

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19300237  
 研究課題名（和文）イソフラボン代謝産物に着目した骨粗鬆症の予防に関する研究

研究課題名（英文） Effect of FOS on production of isoflavone metabolite

研究代表者

石見佳子（ISHIMI YOSHIKO）

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品保健機能プログラム・プログラムリーダー

研究者番号：50154159

研究成果の概要（和文）：

我々は、先行研究において、健常な閉経後女性を対象に大豆イソフラボンの介入試験を実施し、イソフラボン摂取群では、ダイゼインからエクオールへの代謝能を有する者が、有しない者に比べて骨量の減少率が低いことを明らかにした。このことから、エクオール産生能を高めることにより、閉経後の骨量減少を効率よく抑えることができると考えられた。そこで本研究において、エクオール産生能を高める食品成分を骨粗鬆症モデルマウスを用いて検索したところ、水溶性食物繊維、大豆オリゴ糖がエクオール産生を高めることが明らかになった。また、閉経後女性を対象に、大豆イソフラボンと難消化性オリゴ糖の併用効果を評価したところ、両者の2週間の併用摂取は、エクオール産生能の有無に関わらず、エクオール産生を亢進しなかった。

研究成果の概要（英文）：

In the previous study, we conducted a randomized controlled trial of soybean isoflavones in postmenopausal Japanese women resulting that % change in bone loss in equol producer was significantly lower than that in non-producers in isoflavone treatment group. These results suggest that the enhancement of equol production may efficiently prevent bone loss in estrogen deficient status. In this study, it was appeared that dietary fiber and non-digestible soybean oligosaccharides stimulated equol production and this efficiently led to prevent bone loss in ovariectomized mice. In the intervention study of isoflavones and fructo-oligosaccharide in postmenopausal Japanese women for 2 weeks did not stimulate equol production despite ability to produce equol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2400000	720000	3120000
2008年度	5500000	1650000	7150000
2009年度	5500000	1650000	7150000
年度			
年度			
総計	13400000	4020000	17420000

研究分野：総合領域

科研ひの分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学・

キーワード：生活習慣病、骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が急速に進む中、21世紀の保健医療は、生活習慣病に対する予防が最重要課題となっている。骨粗鬆症の発症には食事や運動等の生活習慣が関わっていることから、その改善による予防が期待されている。最近の疫学調査では、弱いエストロゲン様作用を示す大豆イソフラボンの摂取量が骨密度と正の相関を示すこと、また欧米で行われた閉経後女性を対象とした介入研究においては、大豆イソフラボンの摂取が腰椎や大腿骨の骨量減少を抑えることが報告されている。一方、日本人におけるイソフラボンの骨量に対する効果は、必ずしも一致した結論は得られていないが、骨吸収を抑制する可能性が示唆されている。特に、イソフラボンの中でももっともエストロゲン様作用が強い、エクオール腸内における産生能が骨量に影響するとの報告が目ざされている。エクオール産生に関わる腸内細菌には個人差があることが分かっており、これがイソフラボンの有効性に関わる個体差の原因の一つであると考えられている。

## 2. 研究の目的

我々は、現在までに大豆イソフラボンが閉経後骨粗鬆症モデル動物において、骨量減少を抑制することを報告してきた。また、健常な閉経後日本人女性を対象に、大豆イソフラボンの介入試験を実施し、イソフラボン摂取群ではダイゼインの代謝産物であるエクオールの産生者は非産生者に比べて骨量の減少率が低いことを明らかにした。これらのことから、エクオール産生を高めることにより、閉経後の骨量減少を効率よく抑えることができると考えられる。そこで本研究では、エクオール産生を高める食品成分を検索し、最終的には骨粗鬆症予防メニューを提案する。H19年度は、骨粗鬆症モデル動物を用いて、ダイゼインに加え各種食品成分を併用摂取させ、エクオールの産生能に対する影響を評価した。H20年度は、エクオール産生能のある閉経後女性を対象に、H21年度は、エクオール産生能のない者を対象に、大豆イソフラボンとフラクトオリゴ糖の併用摂取がエクオール産生能に及ぼす影響を評価した。

