

高速液体クロマトグラフ法による 血中イソフラボンアグリコンの新しい検出法

川崎医科大学学生化学教室*¹・医用中毒学教室*²・公衆衛生学教室*³・川崎医科大学中央検査室*⁴
日高和夫*¹・東真由美*¹・渡辺洋子*¹・富田正文*²・勝山博信*³・為近美栄*⁴
(平成19年11月5日受理)

An Improved Analytical Method for Detection of Isoflavones in Plasma by
High Performance Liquid Chromatography

Kazuo Hidaka*¹, Mayumi Higashi*¹, Yoko Watanabe*¹, Masafumi Tomita*²,
Hironobu Katsuyama*³ and Yoshie Tamechika*⁴

Department of *¹Biochemistry, *²Medical Toxicology, *³Public Health and
*⁴Clinical Department, Kawasaki Medical School,

(Received on November 5, 2007)

概 要

高速液体クロマト (HPLC) 法による定量分析を日常検査法として実用化するために測定法の改良と工夫を行った。血漿からのイソフラボンアグリコンの抽出にSep-PakC18カートリッジを用い、これまでの液-液抽出法による煩雑さから単純化と迅速化へと移行させ、またHPLC法によるイソフラボン類の分離分析に濃度勾配法に代わって一定濃度法を導入し測定 of の迅速化をはかった。一家系(4名)において3名はエクオール産生者で、1名は非産生者であった。81名の健常者(閉経前女性)に三ヶ月間イソフラボンサプリメント摂取を実施した結果、42%がエクオール産生者であった。

Keyword: isoflavone HPLC

Abstract

To improve the commonly used method for carrying out high performance liquid chromatographic (HPLC) determination of isoflavones (daidzein, genistin and equol) in plasma, several modification were made in the extraction procedures and HPLC conditions. Solid-phase extraction techniques using the Sep-Pak C18 cartridge were considered preferable to liquid-liquid extraction because of their simplicity and the rapid quantitative extraction of isoflavones from the plasma samples. The separation of isoflavones was performed using a reproducible HPLC

method with a simple isocratic elution procedure instead of a linear gradient condition of the elution buffers.

Isoflavones in plasma in four members of one family were measured by our improved extraction procedures and new HPLC method and equol, which is a metabolic product derived from daidzein, was detected in three individuals (the remaining one is an equol nonproducer). We also conducted a pharmacokinetic study of soybean isoflavones in 81 healthy female volunteers before and after administration of isoflavone tablets (30mg/day) for three months. Consequently, the production of equol in plasma was administered in about 42% of these subjects.

はじめに

大豆や大豆製品に含まれるイソフラボンは種々の生活習慣病予防効果が期待されるフラボノイドの一種である。その構造が女性ホルモンであるエストロゲンに類似していること、また、実際にエストロゲン受容体に結合して弱い女性ホルモン様作用を示すことから植物性エストロゲンと呼ばれている¹⁾。特に、閉経前後の女性のイソフラボンの摂取は更年期障害のほてりなどの症状の軽減、骨粗鬆症や虚血性心疾患の予防に効果的であるとする疫学的調査結果もある^{2,3)}。大豆由来のイソフラボンはダイゼイン、ゲニステインなどで、そのほとんどが配糖体として存在し、生体内に摂取されると腸内細菌により糖が切断され、アグリコン(糖以外の部分)となって代謝を受け吸収される。ダイゼインはより活性の強いエクオール、または不活性型のO-デスマethylアニグルンシン(O-DMA)に代謝される(図1)。エクオールはヒト以外の動物では

