

図1 茶カテキン標準溶液の典型的なクロマトグラム  
UV 1(A)、UV 2(B)、ECD(C)

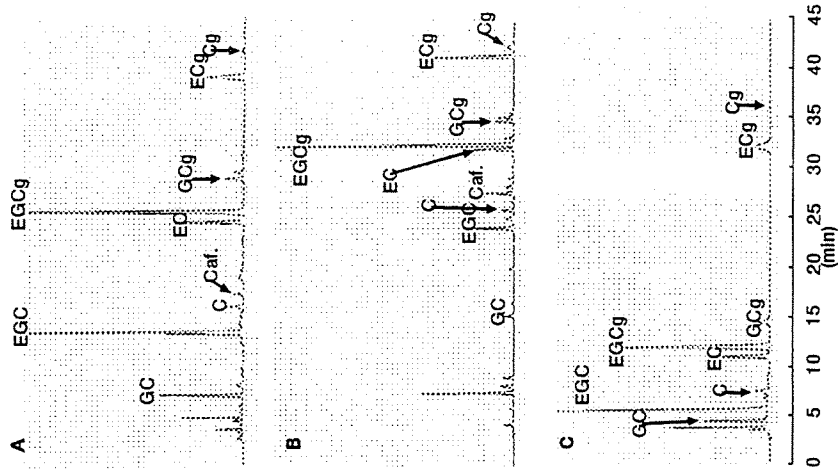


図2 緑茶飲料(#29)の典型的なクロマトグラム  
UV 1(A)、UV 2(B)、ECD(C)

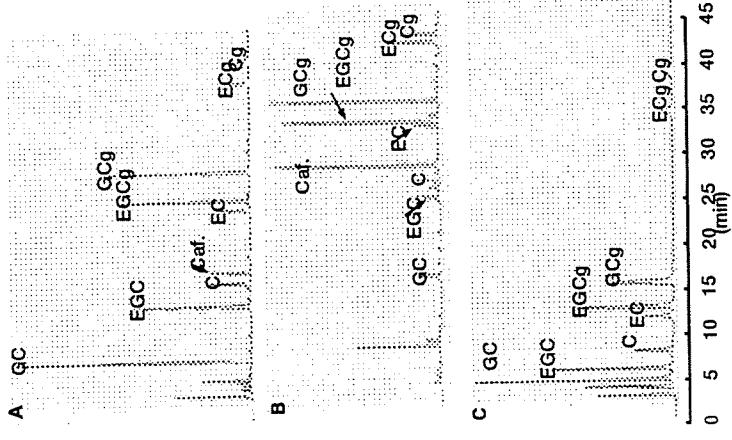


図3 緑茶飲料(#48)の典型的なクロマトグラム  
UV 1(A)、UV 2(B)、EC(C)

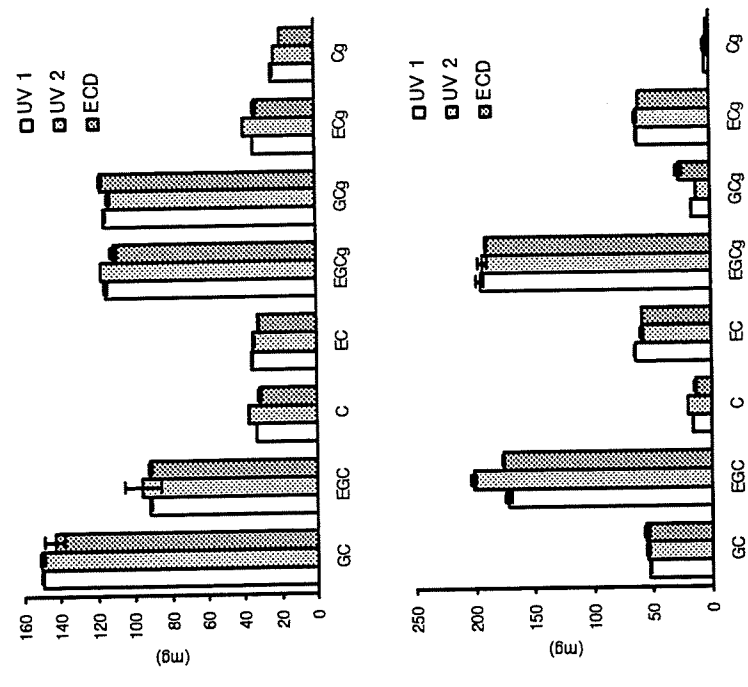


図4 市販緑茶飲料ペットボトル1本あたりの茶カテキン量  
Values are means  $\pm$  SE, n = 5

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

「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

分担研究者 石見 佳子

独立行政法人国立健康・栄養研究所

生体指標プロジェクトリーダー

本研究は、大豆イソフラボンを含む保健機能食品及びいわゆる健康食品（併せて「健康食品」とする）中の大豆イソフラボンを定量し、測定方法及び精度管理の問題点を明らかにするとともに、これらの食品の表示に関する調査を行うことを目的とする。今年度は、平成18年8月に厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針」の方法に基づき、液状、粉末状及び固体状の「健康食品」中の大豆イソフラボンの定量分析を行い、抽出法に関する検討も併せて行った。その結果、液状及び粉末状食品については、抽出効率も比較的良好で、CV値も低かったが、固体状食品のうち、軟カプセル型の食品では抽出効率が悪く、CV値も高値であった。これらの結果を踏まえ、軟カプセル型の食品に関しては抽出方法の検討を行った。また、アグリコン当量を求める簡便な計算式を提案した。表示に関しては、平成20年4月に購入した大豆イソフラボンを含むこれらの「健康食品」には、アグリコンとしての含有量及び注意事項が記載されていた。

協力研究者 （独）国立健康・栄養研究所  
生体指標プロジェクト 谷中かおる

A. 研究目的

近年、人々の健康志向が高まる中、大豆あるいは大豆の機能性成分を含む「健康食品」が数多く市販されるようになった。本邦では、大豆イソフラボン及び大豆たんぱく質が特定保健用食品の関与成分として厚生労働省から許可されているが、他方、大豆イソフラボンに関しては、その安全性が内閣府食品安全委員会で再評価され、平成18年年5月に「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方」が報告された。

これに伴い、リスク管理機関である厚生労働省は、平成18年8月「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針」を通知した。この中で、大豆イソフラボンを濃縮、強化した「健康食品」については、大豆イソフラボンアグリコンの含有量を表示することとされ、食品中の大豆イソフラボンアグリコンの試験方法も示されている。

そこで本研究では、現在市販されている大豆イソフラボンを含む「健康食品」中に含まれる大豆イソフラボンを定量し、試験

方法及び精度管理の問題点を明らかにするとともに、これらの食品の表示に関する調査を行うことを目的とした。今年度は、大豆イソフラボン、大豆たんぱくまたは大豆を原材料に含む液状、粉末状及び固体状の「健康食品」中の大豆イソフラボンを定量分析し、試験方法の問題点を明らかにするとともに、表示に関する調査を行った。なお、本報告書で扱う「健康食品」は、保健機能食品（特定保健用食品及び栄養機能食品）といわゆる健康食品を指す。

