

大豆イソフラボンの骨密度および骨代謝に及ぼす影響：
生体内イソフラボン濃度および
性ホルモン結合グロブリンと骨指標との相関

荒井裕介*・上原万里子・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
Women : Correlation among Isoflavone Concentrations in Biological Fluids,
Sex-hormone Binding Globulin and Bone Biomarkers

Yusuke ARAI, Mariko UEHARA, Mitsuru KIMIRA and Shaw WATANABE

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

ABSTRACT

In the previous study, we found that a significant negative correlation between plasma genistein concentration and urinary deoxypyridinoline (D-Pyr), a marker of bone resorption, and a positive correlation between urinary equol excretion and plasma osteocalcin (OC) were present in women (n=41) living in an area of Tohoku, Japan. In the present study, to assess the correlation among isoflavone concentrations in biological fluids, sex-hormone binding globulin (SHBG) and bone biomarkers, we analyzed plasma and urinary isoflavonoid concentrations, bone mineral density (BMD), plasma OC and SHBG, and urinary D-Pyr levels. The subjects were 93 female volunteers (33-84 years old, premenopause 19, postmenopause 74), who gave their written informed consent to participate to the study during 1997-2000. Each subject completed a 3-day dietary record and the health check-up. Their plasma and 24 h-urine samples were collected for measurement of isoflavonoid concentrations by the time-resolved fluoroimmunoassay and HPLC. OC and D-Pyr were measured by the enzyme linked immunosorbent assay. Stiffness value of bone was used for the assessment of subjects' BMD. After multiple regression analysis to assess the relationship of bone health, dietary factor and life style, eliminating confounding factors (age, BMI, intake of carbohydrate, calcium, phosphorus, magnesium, vitamin C and vitamin K), a significant positive correlation between plasma daidzein and BMD was observed in equol excreters ($r=0.290$, $n=50$, $P<0.05$). Additionally, we measured plasma 17β -estradiol and SHBG concentrations in pre- (n=15) and postmenopausal (n=44) women from the study

* 〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

2000. In premenopausal women, there was a significant positive correlation between plasma genistein concentration and BMD ($r=0.724$, $P<0.001$), and between plasma daidzein concentration and SHBG concentration ($r=0.309$, $P<0.05$), respectively. *Soy Protein Research, Japan* 4, 135-141, 2001.

Key words : genistein, daidzein, equol, sex-hormone binding globulin, bone mineral density

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エストロゲン様作用を示し、骨量減少予防効果があると同時に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。しかし、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¹⁻¹²⁾。ヒトでの研究は閉経後女性の骨粗鬆症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、コホート研究等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報告は少ない。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、そこで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ヒトでの効果を明らかにすることを目的として、平成9年からのデータをもとに研究を行って来た。これらより、genisteinは骨吸収を抑制することが示唆され、またequolを排泄する者は、骨に対して有用な効果が期待された¹³⁾。しかし、この結果は、あくまでも41名を対象としたもので、母集団が小さかった。そこで今回は対象者を増やし、血中 β -estradiol (E_2)およびイソフラボン摂取によりその血中濃度が上昇するといわれる性ホルモン結合グロブリン (SHBG)²⁾も測定し、血中ホルモン濃度との関係もあわせて検討を行った。

方 法

調査対象者

岩手県の一地域(南部)において平成9年～12年の8～9月に調査に参加し、骨密度測定もしくは血液および尿の採取を含む身体調査等に協力が得られた女性93名(年齢33-84歳、内閉経者74名)を対象者とした。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

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ノメート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°C 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い確認した。

骨密度(BMD)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 (D-Pyr)および骨形成マーカーである血中osteocalcin (OC)、また血中 E_2 、SHBGについては、市販キットを用い、ELISA法にて測定を行った。尿中D-Pyr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 genistein, daidzein および equol 濃度測定¹⁵⁻¹⁷⁾

血漿および尿は一定量を採取し、酵素加水分解後(37°C , 一晚)、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 -estradiol(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(pH7.8)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は、HPLC(photodiode-array UV detector付)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.10.0を用い、算出した数値は、中央値もしくは平均値で示した。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、交絡因子となりうる年齢、BMI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

Table 1 に対象者の身体状況および骨指標の平均値および標準偏差値を示した。有経者の平均年齢が 45 歳と閉経者に近いことから、全体としては閉経の有無による違いは検討しなかった。

Table 1. Physical characterizations and bone bio-marker

Age	58 ± 9*
Height (cm)	151.2 ± 5.5
Weight (kg)	55.5 ± 7.9
Body mass index (BMI)	24.3 ± 3.3
BMD (Stiffness, g/cm ²)	77.1 ± 14.4
Plasma osteocalcin (ng/mL)	4.6 ± 3.5
Urinary deoxypyridinoline (nM/mM creatinine)	8.9 ± 3.9