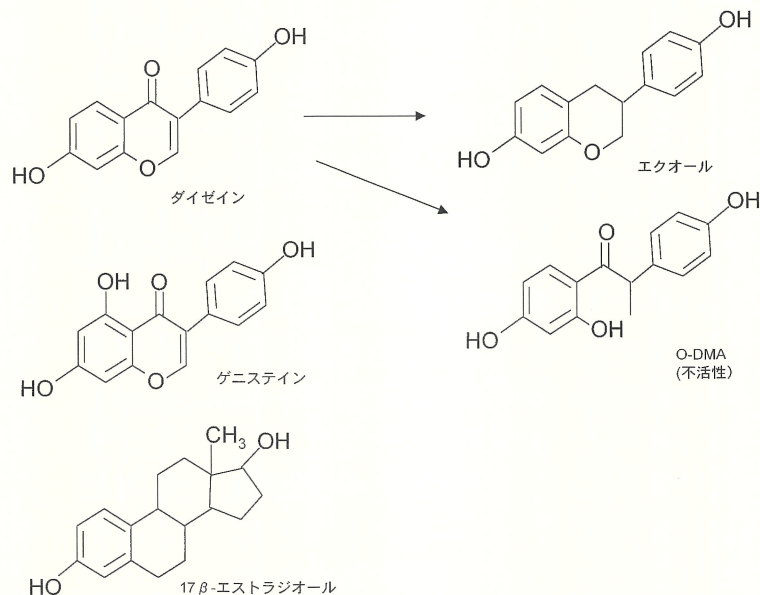


図1 大豆イソフラボンの構造と代謝

個体差なく産生されるが、ヒトでは30~50%のヒトしか産生しない⁴⁾。これは腸内細菌叢の違いによるものと云われている。体内に吸収されたイソフラボンの95%は肝臓でグルクロン酸抱合あるいは硫酸抱合を受ける。イソフラボンの代謝速度は速く、どれも24時間以内に尿中に排泄される。

今回、私共は微量のイソフラボン類の定性・定量することを目的として検討を重ねた結果、高速液体クロマト法 (HPLC) を用いて、迅速かつ簡便に測定できる方法を確立した。この測定法を用いて血液中のイソフラボンの測定を行なったので報告する。

1 測定方法

イソフラボンの抽出

試薬：測定に用いる以下の試薬は特級品もしくはHPLC用を用いた。メタノール、アセトニトリル (HPLC用特級品, ナカライテスク), 酢酸ナトリウム (特級品, ナカライテスク), Milli-Qシステムで精製したミリQ水, β -グルクロニダーゼ (Sigma), Sep-PakC18カートリッジ (Waters) (使用前にメタノール2ml, 蒸留水2mlの順に洗浄して前処理をする), ダイゼイン, ゲニステイン (Sigma), エクオール (Fluka), 内部標準物質 1,1-bis (4-hydroxyphenyl) ethane (Wako)

HPLC装置：Waters製626ポンプ, 727インジェクター, コントローラー

カラム：PuresilODS 250×4.6 mm, カラム温度 40℃

検出器：coulometric dual electrode detector (ESA), 650mV vs PD reference electrode

2 測定操作

1) 血漿試料の調整および加水分解

ヘパリン処理して得られた血漿200 μ lに0.2M酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 200 μ l, β -グルクロニダーゼ4 μ lおよび内部標準物質 (IS 5 μ g/ml) 10 μ lを加え, 混合後37℃で5時間加水分解を行った。

2) 抽出および洗浄

反応溶液を前処理したSep-PakC18カートリッジに通してイソフラボンを吸着させた。次いで, 0.2M酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 1ml, 蒸留水 1mlでカートリッジを洗浄した。最後にメタノール/アセトニトリル (1 : 1) 1mlでイソフラボンを溶出した。

3) 溶出液にN₂ガスを吹き付けて有機溶媒を除去し, 得られた乾固物に15%メタノール300 μ lを加えて溶解し, HPLC用試料とした。

4) HPLC測定

展開液：50mM酢酸ナトリウム (pH 4.8)：メタノール：アセトニトリル = 5 : 2 : 2

流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

3 結果と考察

図2に血漿に純品のダイゼイン, ゲニステインおよびエクオールを加えた時のHPLCパターンを示した。HPLCの溶出条件で3種のイソフラボンが良い分離を示した。

図3にH家系の4名 (KoH, KyH, TH, MH)の家系図とHPLCパターンを示した。4名についてのイソフラボンの検出パターンは日時を変えてもほとんど変わらなかった。また表1に4名のイソフラボンの代謝量を示した。KoHにはエクオールは検出されなかったが, 他の3名 (KyH, TH, およびMH) には量的には差があったが, いずれもエクオールが検出された。

