

Ⅱ 腸内菌叢による機能成分の代謝変換に関する解析

1. はじめに

ヒトの腸内には 100 兆個以上の腸内細菌が生息し、糞便のうち、約半分が腸内細菌またはその死骸であると言われている。腸内菌叢はヒトが摂取した栄養分の一部を利用し、腸内菌同士でバランスを保ちながら、腸内フローラ（腸内菌叢）と呼ばれる一種の生態系を形成している。近年、腸内菌叢がヒトの健康に深く関係していることが明らかになりつつある。肥満および 2 型糖尿病の増加は単にヒト遺伝子の変化によるものだけでなく、腸内菌叢が関与していることが示唆されている^{1) 2)}。肥満状態では、痩せたヒトに比べてフィルミクテス門に属する細菌群のレベルが高く、バクテロイデス門に属する細菌群のレベルが低いことが報告されている³⁾。近年盛んに行われている種々の研究は、腸内菌叢が肥満に対して影響を及ぼすことを明らかにしつつある。我々が食事として摂取する食品の未消化の栄養分の一部を腸内菌叢が利用していることから、食事は腸内菌叢に影響を及ぼす。食品成分の腸内菌叢による代謝は、その代謝産物と宿主の健康との関連性を検討する上では重要である。

腸内菌叢が代謝に関わっている成分として多糖類やフィトエストロゲン等が知られている。フィトエストロゲンとは、女性ホルモンのように機能する外因性エストロゲンのことであり、植物エストロゲンとも呼ばれる。代表的なフィトエストロゲンには、大豆イソフラボンや植物リグナンがある。腸内菌叢は、腸内においてフィトエストロゲン代謝に影響を及ぼしている。腸内菌叢は、植物リグナンの一つセコイソラリシレジノールジグルコシドからは、エンテロジオールやエンテロラクトンを産生する。また、大豆イソフラボンのダイゼインからは、ダイゼインよりもエストロゲン活性が強い equol (エコール) を産生する。しかし、フィトエストロゲンの腸内菌叢による代謝については未解明の部分が多く、腸内菌叢のフィトエストロゲンの代謝性の解明は、食品成分と腸内菌叢の関連を明らかにする上では、重要な課題の一つであると考えられる。

2. フィトエストロゲンの機能性

フィトエストロゲンの機能性に関しては種々の報告がなされている。大豆イソフラボンや味噌汁の摂取が多いヒトほど乳がんリスクが低い傾向があること⁴⁾や、前立腺癌の発症率は、エコールの血漿濃度が高い人ほど低いこと等が報告されている⁵⁾。乳がんでの死亡リスクは、血清エンテロラクトン濃度が高い女性ほど低いといった報告⁶⁾もなされている。

尿中エンテロリグナン（エンテロジオール＋エンテロラクトン）濃度と血清トリグリセリド濃度とが逆相関にあり、エンテロリグナン濃度と血清 HDL コレ

ステロールレベルが正の相関があることが報告されている⁷⁾。亜麻仁（アマニ）粉はセコイソラリシレジノールジグルコシドを多く含む。このアマニ粉を閉経女性に投与することで、血清LDLや血清トリグリセリドが低下したため、閉経女性へのアマニ粉の投与は脂質代謝を改善する可能性が示唆されている⁸⁾。

フィトエストロゲンの更年期障害予防効果や骨粗鬆予防効果も期待されている。S-エコーサプリメントSE5-OH 40mg/dayを閉経した女性に投与した場合、イソフラボンを閉経した女性に投与する場合よりもホットフラッシュの頻度を減少させたことから、エコーの投与は閉経した女性の更年期障害改善に寄与すると推察されている⁹⁾。

日本人の閉経した女性で閉経後5年以内の人に対して24週間のヒト試験を行い、イソフラボン投与群には、75mgのイソフラボンを投与し、プラセボ群には、デキストリンを投与し、全ての被験者には日常摂取する程度の大豆食品の摂取を許可した。24週間の試験後、イソフラボン投与群と非投与群の間には骨密度に有意な差は認められなかったが、エコー産生者と非産生者に分けてイソフラボンの骨密度に対する効果を検討した場合、エコー産生者に対して体全体の骨密度の有意なプラスの効果が認められたことが報告されている¹⁰⁾。

3. 腸内菌叢による植物リグナンの代謝

代表的な植物リグナンにはゴマに含まれているセサミンや亜麻仁（アマニ）に含まれているセコイソラリシレジノールジグルコシドなどがあるが、セリ、アスパラガス、小松菜、ワサビ、ゴボウ、ゆず等にも植物リグナンが含まれ、植物リグナンは農産物に広く分布している。植物リグナンには、セサミンの他にもマタイレジノール、セコイソラリシレジノール、ピノレジノール、アルクチゲニン、7-ヒドロキシマタイレジノール、ラリシレジノールなどが存在する¹¹⁾。

