

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一 …… 1115

個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究

所属 独立行政法人国立健康・栄養研究所
栄養疫学プログラム生体指標プロジェクト
研究者 石見佳子
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：本研究では大豆イソフラボンの生体利用性における個体特性に着目した骨粗鬆症の予防法を確立することを目的とした。閉経後女性を対象に大豆イソフラボン配糖体 75mg/日の二重盲検プラセボ対照二群間平行比較試験を実施した。その結果、1年間の介入は骨密度には大きな影響を与えないが、エクオール産生能を考慮して解析を行なうと、エクオール産生者の大腿骨近位部の骨密度の低下率は非産生者に比べて有意に低いことが明らかになった。

分担研究者

内山 成人 大塚製薬株式会社 佐賀栄養製品研究所
岡 純 東京家政大学家政学部
上原 万里子 東京農業大学応用生物科学部
戸田 登志也 フジッコ株式会社

A. 目的

骨量は一旦減少すると回復は望めないことから、骨粗鬆症は予防が最も重要である。本研究の目的は、閉経期女性の骨量減少に対する大豆イソフラボン摂取の効果を個体特性を考慮に入れ検証し、より効果的な骨粗鬆症の予防法を確立することである。疫学調査によれば、心筋梗塞や骨粗鬆症などの生活習慣病の発症は、欧米人に比べてアジア人で低く、この理由の一つとしてアジア人が大豆を多く摂取していることが挙げられる。中でも大豆に含まれるイソフラボンは弱いエストロゲン作用を示すことから、我々はこれまでに閉経後骨粗鬆症モデル動物を用いて、大豆イソフラボンが骨量減少を抑制することを報告してきた。一方、日本で行なわれた疫学調査及び人を対象とした介入試験では、大豆イソフラボンの有効性について必ずしも一致した見解は得られていない。これらの異なる結果は、対象者の個体差によるものであると考えられる。一方、現在イソフラボンの骨に対する作用は、ダイゼインの代謝産物であり、活性の本体であると考えられているエクオールの産生に影響を受けることが明らかにされている。

ところがエクオールの腸管における産生には個体差があり、日本人では約50%が非産生者であることが報告されている。そこで、閉経期女性を対象に、大豆イソフラボンの介入試験を行ない、エクオールの産生能と骨量減少を抑制する効果について、相関関係の有無を検討する。我々はすでに137名の被験者についてパイロット試験を開始しているが、今回さらに母集団を増やすため、新たに47名の参加者を募集し、2年間の試験を実施した。本報告書では1年目までの解析結果について報告する。

B. 方法

[対象者]：閉経後1-5年を経過した女性を募集した。対象者は以下の条件を満たす者である：
1) 閉経後1年以上かつ5年以下で、しかもこの2年間で女性ホルモンによる治療を受けない者
2) この2年間に規則的なスポーツトレーニングを実施していない者
3) 現在骨粗鬆症や高脂血症の治療薬を使用していない者。

[試験群]上記被験者を対象に採便を行ない、各人

のエクオール産生能の有無を調べ、エクオール産生者と非産生者の割合が均等になるように 1) 対象群、2) イソフラボン摂取群の 2 群に分ける。プラセボコントロール二重盲検法を採用する。

[倫理面への配慮] 被験者の人権擁護のための配慮

- 1) 本研究の遂行に当っては、本研究所所定の「人を対象とする実験・調査等に関する倫理指針」に基づくことはもちろんのこと、関連法規を厳守して被験者の人権と安全性を最大限に尊重して実施する。
- 2) 被験者のプライバシーに関する事項は本人の同意なしに公開しない。

インフォームドコンセント

- 1) 研究協力希望者には、予め本研究の目的、実験の主旨、方法および危険の可能性、得られる成果について文書を添えて口頭にて説明を行い、研究に対して十分な理解と参加の同意が得られかつ必要事項および捺印のある同意書が得られた者を被験者とする。
- 2) 被験者は実験から離脱する自由を常に保障され、また、離脱によりいかなる不利益も被らないことが保障されていることを明らかにする。

[イソフラボンの摂取] 大豆イソフラボン配糖体（フジフラボン P40）を毎日 75mg（アグリコン換算 47mg）を 2 年間摂取してもらう。対照群にはプラセボカプセルを摂取してもらう。