## B. 研究方法

### 定量試験

平成20年4月に大豆イソフラボンを含む「健康食品」のうち、液状食品（7品目）、粉末状食品（9品目）、固体状食品（5品目）を都内の小売店より購入し、厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針（食安発第0823001号）」の方法に基づき、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法)により定量した。なお、食品は、同一ロットのものを3検体ずつ分析した。

### [試薬・機器]

#### 試薬

- ・水: 超純水
- ・エタノール: 特級
- ・アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用
- ・イソフラボン標準品(12種類) (表1): ダイジン(Daidzin)、グリシチン(Glycitin)、ゲニスチン(Genistin)、ダイゼイン(daizein)、グリシテイン(glycitein)、ゲニステイン(genistein)、マロニルダイジン(6"-O-Malonylglycitin)、マロニルゲニスチン(6"-O-Malonylgenistin)、アセチルダイジン(6"-

O-Acetyldaidizin)、アセチルグリシチン(6"-O-Acetylglycitin)、アセチルゲニスチン(Acetylgenistin)

#### 機器

- ・遠心分離機: HITACHI himac CF 7D2
- ・攪拌機: IKEDA HOT STIRRER ISM 5BH-1
- ・振とう機: TAITEC STRONG SHAKER SR-2DS
- ・島津製作所製高速液体クロマトグラフィー

機種: SHIMAZU LC10AD

検出器: HITACHI L-4000 UV  
Detector

コントローラー: SHIMAZU C-R7A-303 plus

#### [定量用標準品溶液の調製]

ダイジン、グリシチン、ゲニスチンはそれぞれ2mg精秤し10mLの70%エタノールに溶解し、10mg/Lになるように調整した。

HPLCの分析条件を以下に示す。

カラム : YMC-Pack ODS-AM-303 (size 4.6×250mm I.D)

移動相 : A アセトニトリル/水/酢酸混合液(15:85:0.1 v/v/v)

B アセトニトリル/水/酢酸混合液(35:65:0.1 v/v/v)

濃度勾配 : AからBまでの直線濃度勾配を50分間行なう

流速 : 1mL/min

カラム温度: 35℃

測定波長 : 254nm

試料注入量: 10μL

試料は全て0.20μmのメンブレンフィルターでろ過した後、分析に供した。

#### [試料の調製]

以下に厚生労働省より通知のあった大豆イソフラボンの定量試験に関する方法を示す。液状食品は、イソフラボンとして1~10mgが含まれる量の食品を100ml容メスフラスコに正確に分取し、70%エタノールで100mlに定容して試験溶液とする。沈殿物が析出した場合には、必要に応じて浸とうあるいは超音波処理を行った後に遠心分離し、上清を試験溶液とする。

固体状及びペースト状食品は、試料を均一に粉碎もしくは混合した後、イソフラボンとして1~10mgが含まれる量の食品を50mlピーカーに精密に秤量し、70%エタノール25mlを加えて溶解させる。溶解し難い試料の場合には、振とうあるいは超音波処理を行って溶解させる。試料が完全に溶解した後、50ml容メスフラスコに移し変え、70%エタノールで50mlに定容して試験溶液とする。

振とうあるいは超音波処理をしても完全に溶解せず不溶物が認められる場合には、30分間室温で攪拌抽出した後、遠心分離して上清を50ml容メスフラスコに移し、残渣についても同様の抽出操作を更に2回行い、計3回の分の上清を集め、70%エタノールで50mlに定容する。試料は全て0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した後、分析に供する。

カプセル状食品の場合は、イソフラボンとして1~10mgが含まれる量の食品を50mlピーカーに精密に秤量する。水25mlを加えた後、30分間攪拌または超音波処理を行い、カプセル皮膜を溶解あるいは破碎する。遠心分離し、上清を100ml容メスフラスコに移す。残渣に70%エタノール

25mlを加えて室温で30分間攪拌した後、遠心分離し、上清を上述の100ml容メスフラスコに移す。同様の抽出操作を更に2回行い、計3回の分の上清を集め、70%エタノールで100mlに定容して試験溶液とする。

#### C. 研究結果

##### 1. 試験方法に関する検討

##### 液状食品

液状食品は、豆乳飲料(特保;関与成分大豆イソフラボン)、調整豆乳及び大豆たんぱく飲料(特保;関与成分大豆たんぱく質)、清涼飲料水(特保;関与成分大豆たんぱく質)及び清涼飲料を選択した。イソフラボンとして1~10mgが含まれる量の食品を正確に分取し、70%エタノールで50mlに定容し、混合させて試験溶液とした。液状食品7品目のうち5品目(豆乳飲料,調整豆乳A,清涼飲料水,清涼飲料)は上記の方法で抽出されたが、2品目(調整豆乳B,大豆たんぱく飲料:特保;関与成分大豆たんぱく質)においては、表示量に対して分析値が著しく低値であった。これらの食品については、振とう、超音波処理、加熱攪拌抽出(45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C)のいずれか、あるいは2つを組み合わせで抽出した後、遠心分離(3000rpm, 30min, 4 $^{\circ}$ C)して上清を分析した。その結果、抽出されにくかった大豆たんぱく飲料は、振とう機(シェイカー)による振とう(300rpm)あるいは45 $^{\circ}$ Cで30分の加熱攪拌操作を行うことで表示されているイソフラボン含有量の90%量を確認することができた。調整豆乳Bは45 $^{\circ}$ Cで30分加熱攪拌することで表示されている量を確認することができたが、再度異なるロッ

トでの抽出を試みた際には、同様の方法でも表示量の68%程度しか検出されなかった。この食品は大豆たんぱく質を関与成分とする特定保健用食品であることから、ロットによって大豆イソフラボンの含有量に差があることが考えられた。

#### 粉末状食品

粉末状食品は、乾燥スープ（特保；関与成分：分離大豆たんぱく質）、黒大豆加工食品、大豆発酵食品、プロテインパウダー等を選択した。全ての食品で通知の抽出方法で定量分析が可能であった。

#### 固体状食品

固体状食品は原材料に大豆イソフラボンまたは大豆抽出物を含む、錠剤型、カプセル型及び軟カプセル型の食品を選択した。

錠剤型とカプセル型の食品は、通知の抽出方法で分析可能であった。一方、軟カプセル型の2品目は、通知の抽出方法ではゼラチン質の部分が溶解しにくいいため、加熱して攪拌抽出を行なった。軟カプセル型Aは、45℃で約1時間攪拌することにより、表示通りのイソフラボン量が確認された。一方、軟カプセル型Bは45℃で1時間抽出を行なっても表示に対する分析値の割合が75.8%であり、CV値も11.2%であったため、さらに高温の55℃、65℃、75℃で30分間抽出を行ない、抽出温度の検討を行なった。その結果、55℃でもっとも高い値が得られた（表2）。55℃で抽出した時の大豆イソフラボンの分析値は、表示に対して85.4%、65℃では81.8%、75℃では82.2%といずれも80%を上回る結果であった。次に、抽出操作の回数を検討したところ、1回の加熱攪拌抽出では表示量の78.2%しか検出されなかったが、2回抽出操作を行な

