

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500965

研究課題名(和文) イソフラボンを含む各種健康食品の併用摂取による複合エストロゲン活性に関する研究

研究課題名(英文) Study of combined estrogenic activity of supplements containing isoflavone

## 研究代表者

川添 禎浩 (KAWAZOE, SADAHIRO)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00224783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クズ(PL)、レッドクローバー(RC)、プエラリアミリフィカ(PM)、アルファルファあるいは大豆イソフラボン(DI)を含むサプリメントについて、イソフラボン15種類の含有量をHPLCで分析すると、PLサプリメントに高濃度含む製品があった。PL、RC、PMサプリメントはDIサプリメントと併用するなど複数製品を摂取することでイソフラボンの過剰摂取になる可能性がある。

酵母two-hybrid法(hER)による、各素材の併用時の複合エストロゲン活性は、DI抽出物とRCエキス末の併用で相加的に活性が強くなり、エストロゲン活性においても注意が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the contents of 15 kinds of isoflavone in various supplements containing Pueraria lobata (PL), red clover (RC), Pueraria mirifica (PM), alfalfa or soybean isoflavone (DI) by HPLC. Total isoflavone contents of PL supplements were higher than that of other supplements. PL, RC or PM supplements may be taken with DI supplements. Therefore, the possibility of excessive intake of isoflavone should be considered.

We measured the combined estrogenic activities of plant extracts as supplement materials by a yeast two-hybrid assay. RC extract plus DI extract showed additional estrogenic activity for hER. It is necessary to take in RC and DI supplements with caution.

研究分野：食品安全性学・環境毒性学

キーワード：食品 衛生 健康食品 サプリメント イソフラボン エストロゲン

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病に対する不安や健康管理の高まりなどから、数多くの健康食品が新聞・雑誌等の広告で宣伝され、またドラッグストアの店頭に並べられている。一方、健康食品の有用性に関する情報は多いものの、安全性に関する情報は極めて少ない状況にある。特に、健康食品の過剰摂取と長期摂取、医薬品との併用に関する情報は少なく、これらについての関連情報が必須とされる。ところで、健康食品は医薬品との同時摂取のみならず、数種類の健康食品を同時に摂取されることも想定され、その安全性にも注視する必要がある。しかし、健康食品を数種類同時に摂取した場合の安全性について研究された報告はない。

ところで、イソフラボンはマメ科植物に含まれ、エストロゲン活性をもつことが知られている。イソフラボンの効果としては、ヒトの成人において心血管障害、骨粗しょう症、ガンなどに対して予防効果があることが知られている。大豆食品などを常食するアジア系民族は乳ガンなどが少ないことが、欧米に較べイソフラボンの摂取量が多いことに関連づけて報告されている。大豆製品・イソフラボンの摂取と乳ガン発生率の減少の関係を示す厚生労働省多目的コホート研究を用いた positive data も発表されている。しかし、一方でイソフラボンの摂取はヒツジやその他の動物において生殖障害を引き起こすことが知られ、わが国の食品安全委員会は、特定保健用食品等で大豆イソフラボンが過剰に摂取される可能性を考慮し、食事以外の特定保健用食品等からの摂取を1日30mgと設定し、乳幼児等のハイリスクグループに対しては摂取を勧めていない。ところで、イソフラボンを含む健康食品には、ゲニステインやダイゼインなどの大豆イソフラボン類を含む健康食品のみならず、formononetin、puerarin、biochanin A などのイソフラボンを含む健康食品もあり、それらは同時に摂取されることも考えられ、イソフラボンの過剰摂取と複合エストロゲン活性はどうなるのか安全性の観点から興味もたれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、健康食品を数種類摂取した場合の安全性を、複数摂取のモデルとして、イソフラボンを含む各種健康食品(サプリメント)を用いて検討した。具体的には、イソフラボンを含む各種サプリメント中のイソフラボン含有量を HPLC によって調べ、更にそれらの素材を用いて、併用時の複合エストロゲン活性を酵母 two-hybrid 法によって検討し、サプリメントの併用摂取時の安全性を、摂取量と作用の両面から考察することとした。

