

大豆イソフラボンの骨密度および骨代謝に及ぼす影響

荒井裕介*・上原万里子・大島菊枝・高田典子・君羅 満・渡邊 昌

東京農業大学応用生物科学部

Effects of Soybean Isoflavones on Bone Mineral Density and Bone Metabolism in Human

Yusuke ARAI, Mariko UEHARA, Kikue OSHIMA, Noriko TAKADA, Mitsuru KIMIRA
and Shaw WATANABE

Faculty of Applied Bio-science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

ABSTRACT

The similar structure between soy isoflavone and estrogen and the findings that isoflavones possess weak estrogenic properties as shown by various experiments provided the initial basis for speculation that isoflavones may effect bone metabolism. In human, however, epidemiological data are insufficient to show the interaction between isoflavones and osteoporosis by the prospective cohort studies. To clarify the beneficial effects of soy isoflavones for bone health, we estimated the interaction among dietary intakes of isoflavones, plasma concentrations and urinary excretions, bone mineral density (stiffness), and bone formation and resorption biomarkers. The subjects were 41 female volunteers (40-69 years old; premenopause, 7; postmenopause, 34), who gave their written informed consent to participate to the study. Each subject completed a 3-day dietary record and the health check-up. Their plasma and 24 h-urine samples were collected for measurements of isoflavonoid concentration by the time-resolved fluoroimmunoassay and HPLC. Osteocalcin (OC) and deoxypyridinoline (DPY) were measured by enzyme linked immunosorbent assay. Stiffness value of bone was used for the assessment of subjects' bone mineral density. After multiple regression analysis to assess the relationship of bone health, dietary factor and life style, eliminating confounding factors (age, BMI, regular exercise, number of delivery and intake of carbohydrate and vitamin B₂), significant negative correlation between plasma genistein and urinary DPY was observed ($r=0.300$, $n=41$, $P<0.05$). Urinary equol, a metabolite of daidzein, showed significantly positive correlation with plasma OC ($r=0.461$, $n=22$, $P<0.05$). In conclusions, it is suggested that genistein is useful for preventing bone loss, and equol may have a beneficial role on bone formation in this cross-sectional study. Since the plasma and urinary isoflavones are useful as biomarkers for the dietary intake, it is hypothesized that high intake (not excess) of isoflavones reduces the risk of osteoporosis. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 79-86, 2000.

*〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

大豆中に多く含有する genistein, daidzein, glycitein などのイソフラボンは、生体内において様々な生理作用を示すことにより、種々の慢性疾患の予防に寄与していると考えられている¹⁻¹⁰⁾。大豆イソフラボンのヒトへの効果が期待されているものに、骨粗鬆症があげられる。それは、イソフラボンの構造がエストロゲンと類似しており、エストロゲンレセプターに結合することから、弱いエストロゲン作用を示すためである。特に genistein は、tyrosine kinase の阻害活性をもつため、骨吸収を抑制することが知られている^{11,12)}。さらに genistein には、ある一定の投与量までは、卵巣摘除 (OVX) 動物において子宮重量を増加させずに骨量減少抑制作用が認められるため、骨に特異的に作用するエストロゲン誘導体 (selective estrogen receptor modulator: SERM) となる可能性が考えられている¹³⁾。このように、大豆イソフラボンの動物および細胞レベルでの実験による骨代謝に及ぼす影響については研究が進められて来たが、疫学的には未だ明らかにはされていない。

そこで我々は、ヒトでのイソフラボン摂取量、血漿、尿中濃度と骨密度、骨代謝マーカーとの関係より骨に対するイソフラボンの効果を検討する目的で研究を行った。

方 法

調査対象者

調査は、岩手県の一地域 (南部) において平成 9 および 10 年の 9 月に調査に参加した女性 106 名のうち、骨密度測定に協力を得られた女性 41 名 (年齢: 40 ~ 69 歳, 平均 59.0 ± 8.0, 有経者 7 名, 閉経者 34 名) を集計対象者とした。また、この骨密度測定群 (n = 41) と残りの骨密度非測定群 (n = 65) において、骨密度以外の調査項目に有意差は見られなかった。なお、調査にあたっては、十分な説明を行い、調査に協力する旨の同意書を回収した。

調査および測定項目

秤量法による 3 日間の個人食物摂取状況調査、血液および尿の採取を含む身体状況調査 (身長、体重、体脂肪、血圧、歩行数)、健康作りアンケート調査を実施した。採血は早朝空腹時に行い、蓄尿は 24 時間尿比例採取器ユリンメート P (住友ベークライト株式会社製) を用いて行い、測定時まで -80℃ で保存した。