うことにより、83.4%、3回抽出を実施した場合は85.4%の量を検出することが可能となった（表2）。以上より、軟カプセルの場合は、55℃で30分の抽出を3回行う必要があると考えられた。

#### 2. 表示に関する調査及び分析値との比較

厚生労働省による通知では、大豆イソフラボンを濃縮、強化した食品については、一日当たりの摂取目安量が30mgを超えないように設定すること、また、大豆イソフラボンアグリコンの含有量及び注意事項を表示することとしている。そこで、これらの表示に関する調査を行った。

#### 液状食品

液状食品は豆乳及び大豆を含む清涼飲料であるが、特定保健用食品に限らず、対象とした全ての食品に大豆イソフラボンアグリコン含有量の記載があった。特定保健用食品には、大豆イソフラボンが関与成分の食品と大豆たんぱく質が関与成分の食品があるが、後者において、分析値が30mgを超える食品が1品目あった（表3）。分析値は表示量の81~125%であり、CV値（%）は、7品目中1品目を除いて5%以下であった（表3）。CV値が高値であった調整豆乳Aは、通知の方法に加えて30分の振とう操作を必要とした食品である。

#### 粉末状食品

粉末状食品のうち、原材料として大豆の記載がある食品には大豆イソフラボンアグリコンの含有量に関する表示があり、分析値も1食当たり30mgを超える食品はなかった。一方、スポーツ時の栄養補給を目的とした大豆たんぱく質のパウダーには、一食当たりに含まれる大豆

イソフラボン量が40mgを超える食品もあった(表3)。これらの食品には大豆イソフラボンの含有量に関する表示をする必要はないが、特に子供のスポーツ時の栄養補給を目的としたプロテインパウダーは、過剰摂取の可能性が否定できないことから、注意が必要であると考えられた。一方、大豆イソフラボンの含有量に関する表示がある食品については、分析値は表示量の88~275%であった。CV値(%)は9品目中6品目で5%以下であった(表3)。

#### 固体状食品

大豆イソフラボンを含む固体状食品は、錠剤型、カプセル型及び軟カプセル型食品であることから、対象とした全ての食品に大豆イソフラボンアグリコン含有量の表示があった。表示量、分析値ともに1日当たりの摂取目安量が30mgを超える食品は認められなかった(表3)。また、注意事項の表示も全ての食品でなされていた。固体状食品の分析値は表示量の82~102%であり、CV値も5%を越えるものは5品目中1品目(軟カプセル型A)であった(表3)。

我々は、平成18年12月に全国の小売店より無作為に購入した食品のうち、大豆イソフラボンを含む「健康食品」について、大豆イソフラボンの定量分析及び表示の調査を行ったが、この際には、1日当たりの大豆イソフラボンの摂取目安量が30mgを超える錠剤型食品は、5品目中3品目で認められた(表4)(栄養学雑誌印刷中)。

### 3. イソフラボンの成分分析

今回の成分分析は、ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインについてそれぞれの配糖体、アセチル配糖体、マロニル配糖体の合計12種類(表1)の大豆イソフラボンの成分分析を行った。サクシニル配糖体については、標準物質が存在しないことから、試薬会社に合成及び標準物質の調製を発注したところである。サクシニル配糖体の定量分析は、次年度に検討する予定であるが、今回対象とした健康食品中には僅かにピークが検出される程度であった。

#### 液状食品

液状食品のうち豆乳は、ダイゼイン型とゲニステイン型の配糖体及びマロニル配糖体が多く含まれていた(表5)。また、大豆胚芽抽出物を含む清涼飲料は、配糖体のダイジンとグリシチンが主な成分であった。3種のイソフラボンの型別の含有割合を表6に示した。

#### 粉末状食品

粉末状食品のうち、大豆プロテインパウダー以外の食品は、ダイゼイン型とゲニステイン型の配糖体とアグリコンが主な成分であった(表5)。一方、大豆プロテインパウダーは、ダイゼイン型とゲニステイン型の配糖体及びアグリコンに加えてマロニル配糖体のイソフラボンが含まれていた(表5、6)。

#### 固体状食品

固体状食品は3種の配糖体を含む3品目と、アグリコンのみを含む2品目に大別された(表5、6)。

D. アグリコン当量の計算に関する考察  
厚生労働省の通知では以下の式によりアグリコン型イソフラボン等量を求めて

いる。

ダイゼイン型のアグリコン当量 mg/L

$$\begin{aligned} T_{De} = & A_D \times C_D / A_D \times M_D / M_D \times M_{De} / M_D \pm \\ & A_{AD} \times C_D / A_D \times M_{AD} / M_D \times M_{De} / M_{AD} \pm \\ & A_{MD} \times C_D / A_D \times M_{MD} / M_D \times M_{De} / M_{MD} \pm \\ & A_{SD} \times C_D / A_D \times M_{SD} / M_D \times M_{De} / M_{SD} \pm \\ & A_{De} \times C_D / A_D \times M_{De} / M_D \times M_{De} / M_{De} = \\ & (A_D + A_{AD} + A_{MD} + A_{SD} + A_{De}) \times C_D / A_D \times \\ & M_{De} / M_D = TA_{De} \times C_D / A_D \times 0.611 \text{ (式 1)} \end{aligned}$$

$T_{De}$  : ダイゼイン型アグリコン当量 mg/L

A : ピーク面積

$C_D$  : 標準液中のダイジンの濃度 mg/L

M : 分子量

$TA_{De}$  : ダイゼイン型イソフラボンのピーク面積の総和

上記の計算は極めて複雑であることから、次式による計算を提案する。

ダイゼイン型のアグリコン当量 mg/L

$$T_{De} = TA_{De} / A_D \times MC_D \times M_{De} \text{ (式 2)}$$

$T_{De}$  : ダイゼイン型アグリコン当量 mg/L

$TA_{De}$  : ダイゼイン型イソフラボンのピーク面積の総和

$A_D$  : 標準液ダイジンのピーク面積

$MC_D$  : 標準液ダイジンのモル濃度

$M_{De}$  : ダイゼイン (アグリコン) の分子量

同様にグリシテイン及びゲニステイン型のアグリコン当量について求めることができる。式 2 は式 1 に比較して理解しやすいと考えられることから、改訂を提案する。

## E. 結論

- 大豆イソフラボンを含有する「健康食品」のうち、大豆たんぱく質を関

与成分とする特定保健用食品（調整豆乳）では、70%エタノール添加後に30分の振とう操作を必要とする食品があった。

- 粉末状及び固体状食品については、特に厚生労働省の通知にある大豆イソフラボンの試験方法で問題となる事項は認められなかった。
- 軟カプセル状の食品については、70%エタノール添加後に55℃で30分の加熱攪拌抽出（3回）が必要であった。
- 食品の表示及びイソフラボンの分析値に関しては、液状及び固体状食品では、一日当たりの摂取目安量中に含まれるイソフラボンアグリコン量の表示も適正であり、また、分析値が30mgを超える食品は12品目中1品目であったが、粉末状食品のうち、大豆プロテインパウダーについては、1日当たりの摂取目安量中の大豆イソフラボン含有量が30mgを超える食品が5品目中2品目認められた。
- アグリコン当量を求める簡便な計算式を提案した。

