

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21580168  
 研究課題名（和文） エコール生産性腸内細菌の機能性の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of functionality of equol-producing 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

## 研究成果の概要（和文）：

エコールは消化管内で腸内フローラ(腸内細菌叢)の作用によって、大豆イソフラボンの一つダイゼインから生産される。エコールは、種々の機能性を有している。本研究では、エコール生産性腸内細菌をエストリオール、エストロン、 $\beta$ -エストラジオールと *in vitro* で嫌気培養し、エコール生産性腸内細菌が $\beta$ -エストラジオールからエストロンへの代謝性が強いことを初めて明らかにした。エコール生産性腸内細菌のマウスへの投与は、0.05%ダイゼイン-10%ラード食を給餌したマウスの脂質代謝や糞便の胆汁酸濃度に影響を及ぼすことも見出した。また、エコール生産性腸内細菌を投与したマウスは、エコール菌を投与していないマウスに比べて尿中の $\beta$ -エストラジオールが低値を示すことを見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

Equol is a metabolite of daidzein that is produced by the intestinal flora in the gut. Life style disease prevention of equol has been expected. In our research, In *in vitro* anaerobic incubation of equol-producing bacteria with estriol, estrone, and  $\beta$ -estradiol, we firstly elucidated that equol-producing bacteria strongly converted estrone to  $\beta$ -estradiol. Administration of equol-producing bacteria to mice fed the 0.05%-daidzein-10% lard diet affected the lipid metabolism and fecal bile acid concentration. The urinary amounts of  $\beta$ -estradiol were significantly lower in the mice administrated of equol-producing bacteria than in the mice administrated of physiological saline.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：エコール、腸内フローラ、ダイゼイン、エストロゲン、マウス、 $\beta$ -エストラジオール、エストロン、脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

エコールは消化管内で腸内フローラ(腸内細菌叢)の作用によって、大豆イソフラボンの一つダイゼインから生産される。エコールは、ダイゼインよりも抗酸化能が高く、エストロゲン活性が強い、などの様々な特徴を有するイソフラボン類である。

エコール生産能には、個人差が大きい。欧米では、60%~70%程度のヒトでエコール生産能が低いことが報告されている。エコール生産に関与する腸内フローラ(腸内細菌叢)の個人々の違いがこれらエコール生産能の個人差を生み出していると考えられている。

エコールは近年、生活習慣病予防成分として関心が高まってきているにも関わらず、エコール生産菌の取得が困難であり、エコール生産菌の生理機能に及ぼす影響については解明されていない。エコール生産菌の生理機能に及ぼす影響の解明することは意義深いと考えられる。

## 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) エストロゲン代謝活性測定方法の検討
- (2) エコール生産菌のエストロゲン代謝性の解明
- (3) エコール生産菌のマウスへの投与が、イソフラボンを含まない餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内フローラのエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明
- (4) エコール生産菌のマウスへの投与が、イソフラボンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内フローラのエストロゲン代謝におよぼす影響の解明

## 3. 研究の方法

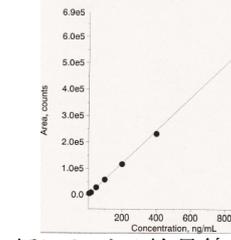
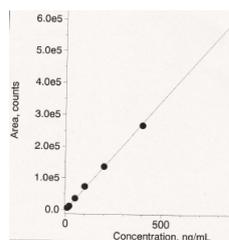
従来、イソフラボンの腸内フローラの代謝性解析には、嫌気培養液としてBHIを主体とした既報告の手法を用いてきた。新たにGAM糖分解用培地を活用してダイゼイン代謝性を検討した。またLC/MS/MSによるエストロゲンとエコールの同時測定方法を検討した。マウスの血漿総コレステロール濃度、血漿トリグリセリド濃度、血漿リン脂質濃度は、和光純薬のキットを用いて測定した。糞便重量は糞便を全て採取し、凍結乾燥して重量を測定した。糞中脂質含量はBligh and Dyer法で測定した。糞中胆汁酸量は粉碎した凍結乾燥からエタノール抽出した胆汁酸を総胆汁酸キットで測定した。*In vitro*でのエコール菌のエストロゲン代謝性は、エコール菌TM-30株を嫌気性培養液に接種し、βエストラジオール、エストロン、エストリオールのいずれかを添加し、Anaeropak®(三菱ガス化