図4は KoHとKyHに対してサプリメント摂取後採血し, 血中のダイゼインとゲニステインを経時的に測定した結果である。いずれも速い代謝を示し, KoHとKyHの両者とも摂取後4時間目にダイゼインとゲニステインの

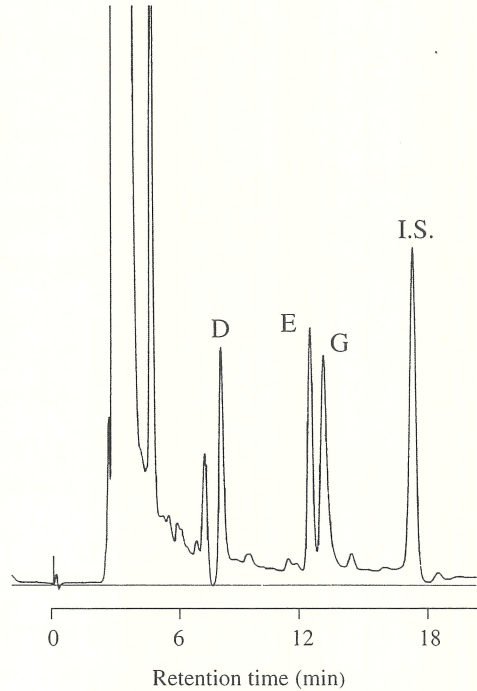


図2 HPLCによるイソフラボンの分離
D:ダイゼイン、E:イクオール、
G:ゲニステイン、IS:内部標準

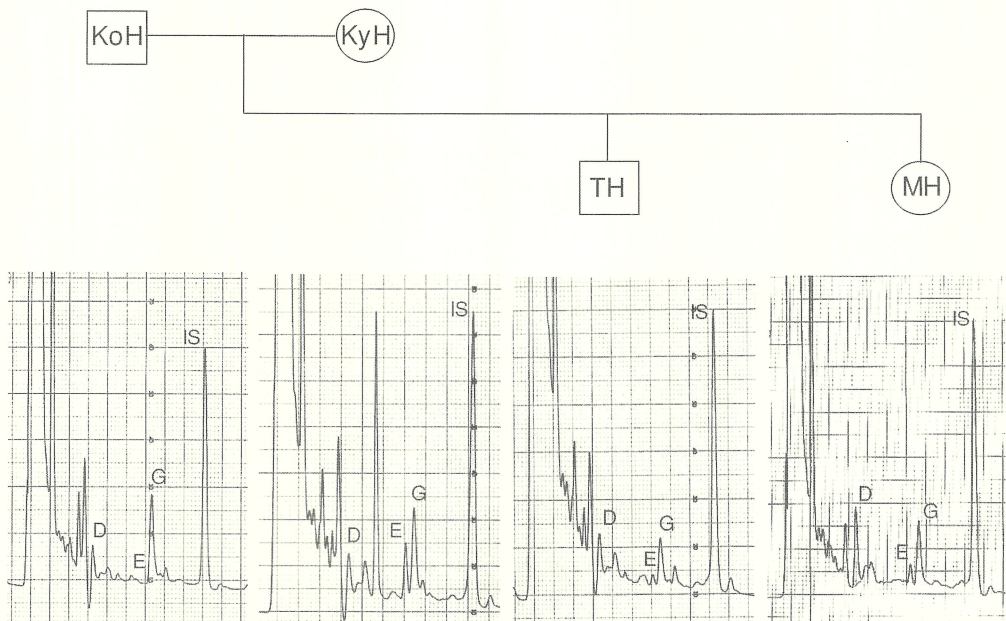


図3 H家系の4名 KoH, KyH, TH, MH のHPLCによる
血中イソフラボンの溶出パターン

	E (ng/ml)	D (ng/ml)	G (ng/ml)
KoH	0	1838	3488
KyH	89	1379	2864
TH	18	1497	1527
MH	37	2556	2133