腸内菌叢は植物リグナンを代謝し、エンテロジオールやエンテロラクトンなどの哺乳類リグナンと呼ばれるリグナンを消化管内で産生する。健康人にゴマを投与した後に血液を採取し、血漿を分析したところ、セサミン濃度よりも高い濃度でエンテロラクトンやエンテロジオールが検出されたことが報告されている¹²⁾。さらに、成人女性にアマニを投与した場合、尿へのエンテロラクトンやエンテロジオールの排泄量が、アマニに含まれる植物リグナンのセコイソラリシレジノールよりも多かったことが報告されている¹³⁾。ヒトが摂取した植物リグナンは、その多くが腸内菌叢の働きにより消化管内で哺乳類リグナンに変換されていると推定される。

セコイソラリシレジノールジグルコシドは、植物リグナンの配糖体である。セコイソラリシレジノールジグルコシドは、ジグルコシドの加水分解反応、脱メチル化反応、脱水酸化反応、脱水素反応といった腸内細菌による複数の代謝変換を経て、最終産物の一つエンテロラクトンを産生する（図1）。

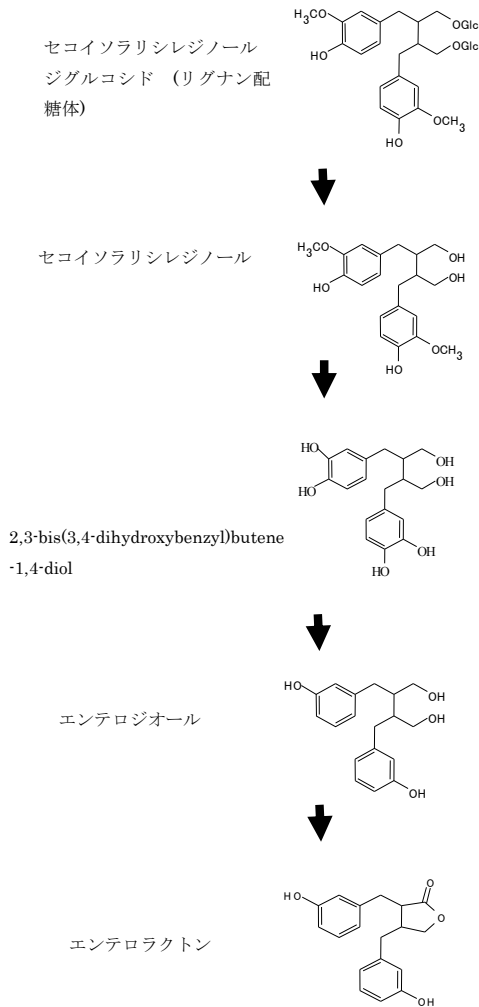


図 1. 腸内細菌によるセコイソラリシレジノールジグルコシドの代謝経路¹⁴⁾

セコイソラリシレジノールジグルコシドのジグルコシドの加水分解反応に関与する腸内細菌は、*Bacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium cocleatum*, *C. ramosum* などが報告されている¹⁴⁾。著者らも健康人の糞便からセコイソラリシレジノールからセコイソラリシレジノールジグルコシドのジグルコシドの加水分解反応に関与する腸内細菌を見出したが、この腸内細菌は、*Clostridium* sp. SDG1020 株で *C. ramosum* と 16SrRNA 遺伝子の相同性が高い。

セコイソラリシレジノールから 2,3-bis (3,4-dihydroxybenzyl) butene-1,4-diol への変換には脱メチル化反応に関与する腸内細菌 *Eubacterium callanderi*, *E. limosum*, *Peptostreptococcus productus* 等が関与していることが報告されている¹⁴⁾。*C. scindens* DSM5676^T, *Eggerthella lenta* DSM2243^T は *P. productus* SECO-Mt75m3 と共培養することでセコイソラリシレジノールからエンテロジオールへの変換に関与している¹⁴⁾。著者らは 2 菌の作用によってセコイソラリシレジノールからエンテロジオールへ変換する腸内細菌 *Eggerthella* sp. SDG-1110 と *Eubacterium* sp. SDG-1220 とを健康人の糞便から見出している。*Eggerthella* sp. SDG-1110 は *E. lenta* DSM 2243 (Accession no: CP001726) と 16SrRNA 遺伝子の相同性が高い。一方, *Eubacterium* sp. SDG-1220 は 16SrRNA 遺伝子の相同性が最も高い菌が *E. limosum* KIST612 (Accession no: CP002273) であり, 455 塩基中 432 塩基しか一致しなかった (94%) ことから, 本菌は新菌種の可能性が高い。エンテロジオールからエンテロラクトンへの変換には, 脱水素反応に関与する腸内細菌 *Lactonifactor longoviformis* が関与していることが知られている¹⁴⁾。著者らもエンテロジオールからエンテロラクトンへの変換に関与する腸内細菌を見出している。この腸内細菌は *L. longoviformis* DSM 17459^T (Accession no: DQ100449) の 16SrRNA 遺伝子の 435 塩基が完全に一致していた (100%) ため, *L. longoviformis* に属すると考えられる。