[測定項目] 大腿骨、腰椎、全身骨密度及び身体組成をホロジック社 QDR-4500 を用いる DXA 法により測定した。血中骨代謝および脂質代謝マーカー、ホルモン濃度、血中および尿中イソフラボン濃度の測定を行なった。栄養・生活に関するアンケートおよび面接調査を行なった。

[フラクトオリゴ糖摂取時のダイゼイン代謝産物と腸内フローラの変動] エクオール産生に及ぼすフラクトオリゴ糖の影響をラットを用いて検討した。

[統計解析] Baseline、6 ヶ月、1 年目の結果との間の有意差検定は、SPSS (Ver14J) を用いた繰返しのある ANCOVA 検定により、エクオールの影響は 2 元配置 ANCOVA により、2 群間の有意差検定は Student's t-test により行なった。 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 結果

解析は Baseline では以前に募集した被験者と合わせたプラセボ群 51 名、イソフラボン群 46 名、1 年後はプラセボ群 47 名（4 名離脱）、イソフラボン群 46 名の結果について行なった。

1. 新たに募集した 47 名について、糞便を用いてエクオールの産生能を測定した。その結果、産生者 60.4%、非産生者 39.6%であった。
2. 介入前に糞便中にエクオール産生が認められたエクオール産生者のうち、介入前では 78.3%、介入 6 ヶ月後では 92.3%、介入 12 ヶ月後では 71.4%が、24 時間尿中にエクオールが検出された。
3. Baseline、6 ヶ月、1 年後の被験者の年齢、体重、身長、閉経後年数は両群間で差はなかった。
4. Baseline の血中及び血中ダイゼイン、ゲニステイン及びグリシテイン濃度は両群間で有意な差は認められなかった。1 年後の血中、尿中イソフラボン濃度は、プラセボ群に比べてイソフラボン摂取群で有意に高値を示した。ゲニステイン濃度に変化は認められなかった。
5. Baseline の血中及び尿中エクオール濃度は両群間で有意な差は認められなかった。エクオール産生者の血中及び尿中エクオール濃度は非産生者に比べて有意に高値を示した。イソフラボン摂取 1 年後では、イソフラボン群のエクオール産生者の血中エクオール濃度は非産生者より有意に高値を示し、ダイゼインからエクオールへの代謝には個体特性があることが示唆された。プラセボ群ではエクオール産生者であっても血中エクオール濃度に変化は認められなかった。
6. 腰椎、大腿骨骨近位部、全身の骨密度の測定を行なったところ、試験開始 1 年後の大腿骨頸部と Ward's 三角部の骨密度は、プラセボ群では有意に低下したが、イソフラボン摂取群では統計学的に有意な低下は認められなかった。Baseline の骨密度及び 6 ヶ月間と 1 年間の骨密度の変化率（全身、腰椎、大腿骨）は、両群間に有意な差は認められなかった。
7. 糞便によりエクオール産生能を評価し、骨密度の変化率を産生者と非産生者に分けて解析したところ、イソフラボン群のエクオール産生者で

は、6ヶ月では全身から頭部を除いた sub whole body 及び大腿骨頸部、1年では大腿骨近位部とその一部である inter trochanter 部の骨密度の低下率が、非産生者に比べて産生者で有意に低かった。一方、プラセボ群では両群の骨密度に有意な差は認められなかった。

8. 骨代謝マーカー値は若年女性に比べて高値を示したが、試験開始時、1年後とも両群間に有意な差は認められなかった。
9. Baseline の血中エストラジオール濃度は 11 ± 2 pg/mL であり、若年女性に比べて有意に低値であった。FSH、LH、プロゲステロンは若年女性に比べて高値を示した。Baseline の甲状腺刺激ホルモン (TSH)、甲状腺ホルモン (T3 および T4) 濃度は正常範囲であり、両群間で有意な差は認められなかった。試験開始 1 年後の血中エストラジオール、FSH、LH、プロゲステロン濃度は、両群ともに baseline に比べて有意に低値を示したが、群間に有意な差は認められなかった。血中 TSH、T3、T4 濃度は若干の変動があったが、全て正常範囲であった。
10. Baseline の血中脂質 (総コレステロール、LDL、HDL コレステロール、トリグリセリド) は両群間に差は認められなかった。Baseline の平均血中総コレステロール濃度は 227.0 ± 33.4 mg/mL であり、若年女性に比べて有意に高値を示した。血中脂質はイソフラボンの摂取による影響を受けなかった。
11. Baseline の栄養素 (カルシウム、ビタミン D、ビタミン K、たんぱく質) およびイソフラボン摂取量、エネルギー摂取量は両群間で差は認められなかった。両群のカルシウム摂取量は Baseline 及び 1 年後ともに一日当たり 571 ~ 660 mg であった。食事から摂取するイソフラボン量はアグリコン換算で一日当たり約 25 ~ 31 mg であった。
12. 生活活動度においても両群間で有意な差は認められなかった。
13. 閉経後骨粗鬆症モデル動物を用い、エクオールの骨量減少抑制作用を明らかにした。
14. エクオール産生を高める食品成分の検索を行な

