

# 大豆イソフラボン摂取と乾燥血液スポット濃度の地域的な違いと健康関係について

メリッサ・メルビー<sup>\*1</sup>・渡邊 昌<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学地球資源環境研究センター <sup>2</sup>国立健康・栄養研究所

## Health Effects and Regional Difference in Soy Isoflavone Intake and Dried Blood Spot Concentration

Melissa K. Melby and Shaw Watanabe

<sup>1</sup>Tokyo University of Agriculture

<sup>2</sup>National Institute of Health and Nutrition

### ABSTRACT

Japanese women living in Japan have the longest life expectancy in the world, and relatively low rates of reproductive cancers compared to women in other developed countries. However, Japanese women living in the US often show similar rates of cancer and other diseases to those of other Americans, suggesting that environmental lifestyle factors such as diet influence these health outcomes. Soy, and particularly isoflavones, is hypothesized to play a role in the better health of Japanese women following a traditional Japanese diet. Thus, isoflavone (IF) intake and exposure were examined in this study to assess whether women with higher IF intake and/or exposure have lower prevalence of health problems. Furthermore, we hypothesized that equol producers would have lower prevalence of health problems. Japanese women of 138, aged 45-55 years, living in Kyoto and Fukushima prefectures participated in a 6 month protocol involving collection of health history, anthropometric data, weekly finger-prick dried blood spot samples and dietary records for the 24 hour period preceding blood collection. A novel HPLC-CEAD method was developed for use with dried blood spots (DBS). Participants were generally healthy, with an average BMI of 23-24. More than half were perimenopausal, and slightly greater than one quarter were premenopausal on entrance to the study. Intake of tofu was higher in Kyoto, but intakes of natto, miso and edamame were higher in Fukushima. Isoflavone intake estimated from our FFF database showed similar results. Genistein concentrations showed no significant differences, but daidzein and equol were significantly higher in Fukushima, where

\*〒156-8502 世田谷区桜丘1-1-1

approximately 2/3 of individuals were identified as equol-producers compared to only 1/3 in Kyoto. Correlations between dietary intake IF estimates and DBS IF concentrations were high. Assignment of equol producer status is complicated by pharmacokinetics of IF metabolism and equol production. Logistic regression identified odds ratios of less than 1 for genistein and allergies, skin allergies and ulcers and for equol and menopausal syndrome. Although logistic regression does not permit assignment of causation, these results suggest that women with higher IF blood concentrations may have lower risk for several health problems. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 133-137, 2005.

Key words: soy isoflavone, HPLC-CEAD, dietary intake, women's health, equol pharmacokinetics

日本人女性は世界で一番長い平均寿命があり、乳がんや卵巣がんの罹患率もアメリカと比べるとまだ低い。しかしアメリカに住んでいる日本人は他のアメリカ人と同じように罹患率が高くなるので、遺伝的素因ではなくて、環境が影響していると思われる。日本人はよく大豆を食べているので、大豆をよく食べている人又は大豆イソフラボンの血中濃度が高い女性は大豆をあまり食べていない女性又はイソフラボンの濃度が低い女性より病的症状は少なくて軽いという仮説で研究を行った。二番目の仮説はダイゼインというイソフラボンからエクオールという代謝物を多く作れる人は作れない人より健康状態は良いというものである。イソフラボンの生理的、薬理的影響はおおくの疫学研究で示されている。しかし多くのサンプルを手早く安価に、十分な感度をもった分析方法の開発が必要とされている。とくに同一個体での反復測定が必要である。これらの仮説を試験するために新機軸の方法を開発した。

## 方 法

京都と福島において45歳から55歳の女性138人から6ヶ月間、毎週自己採血をしてもらい、食事摂取記録を記入した。健康状態のアンケートにも答えて、身長や体重も測定した。京都と福島を選んだ理由は近畿地域は大豆食品摂取量が日本全国の平均と比べると12.3%低く、東北地域は全国平均より22.4%高かった(JMoH) 1996) ためである。

FFFデータベース (<http://www.life-science.jp/FFF/seibunfff.jsp>) を用いて計算したところ、食事記録からイソフラボン摂取量を推定した。

今までの疫学と薬理動態的な大豆イソフラボン研究をするためには採血をする又は尿のサンプルを集める

ことが必要です。そういうサンプルは冷蔵又は冷凍保存が必要である。私たちは乾燥スポット血液サンプルの方法を開発した。指からの採血方法と乾燥血液スポット紙をFig. 1に示す。乾燥血液スポット・サンプルの量は普通の血液サンプルと比べると少ないである。一つのスポットは25 $\mu$ Lしか取れないので特別な測定方法が必要であった。紙乾燥血液サンプル (DBS) から緩衝液でイソフラボンを抽出し、高感度なHPLC-CEADで測定する系を開発した (Fig. 2) (Melby, Watanabe et al. Submitted)。