## 3. 研究の方法

①エクオール産生を亢進させる食品成分の検索  
閉経後骨粗鬆症モデルマウスに、大豆イソフラボンに加えて、ポリデキストロース、大豆

オリゴ糖、カテキン、高炭水化物食を6週間摂取させ、血中エクオール濃度を評価することで、エクオール産生能への影響を評価した。同時に、大腿骨及び頸骨の骨密度をDXA法により評価した。

②閉経後女性を対象とした大豆イソフラボンとフラクトオリゴ糖 (FOS) のエクオール産生への影響

**1) 対象者：**45歳～65歳の閉経後女性50名を新宿区広報などにより募集した。まず、予備試験として、3日間大豆イソフラボン (市販の大豆菓子：イソフラボン約20mg/日) を摂取した後、4日目に初回の採尿 (早朝一次尿) を実施する。尿中のダイゼイン代謝産物であるエクオール濃度を測定し、その結果により、エクオールの産生者か非産生者に分け、それぞれについて本試験を実施した。

**2) 試験計画：**本試験はオープンクロスオーバー試験として実施した。本試験では、まず1週間のWash out (大豆食品をなるべく摂取しない) 期間を設け、FOS摂取群は、2週間イソフラボンカプセルを摂取し、同時にFOSを毎日摂取する。FOS非摂取群は摂取群と同期間で、イソフラボンとショ糖 (FOSの代わり) を摂取する。その後、2週間のWash out 期間を設け、再度2週間のイソフラボン及びFOSの介入試験を行うが、前回と摂取群を交差して行う。

## 3) 本試験のスケジュール

本試験はパイロットスタディのため、1群20名程度とした。

## 4) 除外基準：

- ① エストロゲン製剤等によるホルモン補充療法を受けている者
- ② 血清ホルモン濃度が正常範囲を著しく逸脱する者
- ③ 臨床検査値、血圧、脈拍数が正常範囲を著しく逸脱する者
- ④ 乳がん等を有する、あるいは既往歴のある者
- ⑤ 肝、腎、心、肺、血液等の重篤な障害を有する、あるいは既往歴のある者
- ⑦大豆アレルギーがある者
- ⑧その他、服薬状況等も含めて、試験責任医師が試験の対象として不適格と判断した者
- ⑨試験期間中およびwash out 期間に抗生物質を服用した者
- ⑩被験物 (イソフラボンカプセルとFOSまたはショ糖) の摂取率が90%以下の者

5) 被験物：今回使用するイソフラボンカプセル（フジッコ社製）は、1カプセル中にイソフラボン 25mg（アグリコン当量）（イソフラボン抱合体 38mg）（フジフラボン P40、フジッコ社製）とデキストリンを含んでいる。イソフラボン抱合体 38mg 中にダイジン（19.2mg）、マロニルダイジン（0.1mg）、アセチルダイジン（1.1mg）、ダイゼイン（0.3mg）、ゲニスチン（4.3mg）、アセチルゲニスチン（0.3mg）、ゲニステイン（0.1mg）、グリシチンとグリシテイン（12.2mg）を含む。FOS（5g/日）（メイオリゴ：明治製菓社製）およびショ糖（5g/日）（ペットシュガー：日新製糖社製）は一般の小売店で販売されているものである。

6) 試験群の設定：被験者をエクオール産生者、非産生者に分け、それぞれを無作為法により、FOS群とショ糖群の2群に分けた。エクオール産生者は各群 25名、エクオール非産生者は各群 18名を割り付けた。なお、エクオール産生者は尿中のエクオール、ダイゼイン濃度の Log（エクオール/ダイゼイン）が -1.70 以上の者とし、-1.70 未満の者はエクオール非産生者とした。

7) 用法および摂取期間：被験物の摂取は、基本的には朝食後に1回でイソフラボンカプセル1つと、FOSまたはショ糖を摂取することとした。ただし、FOSおよびショ糖を全量摂取することが困難な者については、数回に分けて午前中に摂取することも可とした。摂取期間は2週間とした。