*Means ± SD

血漿および尿中 genistein, daidzein および equol 濃度

血漿中 genistein, daidzein 濃度および尿中（24 時間尿）の genistein, daidzein, equol 濃度の中央値および標準偏差を Table 2 に示した。これらは昨年とほぼ同様の値であり、equol 排泄者は全体の約半数であった。

骨指標を従属変数とした重回帰分析

BMD, 骨代謝マーカーと食事および生活習慣との関係検討するため、その交絡因子として BMD では、年齢、BMI、ビタミン C、ビタミン K 摂取量との間に有意な関係が認められた ($P < 0.05$) (Table 3)。骨形成マーカーの OC では、糖質、カルシウム、リン、マグネシウム、ビタミン C 摂取量との間に有意な関係が認められた ($P < 0.05$)。今回は骨吸収マーカーの D-Pyr

Table 2. Genistein, daidzein and equol concentrations in plasma and urine

Plasma (nmol/L)		Urine (μmol/24 h)	
Genistein (n=93)	294.3 ± 263.1*	Genistein (n=82)	13.1 ± 10.7
Daidzein (n=93)	81.9 ± 80.5	Daidzein (n=81)	29.9 ± 29.1
*Median ± SD		Equol (n=50)	13.2 ± 10.7

Table 3. Factors influencing bone metabolism

Dependent variable	Stiffness	Plasma OC	Urinary D-Pyr
Standard partial regression coefficient			
Independent variable			
Age	-0.461**	0.165	-0.099
BMI	0.221*	-0.063	0.185
Body fat	0.211	-0.052	0.104
Exercise	0.082	-0.089	-0.063
Protein	0.116	-0.146	0.114
Animal protein	0.028	-0.146	0.122
Fat	0.175	-0.159	0.116
Animal fat	0.074	-0.182	0.076
Carbohydrate	0.139	0.378**	-0.021
Calcium	0.132	-0.272**	0.054
Phosphorus	0.158	-0.260**	0.105
Magnesium	0.243	-0.314**	0.172
Vitamin C	0.260*	-0.210*	0.193
Vitamin D	-0.093	-0.154	0.064
Vitamin K	0.300**	-0.166	0.038
Plasma total cholesterol	0.007	-0.206	0.150
Coefficient of determination (R ²)	0.422	0.510	0.250

OC, osteocalcin; D-Pyr, deoxypyridinoline. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

と有意な相関を示す交絡因子は認められなかった。
骨密度、骨形成、骨吸収マーカーと血漿・尿中イソフラボンおよび代謝産物濃度との関係

BMD および骨代謝マーカーと血漿および尿中 genistein, daidzein, equol 濃度との偏相関を算出したところ、BMD と血漿または尿中 daidzein 濃度との間に有意な正の相関が認められた (血漿 $r=0.371$, 尿 $r=0.361$, $P<0.03$)。また骨形成マーカーの OC 濃度と尿中 daidzein 濃度との間には有意な負の相関が認められた ($r=-0.371$, $P<0.03$)。それぞれの交絡因子の影響を取り除いた後、その残差同士で相関をとったところ、全体としては、いずれの項目でも有意な差はみられなかったが、尿中 equol 排泄者については BMD と血漿 daidzein 濃度との間に有意な正の相関が認められた ($P<0.05$) (Fig. 1)。

閉経の有無による血漿イソフラボンと骨密度およびホルモン濃度との関係

平成 12 年度の調査対象者のみについて有経者および閉経者に分け、 E_2 および SHBG 濃度測定を行い、骨密度との関係も検討した。閉経後では閉経前に比し、BMD で有意な低下を示した ($P<0.05$) (Table 4)。

E_2 および SHBG 濃度も閉経後の方が低値傾向を示した。BMD と血漿イソフラボン、もしくはホルモン濃度との単相関係数を算出したところ、全体では BMD と血漿 daidzein との間に有意な正の相関 ($r=0.309$, $P<0.001$) がみられ、有経者では、BMD と血漿 genistein ($r=0.724$, $P<0.01$)、血漿 daidzein と SHBG ($r=0.309$, $P<0.05$) との間で正の相関が認められた。

Table 4. Changes of genistein, daidzein, E_2 and SHBG concentrations in plasma and BMD between pre- and post-menopausal women

Participants from August, 2000	Premenopausal (33-51 y, n=15)	Postmenopausal (49-84 y, n=44)
Plasma (nmol/L)		
Genistein	281.3 $\pm$ 70.7	334.1 $\pm$ 47.9
Daidzein	77.8 $\pm$ 10.7	82.4 $\pm$ 12.4
E_2	0.60 $\pm$ 0.15	0.08 $\pm$ 0.01
SHBG	71.5 $\pm$ 9.7	61.2 $\pm$ 4.9
BMD (g/cm ²)	94.7 $\pm$ 17.8	78.3 $\pm$ 17.8*

Values are means $\pm$ SEM.