8週目、16週目、と食事摂取記録から一番高いダイゼインタ食摂取量の次の日の朝の乾燥血液スポットサンプルのイソフラボン濃度を測定した。これらイソフラボンの値は食事摂取からの値と比較し、また対象者の健康状態と比較検討した。

## 結果と考察

参加者はよい健康状態であった。BMIの平均は京都が23.1福島が23.7である。農大の研究であつめた岩手県食事調査と血液サンプルも参考にした。京都・福島



Fig. 1. Finger-prick blood spot method. (Left: Lancet used to prick finger; Right: Dried blood spots on filter paper)

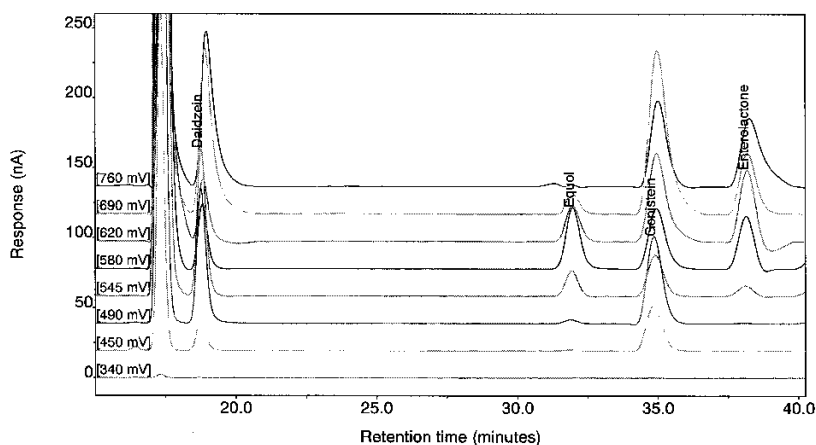


Fig. 2. Standard HPLC-CEAD chromatogram.

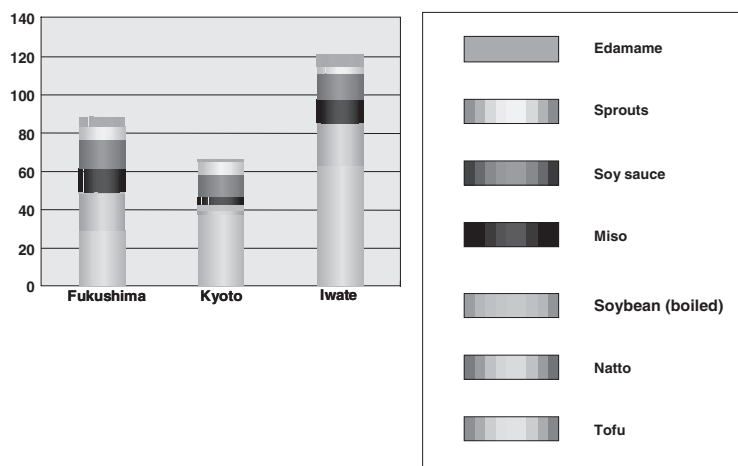


Fig. 3. Soy product intake estimated from dietary records collected in 3 regions of Japan.

の対象女性の半分は更年期前後、4分の1は更年期前であった。岩手県の参加者は男性も含み、年齢は60歳くらいとやや高かった。

大豆食品摂取量はFig. 3に示す。京都が一番少ないが、豆腐摂取は多かった。福島人は京都人より納豆や味噌をよく食べているが、岩手県ではもっと食べている。京都での豆腐摂取は多いが、納豆や味噌などの発酵大豆食品は福島の方が多かった。東北の中で岩手県の大豆食品摂取量は福島県より岩手県のほうが多かった。

食品から計算したイソフラボン摂取量は似たパターンを示した。京都人は福島県人よりイソフラボン摂取が少なかった。しかし、食べ物から計算するとき色々な不確かさがある。正しく記入したかどうかかわからず、食べ物によるイソフラボン量も違うから、できれば血

液濃度も計ったほうが良い。血液でエクオールというダイゼインのMetaboliteも測れる。最近エクオールはイソフラボンの効能の多くに関係すると考えられている。エクオールは腸内細菌がダイゼインから転換するので、大豆摂取の計算のみではエクオールの状態は分からない。それゆえ生体指標が必要である。本研究ではエクオール産生能を持つ者はダイゼイン濃度と同じレベルをもつ者とした。

大豆摂取記録から計算したイソフラボン摂取量の方法と乾燥血液スポット・サンプルから測ったイソフラボン濃度の相関関係は有意に強かった。ダイゼインとゲニステインの相関関係は0.4から0.5で、同じ方法の中のダイゼインとゲニステインの相互関係は0.8から0.98であった ( $P < 0.000001$ )。乾燥血液スポットのエクオール濃度とダイゼインとゲニステインの摂取量の

相関関係は0.5以上であった。この二つの方法は違いがあるが、似ている結果が出るはずである。しかし、福島県のダイゼインとエクオール濃度は優位に高かった。ゲニステイン濃度には違いがなかった。