## F. 業績

- Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo J L, 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. *E J Nutr* 47:273-279 (2008)
- Taku K, Umegaki K, Ishimi Y, Watanabe S. Effects of extracted soy isoflavone alone on blood total and LDL cholesterol:



Meta-analysis of randomized controlled trials. **Therapeutics and Clin Risk Management** 4: 1097-1103 (2008)

3. 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 1) :48-52 (2008)
4. Na X, Ezaki J, Sugiyama F, Cui H, Ishimi Y. Isoflavone regulates lipid metabolism via the expression of related genes in OVX rats fed on a high-fat diet. **Biomed Environ Sci.** 21: 357-364 (2008)
5. 石見佳子, 高野史, 山内淳, 卓興鋼, 梅垣敬三 et al. 「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** 印刷中

- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

表1. 大豆イソフラボン標準品

分類	ダイゼイン型イソフラボン	グリシテイン型イソフラボン	ゲニステイン型イソフラボン
配糖体 マロニル配糖体マ アセチル配糖体ア アグリコン	ダイジン(D) ロニルダイジン(MD) セチルダイジン(AD) ダイゼイン(De)	グリシチン(GI) マロニルグリシチン(MGI) アセチルグリシチン(AGI) グリシテイン(GIe)	ゲニスチン(G) マロニルゲニスチン(MG) アセチルゲニスチン(AG) ゲニステイン(Ge)

表2. 70%E10Hによる軟カプセルからの大豆イソフラボン抽出条件の検討  
 〈温度〉

	45°C	55°C	65°C	75°C
軟カプセルB-1	5.68	6.54	6.05	6.14
軟カプセルB-2	5.69	6.26	6.21	6.19
軟カプセルB-3	4.65	6.14	—	—
平均値 mg	5.34	6.32	6.13	6.17
表示に対する割合(%)	71.2	84.2	81.8	82.2
CV値 (%)	11.3	3.3	—	—

〈抽出回数〉

	1回	2回	3回
ライフマックス-B	5.86	6.25	6.40
表示に対する割合(%)	78.2	83.4	85.4

表3. 食品の表示と大豆イソフラボンアグリコン含有量

形態	名	原 材 料 名	1日または1回摂取目安量に関する表示	表 示 量	表示量のアグリコン換算値 <sup>1)</sup> (μg)	分析値(アグリコン当量)(μg)	表示量に対する割合(%)	CV%
液状食品	豆乳飲料 (特定保健用食品大豆イソフラボン)	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	1日1本(125ml)	大豆イソフラボンアグリコン として25mg	25	29	116	0.7
	調整豆乳A (特定保健用食品大豆たんぱく質)	大豆 (遺伝子組換えでない)	1本(200ml)	大豆イソフラボンアグリコン として30mg	30	35	117	3.8
	調整豆乳B (特定保健用食品大豆たんぱく質)	大豆	1本(200ml)	大豆イソフラボンアグリコン として16mg	16	20	122	9.6
	大豆たんぱく飲料 (特定保健用食品大豆たんぱく質)	大豆たんぱく、大豆	1本(195g)	大豆イソフラボンアグリコン として27mg	27	24	90	4.2
	清涼飲料水 (特定保健用食品大豆たんぱく質)	粉末状大豆たんぱく (遺伝子組換えでない)	1本(100g)	大豆イソフラボンアグリコン として8~22mg	8~22	9	範囲内	2.1
	黒豆茶 (特定保健用食品大豆たんぱく質)	黒大豆 大豆イソフラボン	1本(500ml)	大豆イソフラボン25mg (アグリコン換算)	25	24	96	0.7
	清涼飲料	大豆胚芽抽出物 (イソフラボン含有)	1日1本~2日に1本 (50ml)	イソフラボン40mg人 イソフラボンアグリコン換算 25mg	25	20	81	2.9
	乾燥スーパ (特定保健用食品大豆たんぱく質)	分離大豆たんぱく質	1袋(15g)	大豆イソフラボンアグリコン として18mgを含む	18	20	110	7
	コラーゲン、グルコサミン加工食品	大豆イソフラボン	1包(2g)	—	—	3	—	0.9
	黒大豆加工食品	黒大豆(国産100%) (遺伝子組換えでない)	1回2g, 1日に3回目安	ダイゼイン0.5mg, ダイゼイン 44mg, ゲニステイン25mg/100g	4	11	275	0.4
粉末状食品	大豆発酵食品	大豆発酵食品(大豆、米、大豆胚芽 (遺伝子組換え不分別))	1食(7g)	イソフラボンアグリコン 12mg	12	11	88	2.8
	プロテインパウダー (粉末たんぱく飲料)	大豆たんぱく	1食(21g)	—	—	44	—	0.5
	大豆たんぱく食品(栄養補助食品)	大豆分離たんぱく	1食(20g)	—	—	43	—	8.3
	プロテインパウダー (たんぱく質含有食品)	大豆たんぱく (遺伝子組換え大豆は使用して おりません)	1食(20g)	—	—	23	—	0.9
	プロテインパウダーボーイング (たんぱく補給食品)	粉末状大豆たんぱく	1食(20g)	—	—	21	—	9.1
	たんぱく食品(プロテインパウダー)	大豆分離たんぱく	1食(10g, 20g)	—	—	17	—	5
	大豆イソフラボン加工食品:錠剤型	大豆イソフラボン抽出物	1日1粒(0.25g)	大豆イソフラボンアグリコン 25mg	25	23	92	3.5
	アエラリア含有食品:錠剤型 (栄養補助食品)	大豆イソフラボン (イソフラボン含有)	1日3粒(0.75g)	大豆抽出物 18mg	11.3	9	82	3.3
	大豆抽出物含有食品:カプセル型 (栄養補助食品)	大豆抽出物	1日2粒(219mg×2)	大豆イソフラボン20mg アグ リコンとして12.2mg	12.2	11	91	3
	大豆イソフラボン加工食品:軟カプセル型A(栄養補助食品)	大豆イソフラボン抽出物	1日3粒(1.2g)	大豆イソフラボンアグリコン として30mg	30	31	102	6.5
大豆イソフラボン加工食品:軟カプセル型B(発酵大豆胚芽含有食品)	発酵大豆胚芽抽出物(遺伝子組 み換え大豆は使用していません)	1日2~4粒(1粒400mg)	大豆イソフラボンアグリコン として7.5mg	23	19	84	3.3	