*Significantly different from premenopausal, $P<0.05$.

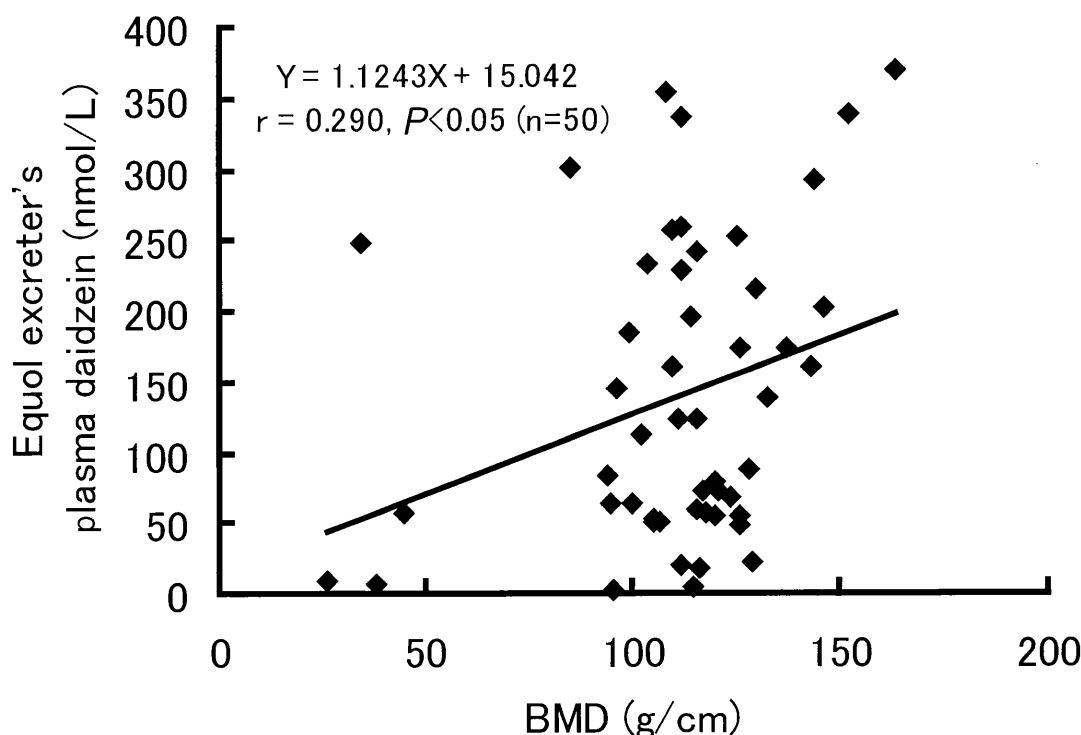


Fig. 1. Correlation between BMD and plasma daidzein concentrations in equol excreters.

考 察

閉経後のエストロゲン欠乏による骨粗鬆症では、エストロゲン補充療法により骨量減少および骨折の発生頻度が低下することが、臨床的に確かめられている。しかしエストロゲンやプロゲステロンなどのホルモン療法は、乳がんの発生頻度を増加させるなど、生殖器への副作用が懸念されているため、普及率はきわめて低い。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、骨量減少に対する予防効果が期待されている^{8,12,18)}。さらに、その効果は骨に対して選択的に発揮されることが望ましく、その担い手のひとつとして genistein が挙げられ、動物実験により、一定の投与量までは子宮体重量を変化させることなく骨量を増加させることが確認されている¹⁹⁾。

ヒトでの骨粗鬆症に対する研究は、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²⁰⁻²³⁾、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、そこで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て来た。平成 11 年度の結果では、生体試料中イソフラボン濃度は摂取イソフラボン量を反映し、尿中 D-Pyr 濃度と血漿中 genistein 濃度には負の相関、尿中 equol 排泄者では、血漿 OC と尿中 equol 排泄量には有意な正の相関が示された¹³⁾。従って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有用である可能性を示唆したが、調査対象者が 41 名と少なかったことから、平成 12 年度の本研究では 93 名まで対象者を増やし、同様に検討を行った。