### 3. 研究の方法

(1) イソフラボンを含む各種サプリメント中のイソフラボン含有量の測定

### 材料

エストロゲン活性をもつことが知られているクズ(PL)、レッドクローバー(RC)、PL と同属のプエラリアミリフィカ(PM)、アルファルファ(AF)あるいは大豆イソフラボン(DI)を含むサプリメントについて、PL 4 製品、RC 5 製品、PM 5 製品、AF 3 製品、DI 5 製品を、京都市内のドラッグストアおよびインターネットを介した通信販売で購入した。

### HPLC の試験溶液の調製

サプリメント試料1gに80%メタノールを50 mL 加えてホモジナイザーにより攪拌した(50 rpm, 3 min)。それをろ紙(5A)でろ過し、残渣に再び80%メタノールを50 mL 加えてホモジナイザーにより攪拌、ろ過した。それらのろ液を2-3 mL まで減圧濃縮(40 )し、80%メタノールで20もしくは25 mL に定容した。そして、メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過したものを HPLC 試験溶液とした。

### HPLC 測定条件

大豆イソフラボン 12 種類(daidzein, daidzin, genistin, genistein, glycitein, glycitin, 6"-O-acetyldaidzin, 6"-O-acetylglucosyl, 6"-O-acetylgenistin, 6"-O-malonyldaidzin, 6"-O-malonylglucosyl, 6"-O-malonylgenistin)、RC の主成分といわれているイソフラボンの formononetin、プエラリア属特有のイソフラボンの puerarin の分析は HPLC のグラジエント条件で行った。カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) (GL Sciences Inc. 製)を使用し、ガードカラムに Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 50 mm)を用いた。移動相は A 液をアセトニトリル-水-酢酸(15 : 85 : 0.1)、B 液をアセトニトリル-水-酢酸(35 : 65 : 0.1)に調製した。グラジエント条件は 0 分 B 液 0% から 50 分 B 液 100% までの直線濃度勾配とし、さらに 60 分まで B 液を 100% とした。流速 : 1.0 mL/min、カラム温度 : 40、注入量 : 10 μL、検出波長 : UV 254 nm とした。

RC のもう一つの主成分のイソフラボンの biochanin A の分析は HPLC のアイソクラテック条件で行った。カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm) (GL Sciences Inc. 製)を使用し、ガードカラムに Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 50 mm)を用いた。移動相はメタノール-1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液(60 : 40)に調製した。流速 : 1.0 mL/min、カラム温度 : 室温、注入量 : 10 μL、検出波長 : UV 254 nm とした。

(2) 酵母 two-hybrid 法におけるイソフラボンを含むサプリメントの素材の併用時の複合エストロゲン活性の測定

### 材料

イソフラボンを含むサプリメントの素材として、イソフラボンをほとんど含まなかった AF を除き、DI 抽出物、RC エキス末、PM

末を国内で購入した。また PL の素材として、葛根を国内で購入し、水抽出物し、凍結乾燥することで、葛根水抽出物(KD)を作製した。

#### 酵母 two-hybrid 法の試験溶液の調製

KD、RC エキス末、PM 末、DI 抽出物の各試料 2 g に 80%メタノールを 50 mL 加えてホモジナイザーにより攪拌した (50 rpm、3 min)。それをろ紙 (5A) でろ過し、残渣に再び 80%メタノールを 50 mL 加えてホモジナイザーにより攪拌した。それら上澄み液を 80%メタノールで 100 mL に定容した。その 2 mL をとり、窒素気流下で乾固し、超純水 200  $\mu$ L に溶解した。それを  $\beta$ -グルクロニダーゼ含有の酢酸緩衝液 1 mL で酵素処理 (37  $^{\circ}$ C、24 h) 後、ジエチルエーテル 5 mL で抽出し、遠心分離 (3000 rpm、5 min) した。ジエチルエーテル画分を窒素気流下で濃縮乾固し、DMSO 200  $\mu$ L に溶解して、試験溶液とした。