1) 表示量のアグリコン換算値は、分析により求めたイソフラボン成分の割合を基に分子量の比から求めた。

表4 食品の表示とイソフラボン含有量（アグリコン換算値） 栄養学雑誌（印刷中）より抜粋

形態	名称	原材料名	1日または1回摂取目安量に関する表示	表示量	表示量の アグリコン換算値 <sup>1)</sup> (mg)	分析値 (アグリコン) (mg)
液状食品	調整豆乳 (特定保健用食品 大豆たんぱく質)	大豆 (遺伝子組換えでない)	1日1本 (200ml)	大豆イソフラボンアグリコンとして16mg	16	20
	豆乳飲料 (特定保健用食品 大豆イソフラボン)	黒大豆 (遺伝子組換えでない) 大豆イソフラボン	1日1本 (125ml)	大豆イソフラボンアグリコンとして25mg	25	29
	まるごと大豆飲料	大豆 (遺伝子組換えでない)	1本 (125ml)	大豆イソフラボン50mg	32	27
	豆乳飲料	大豆イソフラボン 大豆	1本 (125ml)	イソフラボン30mg	19	20
	黒豆茶	黒大豆 (遺伝子組換えでない) 大豆イソフラボン	1本 (500ml)	大豆イソフラボン25mg (アグリコン換算)	25	24
	清涼飲料水：液状剤型	焙煎大豆粉末 (イソフラボン含有)	1本 (50ml)	大豆イソフラボン40mg	26	8
	コーヒーミックス (栄養機能食品 ビタミンD)	黒豆 (大豆)	1杯分 (11g)	イソフラボン10mg	6.3	9.4
	コラーゲン食品	大豆イソフラボン	1日5g	大豆イソフラボン配合	記載なし	6
	きな粉調製品	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	1袋 (12g)	イソフラボン13.2mg	10	14
	大豆加工食品	青大豆粉末 大豆胚芽抽出物	1袋 (18g)	大豆イソフラボン15.14mg	10	11
粉末状食品	黒ごまきなこ	大豆 (国内産)	1杯分 (24g)	大豆イソフラボン24.24mg	20	18
	大豆イソフラボン加工食品：錠剤型 (美蓉サポート食品)	大豆抽出物 (遺伝子組換えでない)	1日6粒 (1.26g)	大豆イソフラボン50mg	31	46
	大豆イソフラボン加工食品：錠剤型 (健康補助食品)	大豆抽出物 (遺伝子組換えでない)	1日4粒 (1g)	大豆イソフラボン60mg	38	45
	大豆イソフラボン加工食品：錠剤型 (美蓉サポート食品)	大豆胚芽抽出物 (遺伝子組換えでない)	1日8粒 (2.0g)	大豆胚芽抽出物125mg (イソフラボンとして50mg)	32	33
	コエンザイムQ10含有食品：軟カプセル型 (栄養機能食品 ビタミンE)	大豆イソフラボン	1日2粒 (900mg)	イソフラボン3.7mg	2.3	3
	大豆発酵抽出物：錠剤型	大豆胚芽抽出物 (遺伝子組換えでない)	1日5粒 (1.25g)	イソフラボンアグリコン9mg	9	5.9
	菓子A (栄養食品)	大豆粉	1本 (30g)	イソフラボン22mg	14	14
	菓子B (栄養食品)	大豆粉	1本 (30g)	イソフラボン20mg	13	16
	黒豆茶	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	1包 (15g)	イソフラボン7.4mg	4.6	4.2
	煎り黒大豆	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	10g	大豆イソフラボン15mg (アグリコン換算)	15	15

1) 表示量のアグリコン換算値は、分析により求めたイソフラボン成分の割合を基に分子量の比から求めた。

表5. 食品100g当りのイソフラボン成分量(アグリコン換算値) 1) mg/一日目安量当たり

形態	名称	原材料名	D*	MD*	AD*	De*	GI*	MGI*	AGI*	Gle*	G*	MG*	AG*	Ge*	総イソ フラボン
液状食品	豆乳飲料 (特定保健用食品 大豆イソフラボン)	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	2.4	1.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	2.9	0.0	0.1	11.0
	調整豆乳 (特定保健用食品)	大豆 (遺伝子組換えでない)	9.3	4.0	0.2	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	11.7	8.4	0.2	0.0	34.9
	調整豆乳 (特定保健用食品)	大豆	5.0	0.6	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.2	9.7	0.0	0.8	0.7	17.4
	大豆たんぱく飲料 (特定保健用食品)	大豆たんぱく、大豆	3.8	0.6	0.3	3.1	0.9	0.1	0.4	0.4	8.7	2.0	0.3	3.8	24.4
	清涼飲料水 (特定保健用食品)	粉末状大豆たんぱく (遺伝子組換えでない)	1.1	0.5	1.7	0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.2	0.7	8.9
	黒豆茶	黒大豆 (遺伝子組換えでない) 大豆イ ソフラボン	11.7	3.7	0.0	0.0	6.0	0.0	1.0	1.0	0.7	0.0	0.4	0.0	24.2
	清涼飲料	大豆胚芽抽出物 (イソフラボン含有)	9.8	1.0	0.0	2.2	6.8	0.6	0.0	0.0	0.0	1.4	0.4	0.0	22.4
	乾燥スープ(特定保健用食品)	分離大豆たんぱく質	1.2	2.9	7.0	1.9	0.3	0.6	0.0	0.0	0.2	1.8	0.0	0.6	3.2
	コラーゲン、グルコサミン加工食品	大豆イソフラボン	1.2	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	2.5
	黒大豆加工食品	黒大豆(固態100%) (遺伝子組換えでない)	1.6	0.0	0.4	3.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	1.5	0.0	0.6	3.2
粉末状食品	大豆発酵食品	大豆発酵食品(大豆、米、大豆胚芽 (遺伝子組換え不分別))	0.1	0.0	0.1	4.9	0.1	0.0	0.0	2.3	0.1	0.1	0.0	2.9	10.6
	プロテインパウダー (粉末たんぱく飲料)	大豆たんぱく	2.1	4.6	0.5	4.9	0.4	0.8	0.9	0.6	6.1	13.7	0.8	8.7	44.0
	大豆たんぱく食品(栄養補助食品)	大豆分離たん白	2.1	6.4	0.5	3.6	0.6	1.3	0.0	0.5	3.6	16.8	1.0	6.2	42.6
	プロテインパウダー (たんぱく補給食品)	粉末状大豆たんぱく	1.8	2.3	0.2	1.7	0.4	0.3	0.5	0.2	3.9	6.0	0.7	2.8	20.9
	プロテインパウダー (たん白質含有食品)	大豆たんぱく (遺伝子組換え大豆は使用してお りません)	1.5	2.1	0.5	1.4	0.3	0.4	0.8	0.1	4.5	7.1	1.5	2.4	22.6
	たんぱく食品 (プロテインパウダー)	大豆分離たんぱく	0.7	0.7	0.1	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	1.7	1.8	0.4	1.5	8.2
	大豆イソフラボン加工食品: 錠剤型	大豆イソフラボン抽出物	0.0	0.0	0.0	9.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.7	23.0
	プエラリア含有食品: 錠剤型 (栄養補助食品)	大豆イソフラボン (イソフラボン含有)	3.9	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	9.2
	大豆抽出物含有食品: カプセル型 (栄養補助食品)	大豆抽出物	2.3	3.5	0.1	0.0	2.1	1.5	0.2	0.0	0.2	1.1	1.1	0.0	11.1
	大豆イソフラボン加工食品: 軟カプセ ル型(栄養補助食品)	大豆イソフラボン抽出物	13.1	0.1	0.1	0.8	13.8	0.0	0.1	0.1	0.0	2.5	0.0	0.0	30.5
大豆イソフラボン加工食品: 軟カプセ ル型(発酵大豆胚芽含有食品)	発酵大豆胚芽抽出物(遺伝子組 換え大豆は使用していません)	0.1	0.2	0.1	11.0	0.2	0.0	0.0	0.0	5.9	0.0	0.0	1.8	19.2	