8) 採血および採尿：採血、早朝採尿は介入前、2、4、6週目に行った。イソフラボン分析、内分泌学的検査および一般臨床検査のための採血は上腕の静脈血を早朝空腹時に採血した。採血量は1回の検査時に約10mlとした。イソフラボン、およびクレアチニン分析のための採尿は、早朝空腹時の一次スポット尿とした。

9) 評価項目：

- ①尿中成分：イソフラボン（ダイゼイン）、およびその代謝産物、クレアチニン濃度
- ②血液成分：イソフラボン（ダイゼイン）およびその代謝産物（エクオール）濃度、エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、甲状腺ホルモン（T3およびT4）、赤血球・白血球数、ヘモグロビン値、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性、アルブミン/グロブリン（A/G）比、グルコースおよび脂質濃度

- ③アンケート調査：体調、生活習慣等
- ④身体測定：身長、体重
- ⑤食事調査：3日間の思い出し法

4. 研究成果

①エクオール産生を亢進させる食品成分の検索

ポリデキストロース、大豆のオリゴ糖であるラフィノースにより、血中および尿中のエクオール産生が亢進するとともに、ダイゼインの骨量減少抑制作用も増強されることが明らかになった（図1）。この時、盲腸内容物のpH低下とβグリコシダーゼ活性の上昇が認められた。一方、カテキンの摂取により、エクオール産生が著しく低下することが判明した。高炭水化物食の影響は認められなかった。

これらの結果から、併用群においては、難消化性糖質により腸内細菌の増殖や腸内環境の変化により、ダイゼインからエクオールへの代謝が促され、骨量減少抑制作用も亢進したものと考えられた。

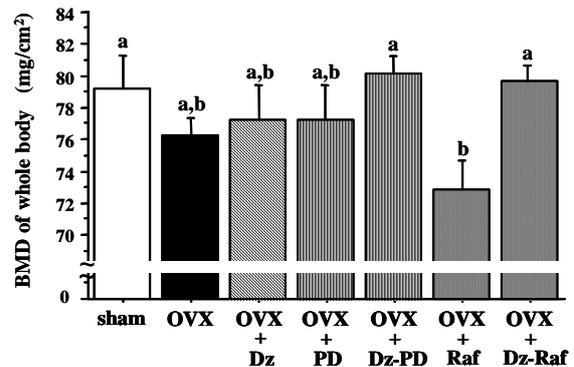


図1. ダイゼインとポリデキストロースまたはラフィノースの併用がOVXマウスの大腿骨骨密度に及ぼす影響

②閉経後女性を対象とした大豆イソフラボンとFOSのエクオール産生への影響

1) 対象者：今回は、43名（クロスオーバー試験のため86名分）から、試験期間中に抗生物質を服用した6名、被験物の摂取率が90%以下であった5名、検査日に朝食とイソフラボンカプセルを摂取した3名、合計14名を除いた72名の結果を報告する（表1）。なお、被験物の摂取率はイソフラボンカプセルが99.3%、FOSまたはショ糖は99.4%であった。Eq産生は尿中Eq濃度を時間分解蛍光免疫法により測定した。

2) 結果

身体組成

被験者の身体組成を表1に示す。対象者の平均年齢は53歳、閉経後年数は7年であった。Eq産生者、非産生者共に、BMI21-22の平均的な日本人女性の体型であった。

表 1. 被験者の身体組成

	EQ producer		
	Sucrose (n = 21)	FOS <sup>†2</sup> (n = 22)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Age (y)	53.1 (4.5)	53.1 (4.1)	NS <sup>†3</sup>
Years since menopause	7.3 (2.6)	7.3 (2.5)	NS
Height (cm)	155.5 (5.0)	155.6 (4.5)	NS
Weight (cm)	52.8 (7.5)	52.2 (7.4)	NS
BMI	21.5 (1.8)	21.7 (1.7)	NS

	EQ nonproducer		
	Sucrose (n = 13)	FOS <sup>†2</sup> (n = 16)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Age (y)	54.9 (3.5)	54.1 (4.2)	NS <sup>†3</sup>
Years since menopause	6.8 (2.3)	6.8 (2.2)	NS
Height (cm)	154.9 (4.6)	155.5 (4.8)	NS
Weight (cm)	51.8 (4.4)	51.2 (4.9)	NS
BMI	21.1 (1.9)	21.2 (2.7)	NS

