非投与群に比べて血漿コレステロール値は低い傾向があったが、イソフラボン代謝菌+リグナン代謝菌投与群では、非投与群に比べて血漿コレステロール値は高い傾向があったことから、リグナン代謝菌とリグナン代謝菌+イソフラボン代謝菌では、脂質代謝に対して異なる影響を及ぼしている可能性が示唆された。リグナン代謝菌+イソフラボン代謝菌投与群は非投与群に比べて腸内菌叢の Lactobacillales の占有率が低い傾向があった。Lactobacillus の中には、コレステロール低下作用を有するものが報告されており、リグナン代謝菌+イソフラボン代謝菌投与が、腸内細菌叢の構成に影響を及ぼした結果として、マウスの脂質代謝に変動を及ぼしたのかもしれない。

本研究の結果、イソフラボン代謝性腸内細菌やリグナン代謝菌は、脂質代謝やフィトエストロゲン代謝に関与する可能性が示された。イソフラボン代謝菌をマウスに投与した場合とイソフラボン代謝菌とリグナン代謝菌とを混合してマウスに投与した場合とではマウスのフィトエストロゲン代謝に及ぼす影響が異なることが考えられた。これらの腸内細菌は腸内で相互に影響を及ぼし合うため、これらの腸内細菌の混合投与は、それぞれを個別に投与した場合に比べて異なる機能性を宿主に及ぼしている可能性が示唆された。フィトエストロゲン産生性腸内細菌は、宿主の腸内菌叢に影響を及ぼし、宿主の生理機能に深く関与していることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

原著論文

Tamura M, Hori S, Nakagawa H. Intestinal bacterium TM-30: an S-equol-producing bacterium isolated from human Feces is involved in estrogen metabolism *in vitro*. *Food Sci Technol Res* 査読あり。20 (2), 309-316. (2014)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/20/2/20_309/article

Tamura M, Chigusa H, Hori S. Xylitol Affects the Intestinal Microbiota and Metabolism of Daidzein in Adult Male Mice *Int. J. Mol. Sci.* 査読あり 14, 23993-24007 (2013); doi:10.3390/ijms141223993
<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/12/23993>

総説

田村 基 ヒト腸内菌叢のフィトエストロゲン代謝の多様性 *New Food Industry* 56(11), 33-42 (2014)

〔学会発表〕(計 2 件)

田村 基, 星千草, 堀 幸子
大豆イソフラボンの吸収・代謝に及ぼすキシリトールの影響 2014 年 8 月 30 日 日本食品科学工学会第 61 回大会 中村学園大学 (福岡県・福岡市)

田村 基, 平山 和宏
高脂肪食を給餌されたマウスに対するイソフラボン代謝活性の異なるヒトフローラの効果 2013 年 1 月 26 日 第 46 回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会 フォーラム 246 (神奈川県・伊勢原市)

〔図書〕(計 1 件)

田村 基, 平山 和弘, 伊藤 喜久治
食品機能性成分の吸収・代謝機構 シーエムシー出版 1-9 ページ 2013 年 5 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 基 (TAMURA MOTOI)
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・食品機能研究領域・
上席研究員
研究者番号: 70353943

(2) 研究分担者

中川 博之 (NAKAGAWA HIROYUKI)
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・食品安全研究領域・
主任研究員
研究者番号: 30308192