い、フラクトオリゴ糖 (FOS) に有効性が認められた。FOS はダイゼインから O-DMA への代謝を抑制し、エクオールへの代謝を促す可能性が示唆された。

15. 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて、カナマイシン投与により腸内細菌の活性が低下し、ダイゼインからエクオールや O-DMA への代謝が阻害されると、ダイゼイン摂取時の骨量減少抑制作用も減弱することが明らかとなった。
16. 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて、子宮に比し、骨に対するイソフラボンの作用が、少量で強くあらわれることを経口投与でも確認した。

D. 考察

本研究はイソフラボンの骨粗鬆症予防効果を個体特性に基づいて解析するとともに、安全性についても評価するものである。被験者は健常な閉経後女性であり、血中エストラジオール濃度が 20 pg/ml 以下であることから、閉経後であることが確認された。

[エクオール産生能]

本研究ではイソフラボンの代謝に関する個体特性として、ダイゼインの代謝産物であるエクオールの産生能に着目した。糞便によるエクオール産生の解析では、エクオール産生者は全体の 60.4% であり、糞便中にエクオール産生が認められた者は、24 時間尿中にエクオールが検出されたことから、エクオール産生能の判定として糞便での測定は妥当であったと考えられた。また、血中のエクオール濃度を測定することにより、エクオール産生の有無を判断することができると考えられた。今後は尿中、血中濃度ともにカットオフ値を設定する必要がある。また、動物試験によりエクオール産生には腸内細菌が重要な働きをしていることが確認された。

[イソフラボンの骨代謝に対する有効性]

腰椎、大腿骨近位部、全身の骨密度の測定を行なったところ、イソフラボン摂取により大腿骨頸部とワーズ三角部において骨量の減少が抑制されたが、1 年間の変化率は、プラセボ群とイソフラボン群の間で有意な差は認められなかった。

一方、糞便によるエクオール産生能の有無に基づき骨密度の変化率を産生者と非産生者に分けて解析したところ、大腿骨近位部及び inter trochanter

部の骨密度の低下率は、エクオール非産生者に比べて産生者で低かった。また、全身の体脂肪量についても非産生者に比べて産生者で増加率が低かった。これらのことから、1年間のイソフラボン配糖体(アグリコン換算 47mg/日)の摂取は、エクオール産生者において骨代謝及び脂質代謝を改善する可能性が示唆された。

現在までに報告されている諸外国におけるイソフラボンの介入試験では、50~100mg/日のイソフラボンアグリコン摂取が骨密度の減少を抑制すると報告されているが、これらの試験では日常の食生活におけるイソフラボン摂取量はほぼゼロにコントロールされている。一方、日本人は日常的にイソフラボンを摂取していることから、イソフラボンの介入効果が得られにくいことが考えられる。今回の試験により、個々人のエクオール産生の有無を評価することで、イソフラボンの骨代謝に対する有効性が検証できる可能性が示唆された。

なお、カルシウムの摂取量は両群ともに650mg/日以上であったことから、今回の結果は十分なカルシウム摂取の上で得られた結果である事を強調したい。

[イソフラボンの安全性]

大豆イソフラボンの安全性に関して、1年間の大豆イソフラボン配糖体 75mg/日(アグリコン換算 47mg/日)摂取は、閉経後女性の血中の性ホルモン濃度に影響を及ぼさないことが示唆された。栄養調査では、一日当たりのイソフラボン摂取量はアグリコン換算で25~31mg/日であった。今回の試験ではアグリコン換算で47mg/日のイソフラボンを介入したことから、本試験におけるイソフラボンアグリコンとしての一日の全摂取量は75mgとなる。これは食品安全委員により報告された、一日の安全なイソフラボンアグリコンの摂取上限値である70~75mgに相当する。本試験により、閉経後女性において、75mg/日(アグリコン換算 47mg/日)のイソフラボン摂取は、血中の性ホルモン濃度に影響を与えないことが示された。