栄養素摂取量

表 2 に被験者の試験開始時の栄養素摂取量を示す。イソフラボンの摂取量は、アグリコン換算で約 25m g / 日であった。

表 2. 栄養素摂取量

Daily intake	EQ producer		
	Sucrose (n = 21)	FOS <sup>†2</sup> (n = 22)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Isoflavone (mg)	41.7 (21.8)	41.5 (22.6)	NS
Dietary fiber (g)	17.5 (4.4)	17.2 (4.4)	NS
Fat (g)	55.9 (13.7)	56.5 (14.1)	NS
Carbohydrate (g)	249 (54)	244 (49)	NS
Protein (mg)	72.3 (14.5)	71.7 (15.2)	NS
Total energy (kcal)	1831 (259)	1810 (288)	NS
Calcium (mg)	644 (171)	616 (166)	NS

Daily intake	EQ nonproducer		
	Sucrose (n = 13)	FOS <sup>†2</sup> (n = 16)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Isoflavone (mg)	51.6 (52.8)	57.3 (46.9)	NS
Dietary fiber (g)	18.8 (8.2)	20.2 (8.8)	NS
Fat (g)	47.4 (12.9)	50.5 (14.4)	NS
Carbohydrate (g)	258 (54)	263 (57)	NS
Protein (mg)	72.2 (15.2)	71.7 (14.5)	NS
Total energy (kcal)	1778 (359)	1810 (359)	NS
Calcium (mg)	618 (232)	657 (239)	NS

その他の骨代謝に関連する栄養素の摂取量は全ての群間で有意な差は認められなかった。

尿中および血中 Eq 濃度

表 3 に尿中 Eq 濃度を示す。尿中 Eq 濃度は、Eq 産生者で試験開始 1-2 週間後に上昇した

が、産生者、非産生者共に FOS 摂取の影響は認められなかった。

表 3. 尿中エクオール濃度

Urine Eq (pmol/L)	EQ producer		
	Sucrose (n = 21)	FOS <sup>†2</sup> (n = 22)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Baseline	11.8 (13.8)	14.2 (16.9)	NS
After 1 weeks	35.0 (38.1)*	62.7 (132.2)	NS
After 2 weeks	55.9 (116.1)	31.1 (37.7)	NS

\*different from baseline, p<0.05

Urine Eq (pmol/L)	EQ nonproducer		
	Sucrose (n = 13)	FOS <sup>†2</sup> (n = 16)	t-test**
	AV (SD)	AV (SD)	P
Baseline	1.5 (1.2)	1.7(1.0)	NS
After 1 weeks	2.4 (1.7)	2.0 (1.0)	NS
After 2 weeks	18.0 (39.9)	11.4 (31.3)	NS

一方、尿中ダイゼイン濃度は、Eq 非産生者において、ショ糖または FOS 摂取群ともに 1-2 週間後に有意に上昇した。

血中 Eq 濃度は、尿中 Eq 濃度と同様に、Eq 産生者において試験開始 1 週間目で有意に上昇したが、FOS 摂取の影響は認められなかった。血中ダイゼイン濃度は、Eq 産生者、非産生者共に試験開始後 1 週間で上昇傾向を示した。

血中ホルモン濃度

エストラジオール、プロゲステロン、甲状腺ホルモン (T3 および T4) は、試験開始時において群間に差は認められなかった。テストステロンは、Eq 産生者が非産生者に比べて低値を示した。試験開始 2 週間目では、Eq 産生者においてテストステロン濃度が低下傾向を示した。その他の血中ホルモン濃度に有意な変化は認められず、FOS 摂取による影響も認められなかった。

考察

Eq 産生能を亢進させる食品製成分の検索

日本人におけるイソフラボンの骨量に対する効果は、必ずしも一致した結論は得られていないが、現在までに報告されている大豆イソフラボンの骨代謝に関するメタ分析では、イソフラボンが骨吸収を抑制する可能性を示唆している。特に、イソフラボンの中でもっともエストロゲン様作用が強い、エクオール (Eq) の腸内における産生能が、骨量に影響するとの報告が目まされている。Eq 産生に関わる腸内細菌には個人差があることが分かっており、これがイソフラボンの有効性に関わる個体差の原因の一つであると考えられている。