今回も骨指標に対する交絡因子の影響を考慮し、重回帰分析を行ったところ、昨年度の年齢、BMI 等に加え、今回は骨代謝に関わるミネラルまたはビタミンとして知られるカルシウム、リン、マグネシウムおよびビタミン C やビタミン K が BMD や OC と有意な関係を示した。偏相関のみの検討では、BMD と血漿および尿中 daidzein とに有意な関係がみられたが、完全に

交絡因子の影響を取り除いた残差間の相関では、equol 排泄者のみで BMD と血漿 daidzein 濃度との間に正の相関が認められた。equol は、daidzein 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 の代謝産物であり、各個人の腸内細菌叢によりその産生能が異なる^{24,25)}。今回は、調査対象者を前回の倍以上に増やしたところ、equol 排泄者も増加し、50 名となった（前回は 22 名）。equol 排泄者で血漿 daidzein 濃度が高値を示すことは妥当であり、daidzein は genistein よりもむしろ効果的に骨量増加に寄与するとした報告もあることから²⁶⁾、その裏付けともなる結果であった。昨年度は、genistein と骨吸収マーカーの D-Pyr とに負の相関がみられたことで、genistein は疫学的見地からも骨吸収を抑制することを示唆したが、本年度では同じ結果は得られなかった。また、骨形成マーカーの OC と尿中 genistein との偏相関係数を算出したところ、負の相関関係がみられた。閉経後 70 歳ぐらまでは、骨形成・骨吸収マーカーとも高値を示す高回転型の骨粗鬆症となることが知られている。従ってこの場合、尿中 genistein 排泄量が骨形成マーカーと負の相関を示すことは、一概にマイナスの要因とは言い切れない。

以上のように前回と今回では、母集団の違いにより結果が異なる部分がみられた。できるだけ多くの調査対象者による大規模なコホート研究を行うことが、この問題解決の糸口になることは言うまでもない。しかし、今回は骨代謝マーカーではなく、骨密度そのものと生体試料中イソフラボン濃度との間に相関が得られたことは、昨年度とは様相が異なるものの、やはりイソフラボンの骨粗鬆症に対する予防効果を支持する研究結果であったと考える。

また、平成 12 年度の調査対象者のみにについて、閉経前と閉経後に分けて血漿 E₂ および SHBG 濃度の測定を行った。閉経者では E₂ 濃度の低下傾向がみられ、有経者では血漿 SHBG と daidzein 濃度とに正の相関が認められた。イソフラボンは SHBG の合成を促進し、エストロゲンの作用を抑制することが報告されており、性ホルモン依存性の発がんを抑制する可能性が示唆されている²⁾。本結果もこれらの報告を支持するものであった。

要 約

岩手県の一地域（南部）において平成9年～12年の間に調査に参加し、骨密度測定もしくは血液および尿の採取を含む身体調査等に協力が得られた女性93名（年齢33～84歳、内閉経者74名）を対象者とし、大豆イソフラボンの骨密度および骨代謝に及ぼす影響を検討した。重回帰分析の結果、年齢、BMI、カルシウム、リン、マグネシウム、ビタミンC、ビタミンK等が骨密度および骨代謝マーカーの交絡因子となり、その影響を除去した残差間では、daidzeinの代謝産物である equol 排泄者（50名）で骨密度と血漿 daidzein 濃度とに有意な正の相関が認められた。また、平成12年度調査対象者のみを閉経前（15名）と閉経後（44名）に分け、骨密度と血漿イソフラボン濃度、E₂、SHBG との単相関係数を求めたところ、有経者で骨密度と血漿 genistein 濃度、SHBG と血漿 daidzein 濃度とに有意な正の相関が認められた。またこの集団全体（59名）については骨密度と血漿 daidzein 濃度との間にも有意な正の相関関係がみられた。

文 献

- 1) Adlercreutz H, Fotsis T, Heikkinen R, Dwyer JT, Woods M, Goldin B R 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): Phytoestrogen and Western disease. *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 dose 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) 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.
- 12) 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.
- 13) 荒井裕介, 上原万里子, 大島菊枝, 高田典子, 君羅 満, 渡邊 昌 (2000): 大豆イソフラボンの骨密度および骨代謝に及ぼす影響. 大豆たん白質研究, **3**, 79-86.

- 14) Jaworski M, Lebiedowski 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) 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.
- 17) 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.
- 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) Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A and Ikegami S(2000): Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**, 697-701.
- 20) Scheiber MD and Rebar RW(1999): Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? *Menopause*, **6**, 233-241.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Messina MJ(1999): Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, **70**, 439S-450S.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P and Barlet JP(2000): Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*, **130**, 1675-1681.