E. 結論

閉経後女性を対象とした大豆イソフラボン配糖体75mg/日(アグリコン換算 47mg/日)の1年間の介入は、骨密度には大きな影響を与えないが、エクオール産生性を考慮して解析を行なうと、エクオール産生者の大腿骨近位部の骨密度の低下率は非産生者に比べて有意に低いことが明らかになった。また、同摂取は閉経後女性の血中の性ホルモン濃度に影響を与えないことが示された。

F. 研究報告

1. 論文発表

1. Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, Ezaki O, Cui H, Yamada K, Ishimi Y: Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism*: 53: 942-948, 2004
2. Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y: Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice *J Nutr*: 134: 2623-2627, 2004
3. Uesugi S, Watanabe S, Ishiwata N, Uehara M, Ouchi K. Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women. *Biofactors*. 22:221-218. 2004
4. Koshihara M, Masuyama R, Uehara M, Suzuki K. Effect of dietary calcium: Phosphorus ratio on bone mineralization and intestinal calcium absorption in ovariectomized rats. *Biofactors*. 22:39-42. 2004
5. Uehata M. Equol, a metabolite of daidzein, prevents bone loss in ovariectomized mice. *Polyphenol Communications 2004* P43-44 Gummerus Printing Jyväskylä, Finland
6. Koshihara M, Masuyama R, Uehara M, Suzuki K. Reduction in dietary calcium/phosphorus ratio reduces bone mass and strength in ovariectomized rats enhancing bone turnover.

- Biosci Biotechnol Biochem. 69:1970-1973, 2005.
7. Matsuzaki H, Katsumata SI, Uehara M, Suzuki K, Nakamura K. Effects of high calcium intake on bone metabolism in magnesium- deficient rats Magnes Res. 18: 97-102, 2005.
 8. Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, Fuku N, Teramoto T, Okuhira T, Ueno T, Uchiyama S, Urata K, Yamada K, Ishimi Y: Cooperative effects of isoflavone and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese Women: a randomized placebo-controlled trial. Metabolism 55: 423-433, 2006
 9. Wu J, Oka J, Tabata I, Higuchi M, Toda T, Fuku N, Ezaki J, Sugiyama F, Uchiyama S, Yamada K, Ishimi Y. Effects of isoflavone and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: One-year randomized placebo-controlled trial. J Bone Miner Res 21 : 780-789, 2006
 10. Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M, Ishimi Y. Possible role of equol status in the effects of isoflavone in bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: randomized placebo-controlled trial. Menopause in press.
 11. Katsumata S, Matsuzaki H, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K. Moderate magnesium-restricted diet affects bone formation and bone resorption in rats. Magnes Res. 19:12-18, 2006.
 12. Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K. Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. Biosci Biotechnol Biochem. 70: 2547-2550, 2006.

2. 学会発表

1. 大友拓也、呉堅、岡純、戸田登志也、内山成人、上原万里子、石見佳子他 4 名 個体特性に着目した大豆イソフラボンの骨粗鬆症予防効果及び

運度との併用効果 第 126 回日本薬学会 (2006・仙台)

2. 上原万里子、太田篤胤、勝間田真一、武藤彩乃 他 4 名 : Daidzein 代謝産物の生体内動態に及ぼすフラクトオリゴ糖の影響, 日本農芸化学会 2005 年度大会 (2006・札幌).
3. 石見佳子、呉堅、岡純、田畑泉、他 3 名 個体特性に着目した大豆イソフラボンの骨粗鬆症予防効果:第 24 回日本骨代謝学会: (2006・東京)
4. Ishimi Y, Oka J, Tabata I, Wu J. et al.: Effects of isoflavone and exercise on bone mineral density and fat mass in postmenopausal Japanese women. 28th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research: (2006・Philadelphia)
5. Ishimi Y: Upper limit for isoflavone recommendation - Perspectives of the Japanese recommendation. 7th International Soy Symposium: (2007・Bangkok)
6. 勝間田真一、藤岡舞子、上原万里子、鈴木和春 他 3 名 : Daidzein とその代謝産物の骨量減少抑制効果の差異, 日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006・京都)

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル (小伝馬町駅前) 4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社