運動については、歩行数および活動記録により評価

した。調査期間中の起床から入浴または就寝まで万歩計をつけてもらい、装着していた時間および 1 日の歩行数を調査記録用紙に記入し、3 日間の合計により 1 日当たりの平均歩行数を求めた。活動記録、運動習慣の有無については、事前に調査表に記入してもらい、調査表回収の際に記入不備や不明な点については、栄養士が本人に対して聞き取り調査を行ない確認した。

イソフラボン摂取量 (mg/day) は、食物摂取状況調査の結果より、独自に作成したイソフラボン成分表を用いて算出した。

骨密度測定には、超音波法装置 (Achilles A-1000, Lunar 社製) を用い、右踵骨部を水槽中に固定して測定した stiffness 値を骨密度指標として用いた¹⁴⁾。骨吸収マーカーの尿中 deoxypyridinoline (DPY) および骨形成マーカーである血中 osteocalcin (OC) については、ともに市販キットを用い、EIA 法にて測定を行った。尿中 DPY 濃度については、尿中クレアチン量で補正した。

血漿および尿中イソフラボノイド濃度測定¹⁵⁻¹⁷⁾

血漿および尿は一定量採取し、酵素加水分解後 (37℃, overnight), イソフラボノイドアグリコンをエーテル抽出した。抽出回収率は、トリチウムラベルされた 17β-エストラジオール (グルクロン酸抱合型) を試料中に添加することより求めた。抽出後、エーテルを蒸発乾固後、血漿試料は 0.5% BSA トリス緩衝液 (pH 7.8) に、食品および尿試料はメタノールに溶解し、血漿試料の daidzein および genistein は、時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) にて、尿試料中 daidzein, genistein, equol および O-desmethylangolensin (O-DMA) は、HPLC (photodiode-array UV detector) にて測定を行った。

統計方法

データ解析には PC 版 SPSS 統計パッケージ Ver. 8.0 を用い、算出した数値は、中央値で示した。統計方法として、2 群間の比較検定には Mann-Whitney 検定、2 変量間の関連性を検討するために Pearson の単相関係数を算出した。イソフラボンと骨との関係を明確にするために、骨密度および骨代謝マーカーを従属変数、年齢、BMI、運動強度、出産回数などを独立変数として重回帰分析 (強制投入法) を行った。

結 果

調査対象者の身体状況および骨指標の変動

Table 1 に対象者全体および有経者、閉経者別の身体

状況および骨指標の中央値を示した。身長, 体重, BMI には有意な差はみられなかったが, 閉経者の stiffness 値は有経者に比し有意に低下し ($P<0.05$), 血漿 OC 濃度および尿中 DPY 濃度は増加 ($P<0.05$) または増加傾向を示した。

栄養素および食品群別摂取量 (Table 2)

対象者 41 名の栄養素摂取を第 5 次改定の栄養所要量と比較した場合, 所要量の定められている栄養素は, それらをほぼ満たしており, その他必要量が記載されているものについても充足していた。食品群別摂取量については, 平成 9 年および 10 年の全国平均と同様であるが, 豆類摂取が多かった。

イソフラボン摂取量, 血漿, 尿中イソフラボノイド濃度 (Fig. 1)

秤量法による 3 日間の個人食物摂取状況調査票によ

り求めた daidzein 1 日の摂取量の中央値は, 71.8 μmol (18.4 mg), genistein は 105.9 μmol (28.6 mg) で, 少量の glycitein を加えて, イソフラボン摂取量としては, 平均約 180 μmol (50 mg) であった。血漿中 daidzein および genistein 濃度の中央値 (平均値) は, 各々 45.3 (85.9) nmol/L, 188.4 (263.4) nmol/L となった。また, 24 時間尿中排泄量中央値 (平均値) は, daidzein で 18.2 (19.5), genistein で 9.8 (12.1) $\mu\text{mol/day}$ となり, daidzein の代謝産物である equol と O-DMA は, それぞれ 12.4 (17.8) (n=22), 1.6 (2.7) $\mu\text{mol/day}$ (n=35) となった。

骨指標を変数とした重回帰分析 (Table 3)

骨密度, 骨代謝マーカーと食事および生活習慣との関係を重回帰分析により検討すると, 年齢, BMI, 運動習慣, 出産回数, 糖質およびビタミン B₂ 摂取量との間に有意な関係が認められた ($P<0.05$)。