表1 H家系の4名KoH, KyH, TH, MHのHPLCによる血中イソフラボンの測定値

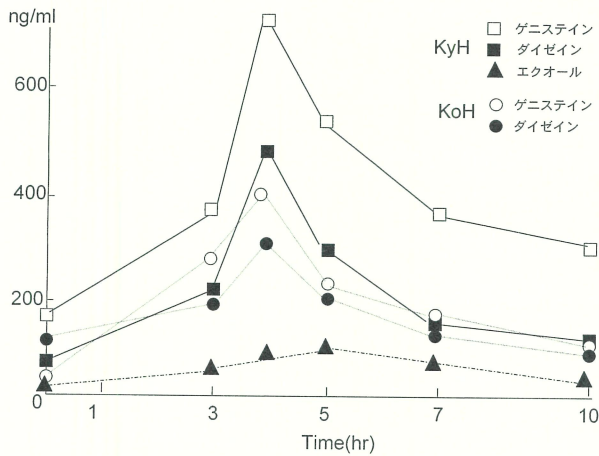


図4 サプリメント摂取後のKoHとKyHの血中イソフラボンの経時変化の測定

ピークを示した。渡辺らは7名の健常者にきな粉を摂取させ、平均して6時間後にピークを示していたが、これは我々の場合と異なり大豆加工品を用いており、純品より遅れて代謝されたと推測された⁹⁾。これらは24時間以内に尿中に排泄されるという代謝速度の速さを支持している。またKyHではエクオールは測定が可能であった。エクオールは2次的な代謝の関係から1時間遅れでピークが見られた。

某病院に勤務する閉経前の女性81名(インフォームドコンセントにより参加の意志を確認)に3ヵ月間のサプリメント摂取を行ったが、そのうちの3名(No.45, No.54およびNo.62)のサプリメント摂取前後の血中イソフラボンのHPLCパターンを図5に示した。ダイゼイン、ゲニステインについては日常的な食事もしているのでサプリメントによる大きな影響は見られなかった。エクオールについては、No.45は完全なエクオール非産生者であり、No.54とNo.62はエクオール産生者であった。しかし、No.54は摂取前にはエクオールは検出されず、摂取後に検出された。

この事はエクオール産生者でも食生活の変化によってはエクオールをほとんど産生しない場合もあることを示唆している。これは別の研究者からも報告されている(personal communication)。また、81名のイソフラボンサプリメント摂取による他の成績については共同研究者の勝山によって報告された⁶⁾。エクオールが注目されるのは、エクオールのエストロゲン様作用はダイゼインやゲニステインよりも強く、エクオール産生能の高い人では大豆加工食品の摂取により、血漿コレステロールおよび血漿トリグリセリドの低下効果、女性では乳がん、男性の前立腺がんのリスクの低下の報告がなされており、心血管疾患、乳がんおよび前立腺がんなどの予防とエクオール産生能との間に関連がある可能性が示唆されていることによる⁷⁾。閉経後5年間は、エストロゲンの分泌低下により急速に骨量の減少が見られ骨粗鬆症の原因となっている。アジア人女性は欧米人に比べ大腿骨頸部の骨折率が低い理由の一つに大豆製品の摂取量の違いがあげら