エンテロジオールやエンテロラクトンの産生性には個人差があることが知られている¹⁵⁾。エンテロジオールやエンテロラクトンは, 元の化合物である植物リグナンとは機能性が異なることが報告されているため, ヒト糞便菌叢のエンテロラクトン産生性の個人差を解明することは重要な課題と考えられる。また, エンテロジオールやエンテロラクトン産生性腸内菌叢の消化管内での機能性はほとんど解明されていないため, 今後これらのフィトエストロゲン産生性腸内菌の機能性解明も必要になってくると考えられる。

4. 腸内菌叢による大豆イソフラボンの代謝

エコールは, 大豆イソフラボンの一つダイゼインの腸内菌叢による代謝産物であるが, ダイゼインよりもエストロゲン作用が強いことが知られている。エコールはダイゼインよりもエストロゲン作用が強いため, 腸内菌叢の違いが大豆イソフラボンの機能性の違いに影響を及ぼすと考えられている。しかし, エコールの産生性は非常に個人差が大きいの。エコール産生者の割合は欧米人よりも日本人の方が高いことが知られている。欧米では 30% 程度, 日本人では 50% 程度エコール産生能を有していると考えられている。食事が腸内菌叢に影響を及ぼすことから, 食生活の違いが日本人と欧米人のエコール産生性の違いに影響を及ぼしているのかもしれない。

腸内細菌は, 大豆イソフラボンの腸内代謝に重要な働きを行っている。大豆イ

ソフラボンの配糖体の一つであるダイジンは腸内細菌による加水分解反応を受けて、アグリコンであるダイゼインを生成する。この反応には、糖加水分解酵素を有する種々の腸内細菌が関与する。ビフィズス菌や大腸菌、乳酸菌の β -グルコシダーゼはダイジンからダイゼインを生成することが知られている (図2)。

ダイゼインからは、腸内細菌の還元反応によりフラボノイド骨格の二重結合が還元されてジヒドロダイゼインを産生する。筆者が健常人の糞便から分離した *Coprobacillus* sp. strain TM-40 株は、ダイゼインからジヒドロダイゼインを産生した¹⁷⁾。16SrRNA 相同性の解析結果から、*Coprobacillus* sp. strain TM-40 株は *Coprobacillus cateniformis* JCM 10603 (Accession no: AB030218) と 93% の相

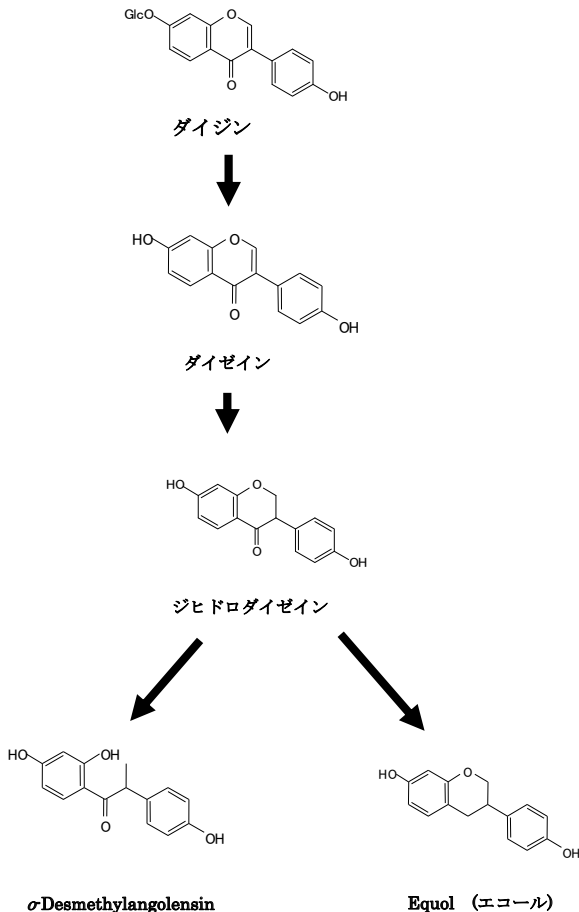


図2. 腸内細菌によるダイゼインの代謝経路¹⁶⁾

同性を有していた (図3)。 *Coprobacillus* sp. strain TM-40 は、最も相同性の高い細菌とでも 93%しか一致しないことから新奇腸内細菌であると考えられた。