Table 1. Physical characterizations and bone biomarkers by pre- and postmenopausal women*

	All (n=41)	Premenopause (n=7)	Postmenopause (n=34)	Mann-Whitney U-test
Age	59	47	61	$P<0.01$
Height (cm)	150.9	149.5	151.0	
Weight (kg)	54.3	55.3	54.2	
Body mass index (BMI)	23.9	22.9	24.1	
BMD (Stiffness)	70	78	68	$P<0.05$
Plasma osteocalcin ($\mu\text{mol/day}$)	6.0	4.0	6.9	$P<0.05$
Urinary deoxypyridinoline (nM/mM creatinine)	6.2	5.8	6.3	

*Median

Table 2. Intake of various nutrients and food groups

Energy (kcal)	1917 $\pm$ 363*	Cereal (g)	427.7 $\pm$ 194.7
Protein (g)	76.9 $\pm$ 18.3	Legume (g)	92.1 $\pm$ 40.4
Fat (g)	47.7 $\pm$ 15.8	Fruit (g)	163.4 $\pm$ 103.2
Calcium (mg)	666 $\pm$ 196	Vegetable	
Phosphorus (mg)	1149 $\pm$ 267	Green yellow (g)	200.6 $\pm$ 105.5
Vitamin A (IU)	2652 $\pm$ 1065	Others (g)	235.2 $\pm$ 98.0
Vitamin B ₁ (mg)	1.08 $\pm$ 0.29	Meat (g)	96.2 $\pm$ 44.9
Vitamin B ₂ (mg)	1.43 $\pm$ 0.40	Fish (g)	36.2 $\pm$ 35.0
Vitamin C (mg)	125 $\pm$ 36	Milk and dairy products	186.2 $\pm$ 122.2
Vitamin D (mg)	300 $\pm$ 265		
Vitamin K (μg)	444 $\pm$ 283		

*Values are means $\pm$ SD (n=41).

イソフラボンと骨形成および骨吸収マーカーとの関係
交絡因子（年齢，BMI，運動習慣，出産回数，糖質，
ビタミン B₂）の影響を取り除いた後，骨密度および骨
代謝マーカーとイソフラボンとの関係を検討したとこ

ろ，血漿中 genistein 濃度と尿中 DPY 濃度とに有意な
負の相関が認められた ($r = -0.300$, $P < 0.05$) (Fig. 2).
また daidzein の代謝産物である equol 排泄者 (n=22)
において，尿中 equol 排泄量と血漿 OC 濃度に有意な正

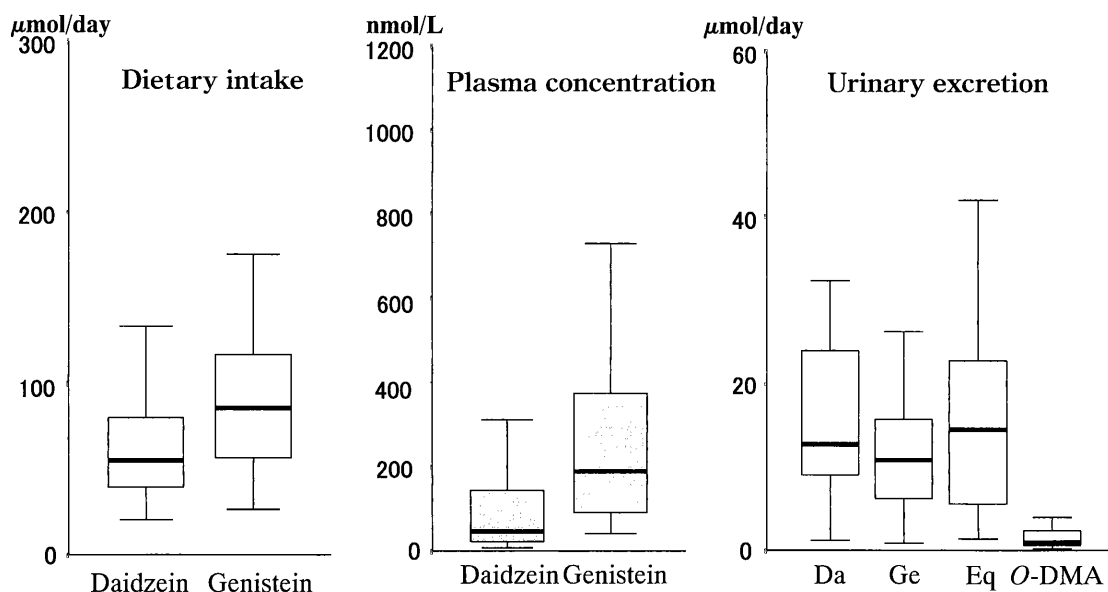


Fig. 1. Dietary intake, plasma concentration and urinary excretion of isoflavones.