1) アグリコン換算値は分子量の比から求めた \* 表1を参照

表6. 食品中の型別イソフラボンの割合 (重量比)

形態	名称	原材料名	ダイゼイン型 (%)	グリシテイン型 (%)	ゲニステイン型 (%)	総量 (%)
液状食品	豆乳飲料 (特定保健用食品：大豆イソフラボン)	黒大豆 (遺伝子組換えでない)	40.5	0.5	59.0	100
	調整豆乳 (特定保健用食品)	大豆 (遺伝子組換えでない)	39.1	2.6	58.3	100
	調整豆乳 (特定保健用食品)	大豆	31.8	3.8	64.4	100
	大豆たんぱく飲料 (特定保健用食品)	大豆たんぱく、大豆	31.8	7.4	60.8	100
	清涼飲料水 (特定保健用食品)	粉末状大豆たんぱく (遺伝子組換えでない)	43.5	1.4	55.1	100
	黒豆茶	黒大豆 (遺伝子組換えでない) 大豆イソフラボン	64.0	32.7	3.3	100
	清涼飲料	大豆胚芽抽出物 (イソフラボン含有)	58.1	33.6	8.3	100
	乾燥スープ (特定保健用食品)	分離大豆たんぱく質	65.7	5.7	28.6	100
	コラーゲン、グルコサミン加工食品	大豆イソフラボン	46.3	42.3	11.4	100
	黒大豆加工食品	黒大豆 (国産100%) (遺伝子組換えでない)	48.9	3.9	47.3	100
粉末状食品	大豆発酵食品	大豆発酵食品 (大豆、米、大豆胚芽 (遺伝子組換え不分別))	48.5	22.7	28.8	100
	プロテインパウダー (粉末たんぱく飲料)	大豆たんぱく	27.3	6.2	66.5	100
	大豆たんぱく食品 (栄養補助食品)	大豆分離たんぱく	29.6	5.5	64.9	100
	プロテインパウダー (たんぱく補給食品)	粉末状大豆たんぱく	28.9	7.0	64.1	100
	プロテインパウダー (たんぱく含有食品)	大豆たんぱく (遺伝子組換え大豆 は使用しておりません)	24.6	7.1	68.2	100
	たんぱく食品 (プロテインパウダー)	大豆分離たんぱく	29.2	5.0	65.9	100
	大豆イソフラボン加工食品：錠剤型	大豆イソフラボン抽出物	40.1	0.0	59.9	100
	プエラリア含有食品：錠剤型 (栄養補助食品)	大豆イソフラボン (イソフラボン含有)	43.0	45.1	11.9	100
	大豆抽出物含有食品：カプセル型 (栄養補助食品)	大豆抽出物	53.5	34.6	11.9	100
	大豆イソフラボン加工食品：軟カプセル 型 (栄養補助食品)	大豆イソフラボン抽出物	46.1	45.6	8.4	100
大豆イソフラボン加工食品：軟カプセル 型 (発酵大豆胚芽含有食品)	発酵大豆胚芽抽出物 (遺伝子組換え 大豆は使用していません)	58.7	31.8	9.5	100	

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohtomo T, Uehara M, Peñalvo J L, Adlercreutz H, Katsumata S, Suzuki K, Takeda K, Masuyama R, <u>Ishimi Y.</u>	Comparative activities of daidzein metabolites, equol and <i>O</i> -desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures.	E J Nutr	47	273-279	2008
Taku K, Umegaki K, <u>Ishimi Y</u> , Watanabe S.	Effects of extracted soy isoflavone alone on blood total and LDL cholesterol: Meta-analysis of randomized controlled trials.	Therapeutics and Clin Risk Management	4	1097-1103	2008
<u>Ishimi Y</u> , 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 1)	48-52	2008
Na X, Ezaki J, Sugiyama F, Cui H, <u>Ishimi Y.</u>	Isoflavone regulates lipid metabolism via the expression of related genes in OVX rats fed on a high-fat diet.	Biomed Environ Sci.	21	357-364	2008



Takuya Ohtomo  
Mariko Uehara  
José Luis Peñalvo  
Herman Adlercreutz  
Shin-ichi Katsumata  
Kazuharu Suzuki  
Ken Takeda  
Ritsuko Masuyama  
Yoshiko Ishimi

## Comparative activities of daidzein metabolites, equol and *O*-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures

Received: 12 January 2008  
Accepted: 18 June 2008  
Published online: 11 July 2008

T. Ohtomo · Y. Ishimi, PhD (✉)  
Project for Bio-index, Nutritional  
Epidemiology Program  
National Institute of Health and Nutrition  
1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku  
Tokyo 162-8636, Japan  
Tel.: +81-3/3203-5389  
Fax: +81-3/3203-7350  
E-Mail: ishimi@nih.go.jp

T. Ohtomo · K. Takeda  
School of Pharmacy  
Tokyo University of Science  
Chiba, Japan

M. Uehara · S. Katsumata · K. Suzuki  
Dept. of Nutritional Science  
Tokyo University of Agriculture  
Tokyo, Japan

J.L. Peñalvo · H. Adlercreutz  
Institute for Preventive Medicine, Nutrition  
and Cancer, Folkhälsan Research Center,  
and Division of Clinical Chemistry  
University of Helsinki  
Helsinki, Finland