エクオール生成に関して濃度が10 ng/mL以上だったらエクオールProducerと分類した。エクオールもダイゼインも10 ng/mL以内だったらエクオール産生の状態が決められない。エクオールを作るためにダイゼインが必要なので、基質が足りなかったら、もちろんエクオールが作れない。エクオールは10 ng/mL以内で、ダイゼインが10 ng/mL以上だったら、エクオールNonproducerと分類した。

京都府で約3分の1の参加者はエクオールProducersで、福島県では約3分の2であった。一人当たり三つのサンプル測ったが、6割の人のサンプルが首尾一貫したが、2割の人のサンプルは3分の2はエクオールProducers、3分の1はエクオール

Nonproducer又は分からない状態であった。エクオールProducing能力が変わるかどうか、または能力規則は足りないか、まだはっきり分からないが、薬理動態の実験から摂取とサンプル採取のタイミングがたいへん大事であると分かってきた (Fig. 4)。イソフラボンTabletを飲んでからエクオール濃度は16時間後に高くなったが14時間後と24時間後は10 ng/mL以下の濃度であった。大豆を食べてからの時間によるエクオールProducer状態が変わりそうである。正確にエクオール量の状態を把握するために時間も公式に入れないといけないと思われる。

ロジスチック回帰でイソフラボン摂取が低いと自記式ではあるが、さまざまな疾患への罹患のリスクのなることが示された。イソフラボン濃度が高い参加者はアレルギーや潰瘍や更年期障害のリスクのほうが少なかった (OR<1) (Table 1)。

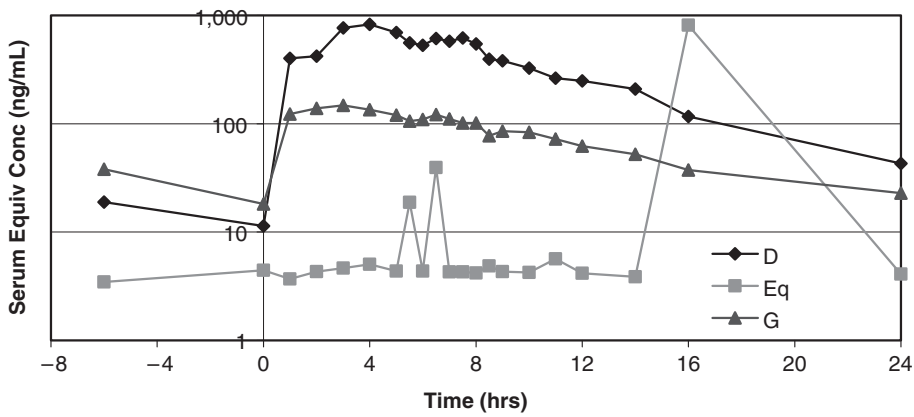


Fig. 4. Twenty-four hour time series after ingestion of 100 mg isoflavone tablet.

Table 1. Relationship between IF blood concentration in dried blood spots and health history assessed by logistic regression

				Odds Ratio <sup>1</sup>		
Health Conditions (affecting more than 10% of population)	N	% reporting	D (mean)	Eq (mean)	G (med)	
Allergies	129	31.0				0.994*
Migraine	129	21.7				
Menopausal syndrome	129	20.2		0.988 <sup>†</sup>		
Obesity	128	18.8				
Skin allergies	128	18.8				
Depression	126	15.1				0.994*
High blood pressure	122	10.7				
Ulcer	125	10.4	1.106 <sup>†</sup>			0.99*

<sup>1</sup>Logistic regression using Enter (0.1 cutoff for entry and removal)

<sup>†</sup>P<0.1; \*P<0.05

## 要 約

私達は新しいHPLC-ECDを用いて乾燥血液スポットサンプルからイソフラボンを測定できる系を開発した。これは多数の疫学的サンプルや薬理動態の測定に役立つ。食事記録から計算したイソフラボン摂取量と血液スポットから測定したイソフラボン濃度の相関は良く、この方法が信頼できるものであることを示した。さらに、血液の測定は重要なダイゼイン代謝産物であるエクオールを測定できる。しかし、血液サンプルによってエクオールproducerかどうかを決定することに関しては血液採取のタイミングが重要である。なぜならエクオールのピークはダイゼインやゲニステインが現れるより遅れてあらわれ、より短い半減期をもつからである。ロジステイック回帰により高い血中イソフラボン濃度を示したものはアレルギーや閉経期症状、消化性潰瘍などの既往がすくなかった。

## 文 献

- 1) 厚生省, 国民栄養調査成績平成6年版, 第一出版, 東京, 1994.
- 2) Melby, M. K., S. Watanabe, et al. "Sensitive high-performance liquid chromatographic method using coulometric electrode array detection for measurement of phytoestrogens in dried blood spots." *Chromatograph*. (in press)