学)で37°Cで培養し、培養液の抽出物をLC/MS/MSで測定した。動物試験ではICR雄マウスを用い、試験食は、AIN-93Mをベースとした10%ラード食もしくはダイゼイン0.05%添加したAIN-93Mをベースとした10%ラード食を用いた。また、マウス糞便を嫌気性培養液で希釈し、βエストラジオールと嫌気培養し、糞便菌叢のβエストラジオール代謝性を検討した。尿中のエストロゲンは、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LC/MS/MSで測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸内フローラのエストロゲン代謝活性測定方法の検討

新たにGAM糖分解用培地を活用してエコール生産菌のダイゼイン代謝性を検討したところ、エコール生産菌がダイゼインからエコールを生産した。一方、腸内細菌に用いる培養液にβ-エストラジオール、エストロン、エストリオール、エコール、ダイゼインを添加して所定時間培養後、培養液からイソフラボンやエストロゲンを抽出し、LC/MS/MSによる精密分析を行った。イオン化法として当初はESI(エレクトロスプレーイオン化)法を使用した。β-エストラジオールの感度が不十分であるのが欠点であった。そこでイオン化法の再検討を行い、APCI(大気圧化学イオン化)法を用いたところ、ダイゼイン、エコールとβ-エストラジオール、エストリオールおよびエストロンの一斉分析が可能であった。図1. LC/MS/MSによるβエストラジオール(図1-1)とエコール(図1-2)の同時分



析における検量線

図 1-1

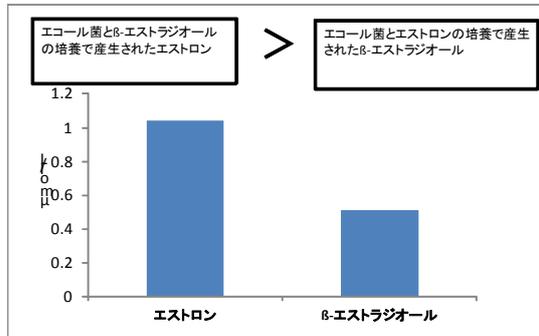
β-エストラジオール  
検量線

図 1-2

エコール検量線

- (2) エコール生産菌のエストロゲン代謝性の解明

あらかじめ BL 寒天培地にエコー菌 TM-30 株を接種し、Anaeropak®(三菱ガス化学)で 37°C、2 日間培養した。培養したエコー菌を 200 μL の嫌気性培地に接種し、β-エストラジオール、エストロン、エストリオールを添加し、Anaeropak®(三菱ガス化学)で 37°C、72 時間嫌気培養した後、有機溶媒で抽出し、抽出液を用いて LC/MS/MS 分析を行ったところ、エコー菌は、エストリオールを代謝することは無かった。しかし、β-エストラジ



オールからは、エストロンを産生し、エストロンからは、β-エストラジオールを産生した(図2)。しかし、β-エストラジオールからのエストロン産生量の方が多く、エコー菌は、β-エストラジオールのエストロンへの代謝性が強いことが明らかとなった。

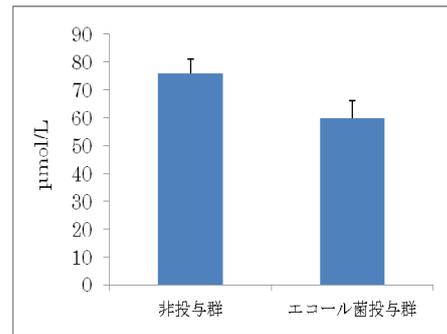
図 2 エコー菌とβ-エストラジオールもしくはエストロンとの嫌気培養結果

(3) エコー菌生産菌の投与が、イソフラボンを含まない餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内フローラのエストロゲン代謝に及ぼす影響の解明