ジヒドロダイゼインからは、主としてエコールと *O*-desmethylangolensin, この二つの代謝産物が産生することが知られている。 *E. ramulus*¹⁸⁾, strain HGH 136¹⁹⁾, strain SY8519²⁰⁾, などの腸内細菌はジヒドロダイゼインから *O*-desmethylangolensin を産生する。エコール産生菌の一つ *Eggerthella* sp. Julong 732 は、ジヒドロダイゼインからエコールを産生することが知られている²¹⁾。しかし、エコール産生菌である *Lactococcus garvieae* (Lc 20-92)²²⁾, *Slackia isoflavoniconvertens* DSM 22006²³⁾, *Slackia* sp. strain NATTS²⁴⁾, *Adlercreutzia equolifaciens*²⁵⁾ などはダイゼインからエコールを産生することが知られている。筆者が健常人の糞便から分離した *Slackia* sp. strain TM-30 もダイゼインからエコールを産生する²⁶⁾。16SrRNA 相同性の解析結果から、 *Slackia* sp. strain TM-30 は、 *Slackia* sp. strain NATTS (Accession no: AB505075) と 99% のホモロジーを有していた (図4)。

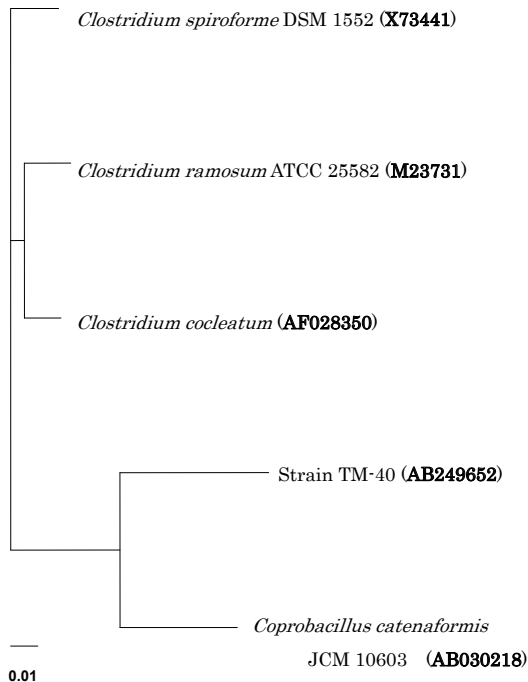


図3. Strain TM-40 の系統樹

バー (-) は塩基置換 % を示した。(0.01 は 1% 置換)

5. ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢に及ぼす大豆イソフラボンの影響

無菌マウスは腸内細菌を全く有していないマウスであり、ビニールアイソレーター内で滅菌飼料と滅菌水を与えて飼育することが可能である。無菌マウスを飼育しているビニールアイソレーターに飼料や飲水を搬入する場合は、飼料については、ガンマー線滅菌したものを、飲水については、オートクレーブ滅菌したものを無菌的にビニールアイソレーター内に搬入して使用する（図5）。