疫学研究によると、Eq 産生能と炭水化物、茶、食物繊維、魚油の摂取量との間に関連があることが報告されている。そこで本研究では、動物試験において、Eq 産生能を亢進させる食品成分を検索することとした。その結果、水溶性食物繊維および大豆オリゴ糖が、Eq 産生を亢進することが明らかになった。また、我々はこれまでに魚油が Eq 産生能を高めることを報告している。日本人は欧米人に比べて Eq 産生者の割合が多いが、これらのことから、日本型食事が Eq 産生能を高める可能性が示唆される。

フラクトオリゴ糖が Eq 産生能に及ぼす影響

今回、閉経後女性を対象に実施した、大豆イソフラボンとフラクトオリゴ糖 (FOS) の併用試験では、FOS による Eq 産生能の亢進は認められなかった。また、これは Eq 産生能の有無に依存しなかった。これらの結果から、短期間の難消化性フラクトオリゴ糖の摂取は、Eq 産生能に影響しないことが示唆された。Eq 産生能に及ぼす食品成分の影響は、in vitro と in vivo、さらには動物とヒトで異なる結果が得られていることから、今後は、さらに長期間のヒトを対象とした試験の実施が望まれる。

結論

ダイゼインの代謝産物であるエクオールは、Eq 産生能を亢進させる食品成分として、水溶性食物繊維、大豆オリゴ糖が有効であることを明らかにした。我々は、これまでに魚油の摂取がエクオールの産生を高めることを明らかにしていることから、日本型食事がエクオール産生能を高める可能性が示唆された。一方、2週間の大豆イソフラボンとフラクトオリゴ糖の併用摂取は、閉経後健康女性のエクオール産生能に対し、その産生能の有無に関わらず、影響を及ぼさないことが明らかになった。今後は、日本型食事に着目した長期間の試験が必要である。

#### 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 12 件)

1. Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Fuku N, Uehara M, Ishimi Y. Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women. *Menopause* 14: 866-874, 2007
2. Fujioka M, Sudo M, Okumura M, Wu J, Uehara M, Takeda K, Hoskawa Y, Yamada K, Ikegami S, Ishimi Y. Differential effects of isoflavones on bone formation in growing male and female mice. *Metabolism* 56: 1142-1148, 2007

3. Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo JL, Adlercreutz H, Katsumata S, Suzuki K, Takeda K, Masuyama R, Ishimi Y. Comparative activities of daidzein metabolites, equol and O-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures. *Eur J Nutr.* 47: 273-279, 2008
4. Ishimi Y, Oka J, Tabata I, Ohtomo T, Ezaki J, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M, Higuchi M, Yamada K, Wu J. Effects of soybean isoflavones on bone health and its safety in postmenopausal Japanese women. *J Clin Biochem Nutr.* 43(suppl) 48-52. 2008
5. Uehara M, Ishimi Y, Katsumata S, Suzuki K. Functional Food and Health. Chapter8 Transformation of daidzein to equol and its bioactivity. American Chemical Society, Washington, DC 2008
6. 石見佳子, 高野史, 山内淳, 卓興鋼, 梅垣敬三, 細川優, 渡邊昌「健康食品」中の大豆イソフラボンの定量と表示に関する調査研究 *栄養学雑誌* 67: 49 - 57, 2009
7. Ishimi Y Food Factors for Health Promotion, Soybean Isoflavones in Bone Health. *Forum Nutr* 61: 104-116, KARGER, Switzerland 2009

[学会発表] (計 19 件)

[図書] (計 4 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石見 佳子 (ISHIMI YOSHIKO)  
(独) 国立健康・栄養研究所・食品保健機能プログラム・プログラムリーダー  
研究者番号: 50154159

##### (2) 研究分担者

上原 万里子 (UEHARA MARIKO)  
東京農業大学・応用生物学部・栄養科学科・教授  
研究者番号: 20211071

##### (3) 連携研究者

なし