6 週齢 ICR 雄マウス 14 匹に AIN-93M を 7 日間給餌した後、7 匹ずつ二群に分けて、AIN-93M をベースとした 10%ラード食に切り替えて、28 日間給餌した。エコー菌投与群には、エコー菌を一日一回解剖日までに合計 10 回投与した。対照群には、生理食塩水を一日一回解剖日までに合計 10 回投与した。飼育期間終了後に、解剖し、血液と盲腸内容をサンプリングし、血漿を採取し、血漿総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度の測定を行ったところ、血漿脂質には有意な差は認められなかった。

また、飼育期間中は、糞便を採取し、凍結乾燥し、糞便排泄量を全て測定したが、エコー菌投与群と非投与群では乾燥糞便重量に有意な差は認められなかった。一方、エコー菌の投与開始 7 日後に糞便を採取・秤量した後、糞便を滅菌ホモジナイザー中で嫌気性希釈液とともにホモジナイズし、同希釈液で希釈・調製した糞便希釈液をβ-エストラジオールとともに嫌気培養を行い、マウス腸内フローラのエストロゲン代謝性について

検討をおこなったところ、エコー菌投与群

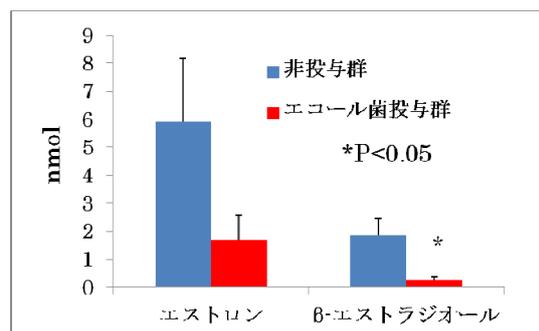


が、対照の非投与群に比べて、β-エストラジオールからエストロンへの代謝性が低い傾向が認められた(P=0.069)。エコー菌がマウスの腸内フローラのエストロゲン代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された(図3)。

図 3 マウス糞便希釈液とβ-エストラジオールとの嫌気培養結果

(4) エコー菌生産菌の投与が、イソフラボンを含む餌を給餌したマウスの脂質代謝や腸内フローラのエストロゲン代謝におよぼす影響の解明

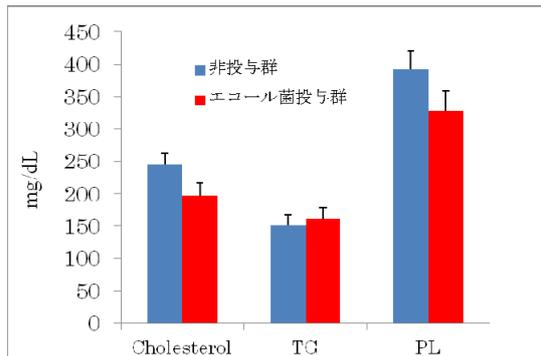
6 週齢 ICR 系雄マウス 14 匹に AIN-93M を 7 日間給餌した後、7 匹ずつ二群に分けて、AIN-93M をベースとした 0.05%ダイゼイン-10%ラード食に切り替えて、28 日間給餌した。エコー菌投与群には、エコー菌を一日一回解剖日までに合計 14 回投与した。対照群には、生理食塩水を一日一回解剖日までに合計 14 回投与した。解剖一週間前にマウスを代謝ケージに移し、解剖日の 2 日前にβ-エストラジオールをマウスに単回投与した。解剖直前 42 時間の尿をすべて採取した。採取した尿を酵素処理により脱抱合し、抽出し、



LC/MS/MS でエストロゲン量を測定したところ、尿中のβ-エストラジオールやエストロン排泄量はエコー菌投与群で低値を示した。エコー菌がイソフラボンを投与したマウスのエストロゲン代謝を変動させることを明らかにした(図4)。

図 4 エコー菌投与群と非投与群の尿中エストロゲン量

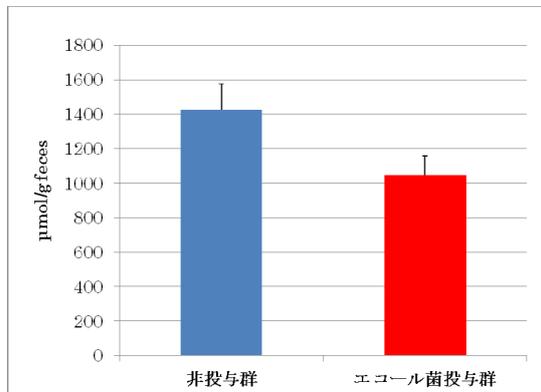
飼育期間終了後に、解剖し、血漿を採取し、



血漿総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度の測定を行ったところ、血漿総コレステロールはエコール菌投与群で低い傾向が認められた(P=0.089)が、トリグリセリド、リン脂質濃度に差は認められなかった(図5)。