#### エストロゲン活性の測定

ヒトエストロゲンレセプター (hER $\alpha$ ) を組み込んだ酵母をトリプトファンおよびロイシンを除いた培地に播種後、振とう培養 (30  $^{\circ}$ C、17 h) し、対数増殖期のものを試験用酵母液とした。次に、発光測定用黒色 96-well プレートに、試験溶液を単独、または併用添加した。さらに試験用酵母液を添加し、混合後、静置培養 (30  $^{\circ}$ C、4 h) した。酵母細胞壁融解酵素を Z buffer (60 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mmol/L KCl、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>) で溶解した溶液と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ測定用化学発光用キット (Aurora Gal-XE kit、ICN 社製) の反応試薬を 5 : 3 で混合した溶液を添加し静置培養 (37  $^{\circ}$ C、1 h) した。その後、プレートを発光測定装置 (AB2100、ATTO BioInstrument 社製) にセットして、化学発光用キットの発光促進液を添加しながら、発光強度を計測し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ量を測定した。エストロゲン活性の強さは各試験溶液の濃度ごとに化学発光強度をもとめ、対照に対する化学発光強度比 (T/B) として算出した。

## 4. 研究成果

### (1) イソフラボンを含む各種サプリメント中のイソフラボン含有量

厚生労働省は、特定保健用食品やいわゆる健康食品のうち、大豆イソフラボンを含む食品では、大豆イソフラボンアグリコン換算値を表示するよう通知している。そこで、配糖体とアグリコンの分子量比よりもとめたアグリコン換算係数を用いて、分析結果のイソフラボン含有量のうち、配糖体の含有量をアグリコンに換算した。換算前的大豆イソフラボンの合計量 (大豆イソフラボン量)、大豆イソフラボン量とそれ以外のイソフラボン量の合計量 (総イソフラボン量) とともに、換算値を用いた大豆イソフラボンアグリコン換算値、総イソフラボンアグリコン換算値を算出した。また各製品に表示された最大 1 日摂取目安量をもとに、1 日摂取目安量あた

りの総イソフラボン量、大豆イソフラボンアグリコン換算値、総イソフラボンアグリコン換算値をもとめた。

PL サプリメントにおいて、15 種類のイソフラボンを合計した総イソフラボン量は 0.227-148 mg/g の範囲、RC サプリメントにおいて 0.811-164 mg/g の範囲で含まれ、高濃度のイソフラボンを含む製品があった。PM サプリメントにおいて 0.684-51.6 mg/g の範囲、DI サプリメントにおいて 5.12-65.5 mg/g の範囲であった。AF サプリメントにおいては 0.1 mg/g 未満で極めて少なかった。

イソフラボン含有量を表示した製品は、DI サプリメントでは 4 製品、RC サプリメントで 2 製品、PL サプリメントで 1 製品あった。しかし、PL サプリメントの 1 製品では、1 日摂取目安量あたりの表示量と分析値とは大きく異なった。

食品安全委員会より平成 18 年に大豆イソフラボンの安全性評価が報告され、特定保健用食品における大豆イソフラボンアグリコン換算値の 1 日上乗せ摂取量の上限值は 30 mg/day とされている。今回の製品はいわゆる健康食品に相当するが、特定保健用食品と同様に安全性を考慮する必要がある。PL サプリメントの分析値に基づく最大 1 日摂取目安量あたり大豆イソフラボンアグリコン換算値が 2 製品 (34.9、111 mg/day) で 30 mg/day を超えていた。これらは海外製品であった。また DI サプリメント 1 製品 (32.0 mg/day) で 30 mg/day を超えていた。Puerarin や formononetin、biochanin A は体内で腸内細菌叢や薬物代謝酵素等の働きを受けて、大豆イソフラボンと同等のエストロゲン活性を示すと考えられる。そこで、これらを含めた 1 日摂取目安量あたりの総イソフラボンアグリコン換算値において、PL サプリメントでさらに 1 製品 (73.4 mg/day) が 30 mg/day を超えていた。これも海外製品であった。