Table 3. Factors influencing bone metabolism

Dependent variable	Stiffness	Urinary DPY	Plasma OC
Standard partial regression coefficient			
Independent variable			
Age	-0.263*	-0.004	0.530*
BMI	0.459	0.305	-0.187
Exercise	0.495**	-0.039	-0.088
Delivery frequency	0.031	-0.314	-0.835*
Protein	0.018	-0.681	-0.391
Animal protein	-0.185	0.237	0.185
Fat	-0.019	0.104	-0.075
Carbohydrate	-0.274	-0.224	0.693**
Calcium	0.145	0.168	-0.532
VB ₂	0.886**	-0.511	-0.246
VC	-0.116	0.008	-0.268
VD	-0.216	-0.185	-0.146
Coefficient of determination (R ²)	0.830	0.520	0.790

DPY, deoxypyridinoline; OC, osteocalcin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

の相関が認められた ($r=0.461$, $P<0.01$) (Fig. 3).

考 察

閉経後の骨粗鬆症の発症には、卵巣機能低下によるエストロゲンの分泌不全が明らかに関与しており、骨粗鬆症患者にエストロゲン補充療法を施すと、骨量減少および骨折の発生頻度が低下しうることが、臨床的に確かめられている。しかしエストロゲン単独では子宮体がんの発生頻度が増加し、プロゲステロン製剤を併用するなどの処置が必要となるが、プロゲステロンもまた、乳がんの発生頻度をわずかながらも増加させる可能性がある。日本人が日常的に摂取している大豆イソフラボンは、生体内に取りこまれる際に弱いエストロゲン作用を示し、骨量減少の予防効果があると同時に^{8,12,13,18}、女性ホルモン依存性のがんをも予防すると考えられているが¹⁻⁷、その多くは動物実験または細胞レベルでの結果に支持されたものである。ヒトでの研究は、閉経後女性に対するイソフラボンもしくは大豆たん白質摂取の介入試験によるものが多く¹⁹⁻²²、コホート研究での日常のイソフラボン摂取量と骨粗鬆症との関係を検討したものは少ない。そこで我々は、豆類摂取量が高い東北地方のある一地域に注目し、そこのイソフラボン摂取量、血漿および尿中濃度と骨密度および骨代謝マーカーとの関係より骨に対するイソ

フラボンの効果を明らかにすることを目的に研究を行った。

まず、対象者を有経者と閉経者に区分し、骨密度および骨代謝マーカーを比較したところ、閉経者での有意な stiffness 値の減少および血漿 OC および尿中 DPY 濃度の増加が認められ、この地域でも閉経者では、高回転型の骨代謝状態であることが示された。しかし、有経者が 41 名中 7 名と少数であることから、摂取栄養素は対象者全員で集計したところ、すべてほぼ充足状態にあり、特に骨代謝に関わるカルシウム (Ca) については、全国平均 (579 mg/day) および所要量 (600 mg/day) を上回る 666 mg/day であった。またビタミン D (VD) についても同様に所要量を上回っている。しかし、今回の結果では、Ca および VD 摂取と骨密度との間に関連性は見られなかった。

血漿中のイソフラボン量は、摂取イソフラボン量を反映した形となり、genistein が daidzein より高値を示した。尿中では、逆に daidzein および equol が genistein より高値を示す結果となったが、これはさきの研究と同様な傾向であった²³。equol は、daidzein および genistein よりも強いエストロゲン活性を有していることから、注目されている daidzein の代謝産物であるが、各個人の腸内細菌叢によりその産生能が異なる^{23,24}。今回は 41 名のうち、22 名が equol 排泄者であった。