れているが、各国で行なわれたイソフラボン摂取試験ではイソフラボンの骨量減少抑制の有効性は閉経後10年以後では認められないと結論づけられている⁸⁾。

1つの家族では同じ食生活を長い年月続けているので、ほとんど同じ生活環境にあるため家族員の腸内細菌叢は似ているはずで、イソフラボンの代謝産物であるエクオールの産生も同じあると思われたが、実際には図3に示すように4名とも全く異なるHPLCパターンを示した。さらに表1のエクオールの代謝量から見ると腸内細菌叢によるよりもむしろ体内酵素に依存しているような遺伝性を示唆するものであった。最近、新聞で、「同じ食事をとることが多い家族同士でも腸内細菌集団に大きな違いがある」と報道されたが、これが家族員間での代謝物の産生の違いに関係しているか否かはまだ不明である。今後これらについて研究する必要がある。

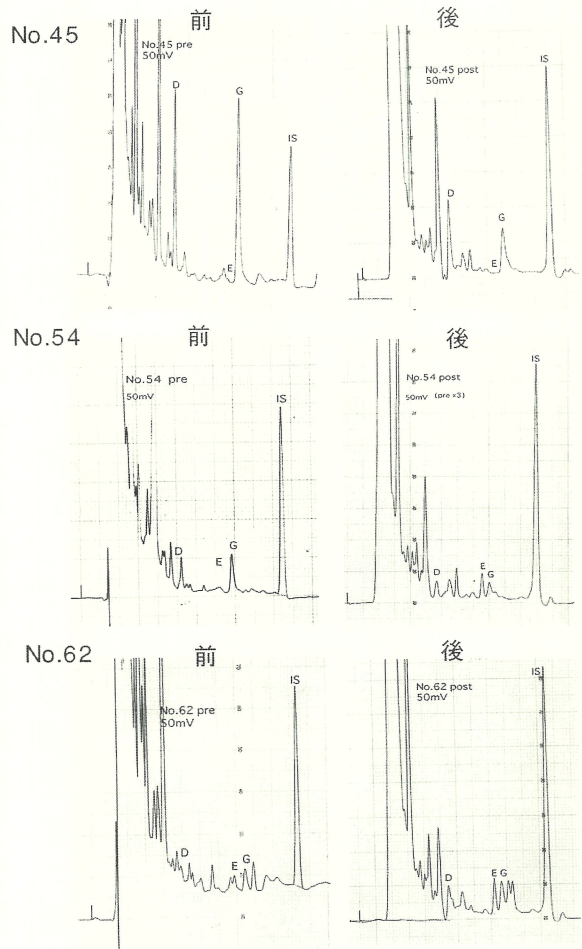


図5 サプリメント摂取前後のNo.45, 54, 62 3名のHPLCによる血中イソフラボンの溶出パターン

参 考 文 献

- 1) 香山不二雄, 荒尾行知: 植物エストロゲン 医学のあゆみ 201(2):151-152, 2002
- 2) 石見佳子: 大豆イソフラボン-骨粗鬆症の予防を中心に 臨床栄養 106(5): 593-599, 2005
- 3) 上村隆元, 上杉宰世, 菊池有利子, 渡邊昌: 骨粗鬆症と大豆イソフラボン 看護 54(3):82-87, 2002
- 4) Setchell K.D.R., Brown N.M and Lydeking-Olsen E.:The Clinical Importance of the Metabolite Equol-A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones J. Nutr. 132:3577-3584, 2002
- 5) Watanabe S., Yamaguchi M., Sobue T., Takahashi T., Miura T., Arai Y., Mazur W., Wahala K and Adlercreuts H : Pharmacokinetics of Soybeans in Piasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60g Baked Soybean Powder (Kinako) J. Nutr. 128:1710-1715, 1998
- 6) 勝山博信, 伏見滋子, 角南重夫, 富田正文, 奥山敏子, 日高和夫, 渡辺洋子, 為近美栄, 有井雅幸: 骨代謝に及ぼす遺伝子多型の影響とイソフラボンアグリコン摂取の関連 DNA多型 15:308-311, 2007
- 7) 田村基: イソフラボンを代謝する腸内細菌 機能性成分エコール生産に関与? 化学と生物 44(3):151-153, 2006