ビニールアイソレーター内で飼育している無菌マウスに、ヒトの糞便希釈液を

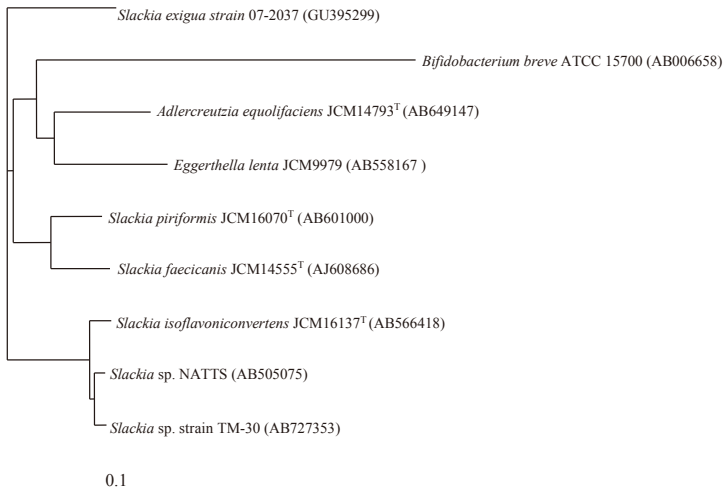


図 4. *Slackia* sp. strain TM-30 の系統樹
バー (—) は塩基置換 % を示した。

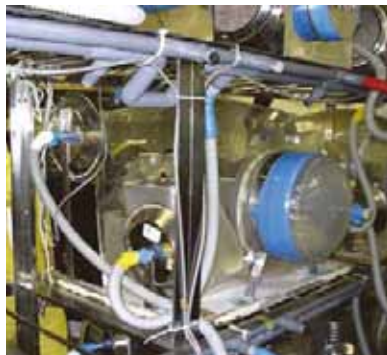


図 5. ビニールアイソレーターによる無菌マウスの飼育

投与することでヒトの腸内菌叢のみを有するヒト型腸内菌叢マウスを作製することが可能である。ヒト型腸内菌叢マウスはヒト由来の腸内細菌の機能を評価するには重要なツールである。ところで、肥満症状を示す Toll 様レセプター 5 を遺伝的に欠損したマウスの腸内菌叢を無菌マウスに移植すると、肥満になるとともに移植元の肥満マウスと同様に多くのメタボリックシンドロームの病態になることが報告されている²⁷⁾。イソフラボンの投与が腸内菌叢に及ぼす影響を検討する場合、ヒトの腸内菌叢を定着させたヒト型腸内菌叢マウスを用いて実験する方が、通常のマウスを用いて実験するよりも、イソフラボン投与がヒトの腸内菌叢に及ぼす影響をより推定し得ると考えられる。

筆者らは、無菌マウスにエコール産生性のヒト糞便を投与してヒト型腸内菌叢マウスを作製した。作製したヒト型腸内菌叢マウスと無菌マウスにイソフラボンを投与した場合、対照の無菌マウスでは、イソフラボンを投与してもエコールが産生されなかったのに対して、ヒト型腸内菌叢マウスでは、エコールが検出された。さらに、このヒト型腸内菌叢マウスにイソフラボンを投与した場合と、投与しない場合とで腸内菌叢の比較を行い、Clostridia の菌数が有意に高いことを明らかにした (図 6)。このことから、イソフラボンは Clostridia に対して増殖促進効果を有する可能性が示唆された²⁸⁾。

6. 乳酸菌によるイソフラボンの代謝性の解析

ゲニステインは、主要な大豆イソフラボンの一つである。筆者らが、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771 をダイジンもしくはダイゼインと嫌気培養

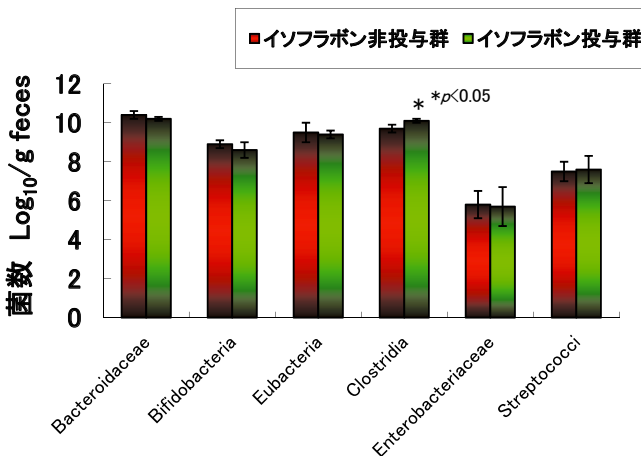


図 6. イソフラボン投与ヒト型腸内菌叢マウスと非投与ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢の比較

を行ったところ、ダイジンからはゲニステインが産生したがダイゼインからはゲニステインは産生しなかった²⁹⁾。(図7) このようにダイジンから乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 の作用でゲニステインが産生したことから、消化管内においてもダイジンからダイゼインやエコールが産生する反応ばかりでなく、ダイジンからゲニステインも産生している可能性がある。

エコール産生者の糞便希釈液にダイゼインを添加して *ex vivo* で嫌気培養を行った。エコール産生者の糞便希釈液に乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加した場合と添加しない場合とでダイゼインからのエコール産生性を比較すると乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加した方がエコール産生性が高まる傾向が認められた²⁹⁾。ヒトの腸内菌叢は個人差が大きいことが知られているため、すべてのヒトの腸内菌叢で乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 がエコール産生性を高めるかどうかは不明であるが、少なくとも、乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加してエコール産生性が向上したヒトの糞便の提供者に関しては、この乳酸菌を摂取することでエコール産生性が高まる可能性はある。

7. ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝性の解析

エコール産生能は個人差が大きいことが知られている。しかし、ヒトの腸内菌叢のダイゼインの代謝性と食事との関連性についての報告は少ない。そこで、京都府立医科大学の協力のもとで23才～60才の成人男女合計30名の糞便を採取し、糞便菌叢のダイゼイン代謝試験と食物摂取頻度調査 (Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups: FFQg) を行い、腸内菌叢のダイゼイン代謝産物と食事情報との関連性を検討した。成人男女合計30名の新鮮糞便は、嫌

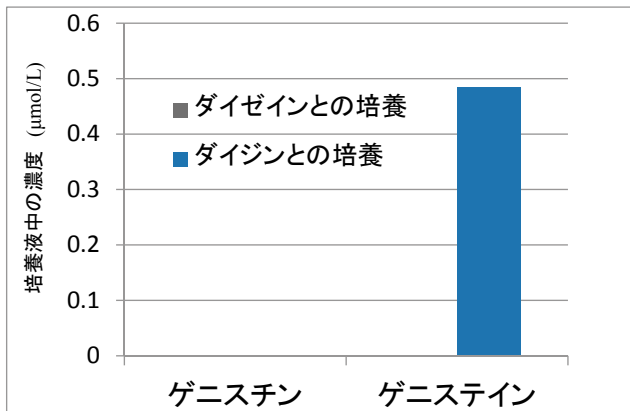


図7. *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771 とダイジンもしくはダイゼインとの嫌気培養結果

気度を保ちつつ、嫌気性培養液で希釈した。この新鮮糞便の希釈液にダイゼインを添加し、嫌気培養を行い、培養物の抽出物をLC-MS/MSで解析した。さらに、ヒト糞便希釈液とダイゼインとの嫌気培養で得られたジヒドロダイゼインやエコール濃度の結果と食物摂取頻度調査によって得られた摂取食品成分やBMI（ボディマス指数）の情報を解析した。

その結果、ヒト糞便のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性はヒトによって個人差が大きいことが明らかとなった（図8）。また、ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝産物の一つジヒドロダイゼイン産生性は、男性と女性では異なり、男性の方が

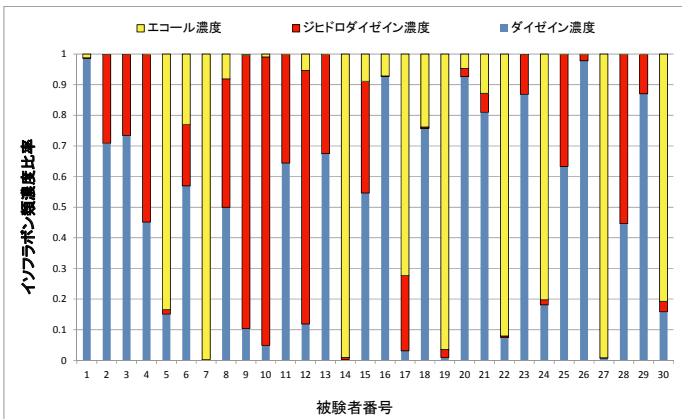


図 8. ヒト糞便菌叢のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性の比較

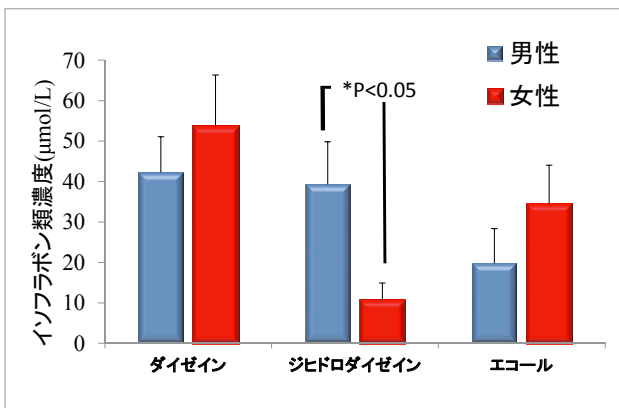


図 9. ヒト糞便菌叢のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性の男女における比較
成人男性 15 人 成人女性 15 人での比較

有意に高い結果となった (図9)。

イソフラボンの代謝性は個人差が大きいにも関わらず、BMI 値とイソフラボンの代謝物との間には、男性と女性の間で異なった相関が認められた³⁰⁾。さらに、男性糞便菌叢培養液のジヒドロダイゼイン濃度と BMI 値との間に負の相関が認められ、(r=-0.66) 女性糞便菌叢培養液のエコール濃度と BMI 値との間には負の相関 (r=-0.4) が認められた。男性糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生性と BMI 値との間には負の相関が認められたため、男性糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生性と摂取食品成分との関連性を検討したところ、水溶性食物繊維摂取量とジヒドロダイゼイン産生性との間に正の相関が認められた (r=0.56)。調査した男性の BMI 値と水溶性食物繊維摂取量との間には負の相関が認められた (r=-0.52)。