RC サプリメントには大豆イソフラボンとともに含む製品が 5 製品中 3 製品あった。RC サプリメントの 1 日摂取目安量あたりの総イソフラボンアグリコン換算値は 0.717-26.9 mg/day の範囲で、DI サプリメントは 5.76-32.0 mg/day の範囲であったことから、RC サプリメントは DI サプリメントと同程度のイソフラボンを摂取する可能性があった。PM サプリメントの 1 日摂取目安量あたりの総イソフラボンアグリコン換算値は 0.172-14.2 mg/day で、DI サプリメントに比べて少なかった。

以上のことから、PL サプリメントのような海外製品を個人輸入し摂取することは注意が必要である。また、PL サプリメントはエストロゲン様作用を期待して販売されていないため、これらを併用摂取する可能性を考えると、PL サプリメントの摂取には注意が必要である。今回調査した RC、PM、AF のサプリメントでは単一製品を適切に摂取すれば、イソフラボン摂取量の観点から問題はないと

考えられた。しかし、異種の複数製品を摂取することで、過剰摂取のおそれや有害影響が起こる可能性はある。また RC、PM、AF には、イソフラボン以外にフラボノイドやクメスタンなどエストロゲン活性を示す他の成分が含まれている。これらに着目しても更なる総合的な評価が必要であると考えられる。

(2) 酵母 two-hybrid 法におけるイソフラボンを含むサプリメントの素材の併用時の複合エストロゲン活性

各試験溶液を単独添加した際の T/B の変化を調べた (Figure 1)。用量反応曲線は DI 抽出物の曲線が最も低い濃度で上昇しはじめしており、測定した試料の中で最もエストロゲン活性が強いことがわかった。RC エキス末、KD、PM 末の順に用量反応曲線が右へシフトしており、エストロゲン活性の強さは DI 抽出物 > RC エキス末 > KD > PM 末の順であった。

DI 抽出物と RC エキス末、KD、PM 末を併用添加した際の T/B の変化を調べた (Figure 2)。DI 抽出物の単独添加よりも RC エキス末を併用添加することでエストロゲン活性は強くなった (Figure 2A)。また RC エキス末の添加濃度依存的にエストロゲン活性は強くなった。このことから、DI 抽出物に対して RC エキス末が相加的に働いたと考えられる。しかし、KD または PM 末を DI 抽出物と併用添加してもエストロゲン活性は大きく変わらなかった (Figure 2B、2C)。

マメ科植物の抽出物の中で、ER $\alpha$  との明確な結合親和性を示すのは PL のみであること、ER $\beta$  とでは PL > RC > 大豆の順で結合親和性が強いことが知られている。しかし、今回の結果では DI 抽出物 > RC エキス末 > KD (PL の素材) > PM 末の順であった。DI 抽出物は大豆からイソフラボンを抽出した素材であることから、活性が強くなったと考えられる。各試料の総イソフラボン量を HPLC で調べると、DI 抽出物 (274 mg/g) > KD (147 mg/g) > RC エキス末 (43.5 mg/g) > PM 末 (1.87 mg/g) の順であった。総イソフラボン量とエストロゲン活性を比較すると、KD と RC エキス末で総イソフラボン量とエストロゲン活性の順が異なった。KD の主なイソフラボンは puerarin である。試験溶液を調製する際にイソフラボンを生体内で利用される形に近づけるため、 $\beta$ -グルクロニダーゼを用いた酵素処理によって配糖体の糖を外してアグリコンにした。しかし、配糖体の構造を持つ puerarin の糖が今回の酵素処理では糖が外れなかったために、puerarin がエストロゲン活性をほぼ示さず、RC エキス末 > KD > PM 末の順になったのではないかと考えられた。そこで、KD の総イソフラボン量から puerarin を除くと 24.4 mg/g となり、RC エキス末の総イソフラボン量 (43.5 mg/g) よりも少なく、RC エキス末 > KD > PM 末の順となり、活性に反映された。Puerarin は個人差があるものの、腸内細菌によりエストロゲン活性の強い

daidzein へ代謝されることがわかっている。別の試験系を用いるなどして、puerarin をアグリコンにして KD のエストロゲン活性を測定する必要性が考えられ、今後の検討課題となった。