重回帰分析の結果、骨密度および骨代謝マーカーに

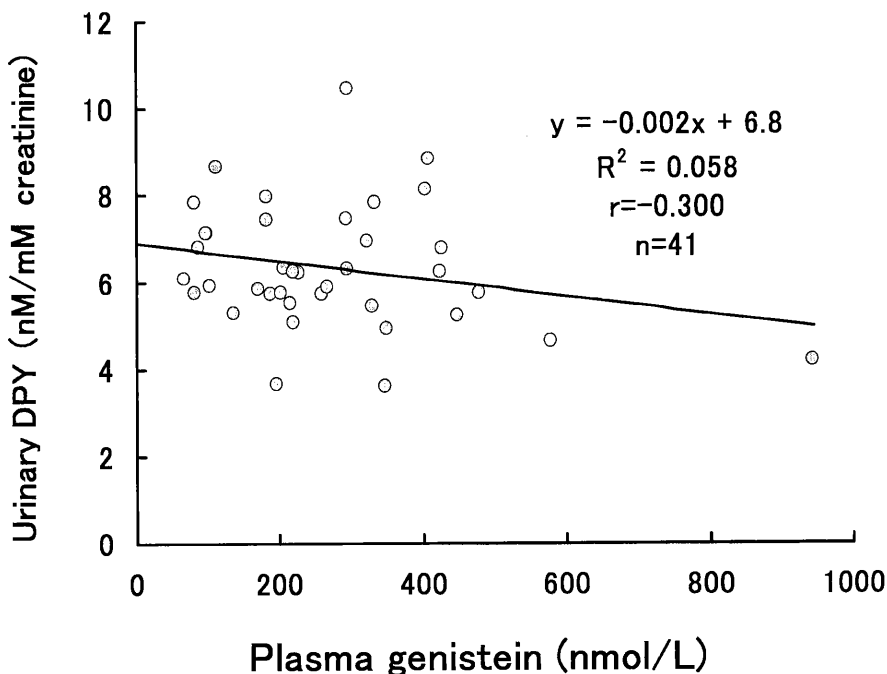


Fig. 2. Correlation between plasma genistein and urinary deoxypyridinoline (DPY).

は、年齢、BMI、運動強度、出産回数、VB₂、糖質が影響していた。これら交絡変数で補正をし、イソフラボンと骨との関係について検討したところ、DPYと血中 genistein 濃度に負の相関関係が認められた。これは、genistein の骨吸収および骨量減少抑制に関する様々な報告に裏付けられる^{12, 13, 25-27)}。尿中 equol 排泄者では、血漿 OC と尿中 equol 排泄量に有意な正の相関を示した。骨形成マーカーである OC の上昇は、閉経期骨粗鬆症でも起こりうるため、同時に骨吸収マーカーの減少の確認、または他の骨代謝マーカーおよび関連ホルモン等

の変動を検討する必要がある。しかし、equol 排泄者は、血中 genistein 濃度も高値を示す可能性があることから、尿中 DPY 濃度を低下させるかもしれない。

以上より、genistein は疫学的見地からも骨吸収を抑制することが示唆され、また equol 排泄者は、骨に対して有用な効果が期待された。イソフラボン摂取量と血漿中イソフラボン濃度および尿中排泄量との間に有意な正の相関を示すことから²⁸⁾、食事よりイソフラボンを多く摂取することは、今後の骨粗鬆症の予防に貢献すると推察された。