図5 エコール菌投与群と非投与群の血漿脂質濃度

また、飼育期間中は、糞便を採取し、凍結乾燥し、乾燥糞便重量を測定した。乾燥糞便重量は、エコール菌投与群と非投与群の間で差は認められなかった。解剖直前に排泄された乾燥糞便の総胆汁酸濃度はエコール菌投与



群で低い傾向が認められた(P=0.067)(図6)ことから、エコール菌は脂質代謝や糞便胆汁酸濃度に影響を及ぼすことが示唆された。

図6 乾燥糞便1グラム当たりの総胆汁酸濃度

#### (5) 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、エコールとβ-エストラジオール、エストリオールおよびエストロンの一斉分析を可能にした。また、エコール菌はβ-エストラジオールやエストロンを代謝すること、β-エストラジオールのエストロンへの代謝性が強いことを初めて明ら

かにした。

エコール菌投与が、イソフラボンを添加していない食餌を与えたマウスの腸内フローラのエストロゲン代謝を変動させることを明らかにした。また、エコール菌は、ダイゼインを添加した食餌を与えたマウスのβ-エストラジオール代謝変換、脂質代謝や糞便の胆汁酸濃度に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究の結果、エコール生産性腸内細菌は、脂質代謝やエストロゲン代謝に関与する可能性が示された。本エコール生産菌は、ヒトの腸内細菌由来である。エコール生産性腸内フローラは、イソフラボン代謝だけでなく脂質代謝・エストロゲン代謝にも関与し、宿主の生理機能に深く関与していると考えられる。

#### 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5件)

#### ■原著論文

##### ① Tamura M, Hori S, Nakagawa H.

*Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771: Impact on metabolism of isoflavonoids in the fecal flora from a male equol producer.

*Curr Microbiol* 査読あり 62 (5):1632-1637 (2011)

<http://www.springerlink.com/content/6q6607211103677m/?MUD=MP>

##### ② Tamura M, Hori S. Apple pectin affects the efficacy of epigallocatechin gallate on oral sucrose tolerance test in adult mice. *Int J Vitam Nutr Res* 査読あり 81 (6): 372-377 (2011)

<http://www.verlag-hanshuber.com/zeitschriften/journal.php?abbrev=VIT&show=abstract&abstract=34718>

##### ③ Tamura M, Hori S, Nakagawa H. *Lactobacillus collinoides* JCM1123<sup>T</sup>: effects on mouse plasma cholesterol and isoflavonoids in the caecum. *Antonie van Leeuwenhoek* 査読あり 96 (4), 621-626.(2009)

<http://www.springerlink.com/content/w261261n133n3241/?MUD=MP>

#### ■解説

##### ④ 田村 基

バイオジェニックス 日本食品科学工学会誌査読有り 57(10) 446. (2010)

⑤ 田村 基

エクオール(equol) 日本食品科学工学会誌  
査読有り 57(11) 492-493. (2010)

[学会発表] (計 1 件)

① Tamura M, Hori S, Kurusu Y, Nakagawa H.

Impact of dihydrodaidzein-producing  
*Clostridium*-like intestinal bacterium, strain  
TM-40 on in vitro metabolism of daidzein by  
equol-producing bacterium and fecal  
microbiota from human.

The Joint Meeting of the 17th International  
Symposium on Gnotobiology (ISG) and the  
34th Congress of Society for Microbial  
Ecology and Disease (SOMED).  
2011/11/23 ナビオス横浜

[図書] (計 1 件)

① 田村 基、伊藤 喜久治

腸内フローラとその食物による変動  
シーエムシー出版 免疫機能性食品の基  
礎と応用 2010 11 ページ

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

(3) 連携研究者

なし