R. Masuyama  
School of Dentistry  
Nagasaki University  
Nagasaki, Japan

**Abstract** Daidzein, a major isoflavone predominantly found in soybean, is mainly metabolized to equol and *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA) by the human gut microflora. Equol exhibits a stronger estrogenic activity than daidzein, however, only approximately 30% of the population has been identified as equol-producers and there are too few direct evidences of the effects of the other major metabolite, *O*-DMA on estrogen-deficient status. The purpose of this study is therefore, to compare the effect of both *O*-DMA and equol on bone and lipid metabolism in vivo and in vitro. For the in vivo study, 8-week-old female mice were assigned to five groups as follows: sham-operated (sham), ovariectomized (OVX), OVX + 0.5 mg/day *O*-DMA (OVX + *O*-DMA), OVX + 0.5 mg/day equol (OVX + Eq), and OVX + 0.03 µg/day 17β-estradiol (OVX + E2) administration. Three weeks after the intervention, *O*-DMA and equol did not affect uterine atrophy in OVX mice. The bone mineral density (BMD) of the femur was lower in the OVX group than in the sham group. The administration of equol but not *O*-DMA, maintained BMD through the intervention. Values of whole body fat mass and plasma lipids

were lower in the equol and *O*-DMA treated OVX mice than those in OVX mice. In the in vitro study, equol significantly inhibited the osteoclast formation induced by 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in a dose-dependent manner in a co-culture system of mouse bone-marrow cells with primary osteoblastic cells. However, *O*-DMA slightly inhibited osteoclast formation, and the effect was not dose dependent. These results suggest that the effects of *O*-DMA on bone and lipid metabolism in OVX mice and osteoclast cell cultures are weaker than those of equol.

**Key words** equol – *O*-desmethylangolensin – bone mineral density – osteoclast – microflora

**Abbreviations** BMD: Bone mineral density; BMC: Bone mineral content; E<sub>2</sub>: 17β-Estradiol; Eq: Equol; *O*-DMA: *O*-desmethylangolensin; ER: Estrogen receptor; OVX: Ovariectomized; TC: Total cholesterol; TG: Triacylglycerol; TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase; 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

## Introduction

Osteoporosis is a skeletal disorder in which bone strength is compromised by the loss of bone density and bone quality. It is the leading cause of increased morbidity and functional loss in the elderly. Particularly, postmenopausal women suffer from osteoporosis, being part of the postmenopausal syndrome [12]. Although, the one of the treatment for postmenopausal osteoporosis is hormone replacement therapy, the reported side effects, such as development of hormone dependent breast and uterine cancers [4], have prompted the use of alternative therapies. Epidemiological studies suggested that phytoestrogens [19] have preventive effects for breast cancer and menopausal symptoms [1, 28], much attention being directed to soybean, the main dietary source of isoflavones. Compared with hormone replacement therapy, the risk for side effects of isoflavone treatment seems to be low [17]. Therefore, they have been focused as alternative treatment for prevention of postmenopausal-related diseases [2, 17].

Daidzein, a major soybean isoflavone, is metabolized to *O*-DMA and equol in the gastrointestinal tract by gut microflora [2, 11]. Being structurally similar to  $E_2$ , both daidzein and their metabolites are capable to bind to the estrogen receptors, specifically to  $ER\beta$ , (although the affinity of equol seems to be greater [14, 16]).

In this line, recent studies suggest that the clinical effectiveness of isoflavones might depend on the individual's ability to produce equol [7]. However, a correlation between equol/*O*-DMA status and efficacy of isoflavones is still uncertain. Hall et al. [10] reported that soy-isoflavone-enriched foods improved biomarkers of cardiovascular disease risk independently of equol production in postmenopausal women. On the other hand, Setchell et al. [22] hypothesized that maximum clinical responses to soy protein diet were seen in equol producers. We also demonstrated that the positive effect of isoflavones on bone loss depended on the extent of equol production in postmenopausal Japanese women [26], although this was not consistent with the previous report [8]. While, Persky et al. [18] reported that changes in plasma *O*-DMA can be significantly associated with bone mineral density (BMD) in postmenopausal women. However, there was no evidence of a direct effect of *O*-DMA on bone loss in estrogen-deficient status in vivo or in vitro studies. Thus, in the present study we examined the effects of *O*-DMA and equol on bone and lipid metabolism in OVX mice and osteoclast formation in vitro in order to compare the physiological activity of *O*-DMA with that of equol.

## Materials and methods

### Animals and chemicals

Female ddY strain mice (8 weeks old) were purchased from the Shizuoka Laboratory Animal Center (SLC) (Shizuoka, Japan). The mice were housed in individual cages in a temperature- and humidity-controlled room, and were given free access to food and distilled water. Mice were sham-operated or ovariectomized (OVX) ( $n = 5$ ). Some OVX mice received a daily s.c. administration of *O*-DMA (0.5 mg/day) (synthesized at the Laboratory of Organic Chemistry, University of Helsinki [3] or equol (racemic mixture, 0.5 mg/day) (Funakoshi, Tokyo, Japan) or  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ; 0.03  $\mu$ g/day) (Sigma, St Louis, MO, USA) using a mini-osmotic pump (Alza Corp., Palo Alto, CA, USA) immediately after surgery (each group,  $n = 5$ ). The same dose of *O*-DMA and equol was used as previously reported for equol, which was effective on prevention of bone loss in OVX mice [9]. Since both *O*-DMA and equol are intestinal metabolites of daidzein, s.c. injection was adopted to ensure targeted plasma concentrations. The mice were fed on AIN-93G diet with corn oil instead of soybean oil (Funabashi Farm, Chiba, Japan) [20] for 3 weeks.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  ( $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ) was obtained from Phillips-Duphar (Amsterdam, The Netherlands). All procedures were undertaken in accordance with the National Institute of Health and Nutrition Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. In each experiment, body and uterine weight were measured, and the right femur was removed to measure BMD.

### Radiographic analysis of body composition, whole body BMD

The BMD of the entire body and body composition were measured using a PIXImus densitometer (software version 1.4x Lunar, Madison, WI). The coefficient of variation (CV) of BMD of the entire body was 6.2%. The CV for body composition measurement was 5.9% for lean body mass and 3.5% for fat mass.

### Radiographic analysis of the femur

Bone mineral density of the femur was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (model DCS-600EX-R, Aloka). BMD was calculated using the BMC of the measured area. The BMC of the mouse femur was closely correlated with its ash weight ( $r = 0.978$ ). The scanned area of the mouse femur was equally divided into three parts, i.e., the proximal femur, midshaft, and the distal femur.

### Biochemical analysis of plasma concentration

Commercially available ELISA kits for E<sub>2</sub> (IBL, Hamburg, Germany), and analytical kits for total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TG) (Wako, Osaka, Japan) were used.

### Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) for plasma *O*-DMA and equol

Plasma *O*-DMA and equol were analyzed by the TR-FIA method of Brouwers and co-workers [5] and L'homme and co-workers [15], respectively. After enzymatic hydrolysis and extraction by diethyl ether, plasma equol and *O*-DMA concentrations were determined by fluorescence using a DELFIA Victor 1420 multilabel counter (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). The final results were calculated using the following formula: final results = concentration (read) × 1/recovery × dilution factor (nmol/l). Average CV values for the analysis of the equol and *O*-DMA are 5.5 and 5.6%, respectively [5, 15].