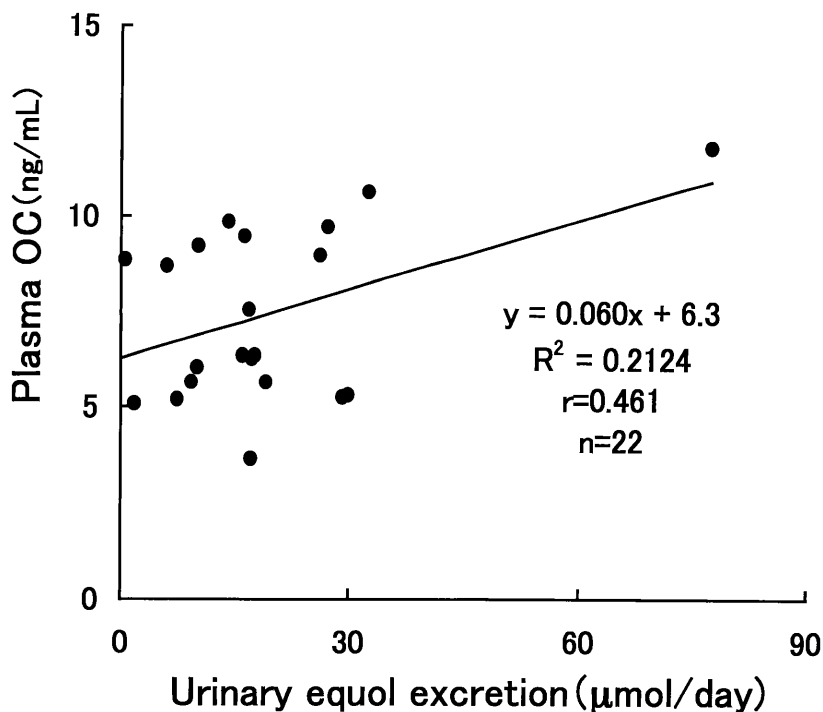


Fig. 3. Correlation between urinary equol excretion and plasma osteocalcin (OC).

文 献

- 1) Adlercreutz H, Fotsis T, Heikkinen R, Dwyer JT, Woods M, Goldin BR and Gorbach SL (1982): Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian women and in women with breast cancer. *Lancet*, **2**, 1295-1299.
- 2) Adlercreutz H (1990): Western diet and Western disease: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest*, **50** (Suppl 201), 3-23.
- 3) Adlercreutz H, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Mäkelä TH and Wähälä KT (1995): Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, **125**, 757S-770S.
- 4) Davies MJ, Bowey EA, Adlercreutz H, Rowland IR and Rumsby PC (1999): Effects of soy or rye supplementation of high-fat diets on colon tumour development in azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, **20**, 927-931.

- 5) Adlercreutz H and Mazur W (1997): Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med*, **29**, 95-120.
- 6) Landstrom M, Zhang JX, Hallmans G, Aman P, Bergh A, Damber JE, Mazur W, Wahala K and Adlercreutz H (1998): Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *Prostate*, **36**, 151-161.
- 7) Tikkanen MJ and Adlercreutz H (2000): Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol*, **60**, 1-5.
- 8) Anderson JJ, Ambrose WW and Garner SC (1995): Orally dosed genistein from soy and prevention of cancellous bone loss in two ovariectomized rat models. *J Nutr*, **125**, 799S.
- 9) Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wahala K and Rechkemmer G (2000): Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis*, **21**, 1247-1252.
- 10) Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB and Prince RL (1997): Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J Nutr*, **127**, 1795-1799.
- 11) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.
- 12) Blair HC, Jordan SE, Peterson TG and Barnes S (1996): Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, **61**, 629-637.
- 13) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S (1999): Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.
- 14) Jaworski M, Lebedowski M, Lorenc RS and Trempe J (1995): Ultrasound bone measurement in pediatric subjects. *Calcif Tissue Int*, **56**, 368-371.
- 15) Wang GJ, Lapcik O, Hampl R, Uehara M, Al-Maharik N, Stumpf K, Mikola H, Wahala K and Adlercreutz H (2000): Time-resolved fluoroimmunoassay of plasma daidzein and genistein. *Steroids*, **65**, 339-348.
- 16) Mazur W, Fotsis T, Wahala K, Ojala S, Salakka A and Adlercreutz H (1996): Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal Biochem*, **233**, 169-180.
- 17) Adlercreutz H, Fotsis T, Kurzer MS, Wahala K, Makela T and Hase T (1995): Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Anal Biochem*, **225**, 101-108.
- 18) Toda T, Uesugi T, Hirai K, Nukaya H, Tsuji K and Ishida H (1999): New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, **22**, 1193-1201.
- 19) Scheiber MD and Rebar RW (1999): Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? *Menopause*, **6**, 233-241.
- 20) Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, Hughes CL, Setchell KD, Weinberg CR, Haney AF, Wilcox AJ and Mclachlan JA (1995): Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 1685-1690.
- 21) Agnusdei D, Gennari C and Bufalino L (1995): Prevention of early postmenopausal bone loss using low doses of conjugated estrogens and the non-hormonal, bone-active drug ipriflavone. *Osteoporos Int*, **5**, 462-466.
- 22) Messina MJ (1999): Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, **70**, 439S-450S.
- 23) Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K and Adlercreutz H (1998): Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*, **128**, 1710-1715.
- 24) Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H and Bowey EA (2000): Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence

- of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer*, **36**, 27-32.
- 25) Gao YH and Yamaguchi M (1999): Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol*, **58**, 767-772.
- 26) Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D and Malluche HH (1998): The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, **8**, 274-281.
- 27) Yamaguchi M and Gao YH (1998): Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol*, **55**, 71-76.
- 28) Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H and Watanabe S (2000): Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol*, **10**, 127-135.