近年、腸内菌叢がメタボリックシンドロームに関連しているという報告がある^{1) 2)}。イソフラボン類は、抗酸化作用を発揮していることが推察されている³¹⁾。また、イソフラボン類の弱いエストロゲン様活性が宿主の健康に寄与していることも推察されている³²⁾。しかし、エコールに比べて、ジヒドロダイゼインはエストロゲン活性が弱いことが知られており、男性の糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生能が BMI 値と負の相関が認められた原因は現在のところ不明である。本研究結果は、男性のジヒドロダイゼイン産生に関与する腸内菌叢が肥満抑制に関連する可能性を示唆する初めての知見である。しかし、被験者の数が少なく、予備的知見であるため、ジヒドロダイゼイン産生に関与する腸内菌叢が肥満抑制に関連するか否かはさらに被験者の数を増やして詳細に検討する必要がある。

肥満した成人に対して 10mg の S-エコールを含むタブレットを 12 週間に渡って投与したヒト試験では、S-エコールを投与した群はプラセボ投与群に比較して血清 LDL コレステロールレベルが有意に低値を示したことが報告されている³³⁾。今回のヒト試験では、女性の腸内菌叢のエコール産生能と BMI 値とに負の相関が認められた。腸内菌叢のエコール産生能力の高さは、脂質代謝の改善に寄与する可能性が示唆される。エコール産生性は、閉経した女性にとって有用であると考えられる。

動物試験のデータではあるが、レジスタントスターチ (難消化性でんぷん)³⁴⁾ やポリデキストロース^{35) 36)} がエコール産生性を高めるといった報告がある。したがって難消化性でんぷんや水溶性食物繊維を豊富に含む食材はエコール産生性を強化し得る候補食品成分の可能性がある。

近年、腸内菌叢がヒトの健康に深く関係していることが明らかになりつつある。しかし、フィトエストロゲンの腸内菌叢による代謝については未解明の部分が多い。今後の腸内菌叢のフィトエストロゲンの代謝性の解明は、腸内菌叢の生理学的意義の解明に大きく貢献すると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果のうち「腸内菌叢の植物リグナン代謝」に関しては、日本製粉株式会社との共同研究による成果である。「ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢に及ぼす大豆イソフラボンの影響」に関しては、東京大学大学院農学生命科学研究科との共同研究による成果である。「ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝性の解析」に関しては、農林水産省委託プロジェクト「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発（平成23～25年度）」の助成により京都府立医科大学と共同で実施されたものである。

（食品機能研究領域 機能生理評価ユニット 田村 基）

引用文献

- 1) Lau E, Carvalho D, Pina-Vaz C, Barbosa JA and Freitas P, Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes. *Hormones (Athens)*, **14**, 358-369 (2015).
- 2) Delzenne NM, Cani PD, Everard A, Neyrinck AM and Bindels LB, Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes, *Diabetologia*, **58**, 2206-2217 (2015).
- 3) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity, *Nature*, **444**, 1022-1023 (2006).
- 4) Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S and Tsugane S, Japan Public Health Center-Based Prospective Study on Cancer Cardiovascular Disease Group, Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 906-913 (2003).
- 5) Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM and Pantuck AJ, Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **34**, 86-89 (2004).
- 6) Guglielmini P, Rubagotti A and Boccardo F, Serum enterolactone levels and mortality outcome in women with early breast cancer: a retrospective cohort study, *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 661-668 (2012).
- 7) Peñalvo JL, López-Romero P, Urinary enterolignan concentrations are positively associated with serum HDL cholesterol and negatively associated with serum triglycerides in U.S. adults, *J. Nutr.*, **142**, 751-756 (2012).
- 8) Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker BJ and Arjmandi BH, Flaxseed improves lipid profile without altering

- biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 1527-1532 (2002).
- 9) Jenks BH, Iwashita S, Nakagawa Y, Ragland K, Lee J, Carson WH, Ueno T and Uchiyama S, A pilot study on the effects of S-equol compared to soy isoflavones on menopausal hot flash frequency, *J. Womens Health (Larchmt)*, **21**, 674-682 (2012).
 - 10) Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M and Ishimi Y, Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial, *Menopause*, **14**, 866-874 (2007).
 - 11) Peñalvo JL, Adlercreutz H, Uehara M, Ristimäki A and Watanabe S, Lignan content of selected foods from Japan, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 401-409 (2008).
 - 12) Peñalvo JL, Heinonen SM, Aura AM and Adlercreutz H, Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans, *J. Nutr.*, **135**, 1056-1062 (2005).
 - 13) Nesbitt PD, Lam Y and Thompson LU, Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed, *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 549-555 (1999).
 - 14) Clavel T, Henderson G, Engst W, Doré J and Blaut M, Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diglucoside, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **55**, 471-478 (2006).
 - 15) Saarinen NM, Smeds AI, Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H and Mäkelä S, Flaxseed ingestion alters ratio of enterolactone enantiomers in human serum, *J. Nutr. Metab.*, pii, 403076. doi: 10.1155/2010/403076. (2010).
 - 16) Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G, Cassidy A, Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.* **89**, Suppl 1, S45-S58 (2003).
 - 17) Tamura M, Tsushida T and Shinohara K, Isolation of an isoflavone-metabolizing, *Clostridium*-like bacterium, strain TM-40, from human faeces, *Anaerobe*, **13**, 32-35 (2007).
 - 18) Schoefer L, Mohan R, Braune A, Birringer M and Blaut M, Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**, 197-202 (2002).
 - 19) Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay JO Jr, Freeman JP, Dore J and Rafii F, Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein, *Arch. Microbiol.*, **178**, 8-12 (2002).
 - 20) Yokoyama S, Niwa T, Osawa T and Suzuki T, Characterization of an O-desmethylangolensin-producing bacterium isolated from human feces, *Arch. Microbiol.*, **192**, 15-22 (2010).

- 21) Kim M, Kim SI, Han J, Wang XL, Song DG and Kim SU, Stereospecific biotransformation of dihydrodaidzein into (3S)-equol by the human intestinal bacterium *eggerthella* strain Julong 732, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3062-3068 (2009).
- 22) 内山成人, 上野友美, 鈴木淑水, 新規エクオール産生乳酸菌のヒト糞便からの単離・同定, 腸内細菌学雑誌, **21**, 217-220 (2007).
- 23) Matthies A, Blaut M and Braune A, Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1740-1744 (2009).
- 24) Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Miyanaga N and Akaza H, Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS, *Arch. Microbiol.*, **192**, 279-287 (2010).
- 25) Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T and Benno Y, *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *eggerthella*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 1221-1227 (2008).
- 26) Tamura M, Hori S and 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.*, **20**, 309-316 (2014).
- 27) Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT, Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, **328**, 228-231 (2010).
- 28) Tamura M, Hirayama K, Itoh K and Shinohara K, Effects of human intestinal flora on plasma and caecal isoflavones, and effects of isoflavones on the composition and metabolism of flora in human flora-associated (HFA) mice, *Microbial. Ecol. Health Dis.*, **16**, 18-22 (2004).
- 29) Tamura M, Hori S and Nakagawa H, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771: impact on metabolism of isoflavonoids in the fecal flora from a male equol producer, *Curr. Microbiol.*, **62**, 1632-1637 (2011).
- 30) Tamura M, Hori S, Nakagawa H, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. Relationships among fecal daidzein metabolites, dietary habit and BMI in healthy volunteers: a preliminary study. *Biosci. Microbiota. Food Health.*, **34**, 59-65 (2015)
- 31) Bhathena SJ and Velasquez MT, Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1191-1201 (2002).
- 32) Ørsgaard A and Jensen L, The effects of soy isoflavones on obesity, *Exp. Biol.*

- Med. (Maywood)*, **233**, 1066-1080 (2008).
- 33) Usui T, Tochiya M, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Himeno A, Shimatsu A, Inaguma A, Ueno T, Uchiyama S and Satoh-Asahara N, Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **78**, 365-372 (2013).
 - 34) Tousen Y, Abe F, Ishida T, Uehara M and Ishimi Y, Resistant starch promotes equol production and inhibits tibial bone loss in ovariectomized mice treated with daidzein, *Metabolism*, **60**, 1425-1432 (2011).
 - 35) Tamura M, Hori S and Nakagawa H, Impact of dietary polydextrose on the daidzein metabolism in adult mice, *Bioscience and microflora*, **29**, 185-190 (2010).
 - 36) Tousen Y, Uehara M, Kruger MC and Ishimi Y, Effects of dietary fibre and tea catechin, ingredients of the Japanese diet, on equol production and bone mineral density in isoflavone-treated ovariectomised mice, *J. Nutr. Sci.*, **1**, e13, doi: 10.1017/jns.2012.14 (2012).