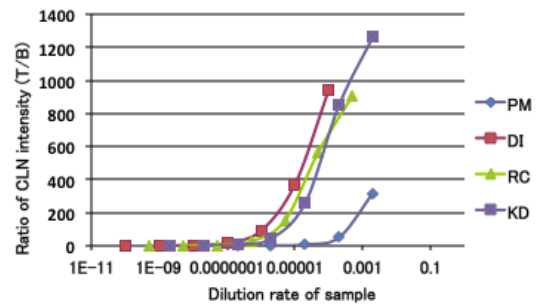


Figure 1. KD、RC エキス末、PM 末、DI 抽出物のエストロゲン活性  
KD : 葛根水抽出物、RC : RC エキス末、DI : DI 抽出物、PM : PM 末

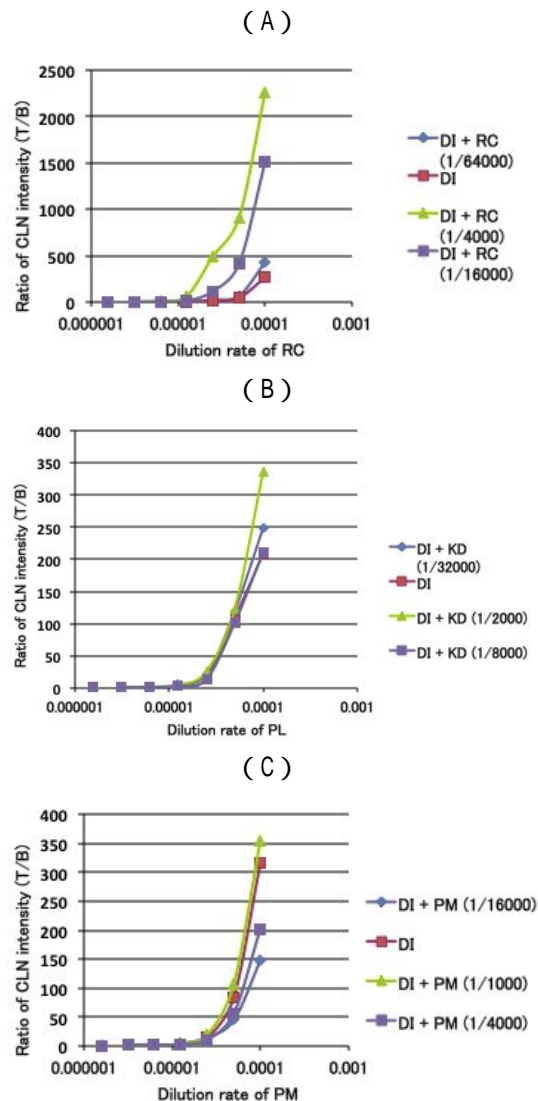


Figure 2. DI 抽出物と RC エキス末 (A)、KD (B)、PM 末 (C) を併用添加した際の複合エストロゲン活性

DI 抽出物と RC エキス末の併用では相加的にエストロゲン活性が強くなった。このことから、DI と RC を含むサプリメントを併用する際にはイソフラボンの過剰摂取とともにエストロゲン活性においても注意が必要であると考えられた。

## 5．主な発表論文等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

川添 禎浩 (KAWAZOE SADAHIRO)  
京都女子大学・家政学部・教授  
研究者番号：00224783

### (2)研究分担者

吉田 香 (YOSHIDA KAORU)  
京都光華女子大学・健康科学部・教授  
研究者番号：10336787