### Osteoclast formation

Osteoclast formation was carried out by a co-culture of bone-marrow cells with primary osteoblasts according to the method of Takahashi and co-workers [24]. Briefly, bone-marrow cells obtained from the tibiae of 8 weeks ddY male mice were co-cultured with primary osteoblastic cells isolated from the calvariae of the newborn mice in  $\alpha$ MEM (phenol red-free, GIBCO, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal bovine serum (JRH, Lenexa, KS) in 24-well plate. An inducer of osteoclasts; 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (100 nmol/l); with or without equol (10–1,000 nmol/l), *O*-DMA (10–1000 nmol/l) or E<sub>2</sub> (10 nmol/l) was added to the cultures. After cultured for 6 days, the cells were fixed and stained for tartrate-resistant acid phosphatase

(TRAP) activity, which is used as a marker for the osteoclasts [24]. The fixed cells were incubated with naphthol AS-MX (Sigma) as a substrate and fast violet LB salt (Sigma) as a stain for the reaction product in the presence of 50 mM sodium tartrate (Wako, Osaka, Japan). TRAP-positive cells containing three or more nuclei were counted as osteoclast-like cells (MNC) with microscope.

### Statistical analysis

Stat view 5.0, Abacus Concepts (Calabasas, CA, USA) software was used for statistical analysis. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. The differences between groups were determined by ANOVA and Fisher's protected least-significant difference test. Means without common letter differ. A *P* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

## Results

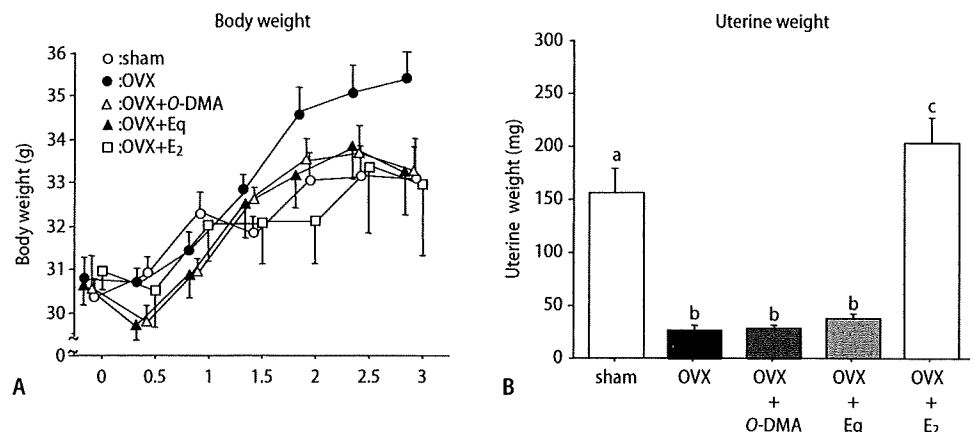
### Body and tissue weight

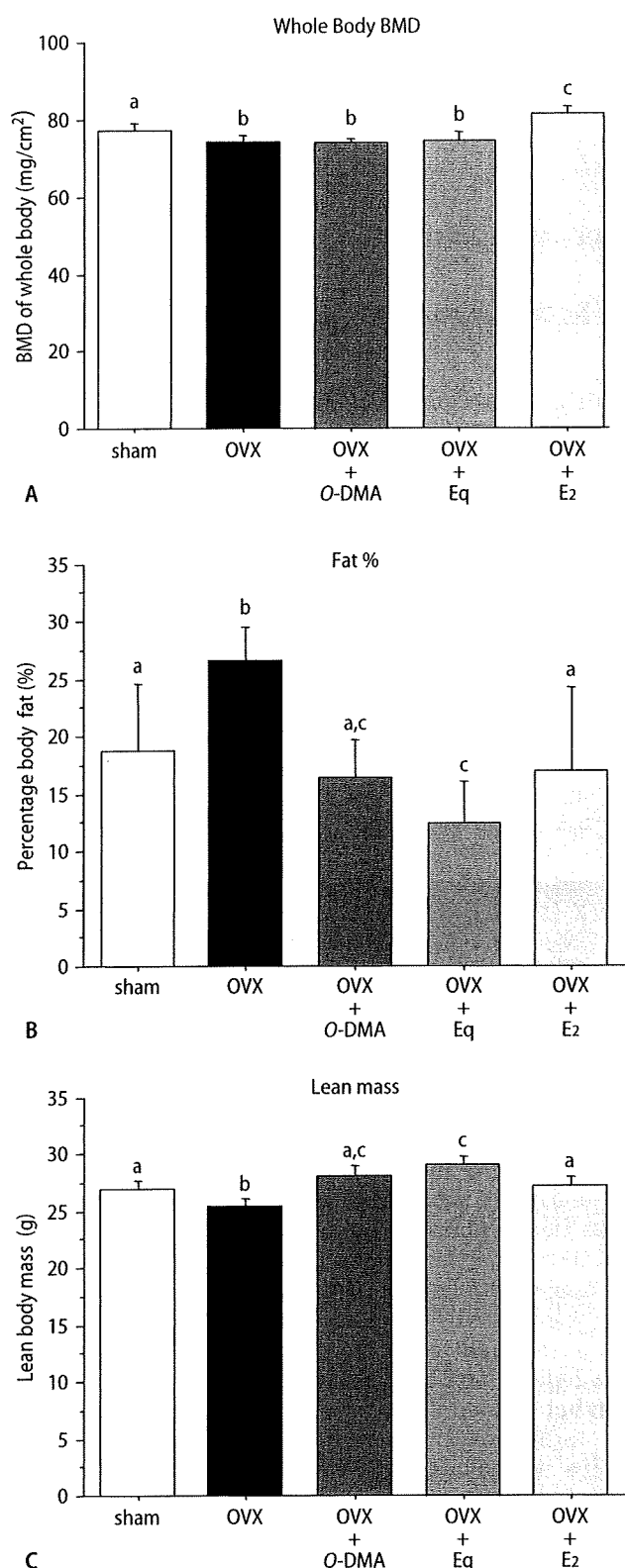
Initial and final body weights of the five groups of the mice did not differ significantly from each other (Fig. 1A). Uterine weight was lower in OVX mice than that in sham-operated mice (*P* < 0.05), whereas E<sub>2</sub> administration inhibited uterine atrophy induced by OVX (*P* < 0.05) (Fig. 1B). In contrast, treatment with *O*-DMA and equol did not affect the uterine weight in OVX mice.

### Body composition and bone mass of lumbar vertebrae

Bone mineral density of the whole body in OVX mice was significantly lower than that in sham mice (*P* < 0.05). BMD of the whole body in the E<sub>2</sub>-treated

**Fig. 1** Body weight and uterine weight of sham-operated (sham) mice, ovariectomized (OVX) mice, OVX mice treated with 0.5 mg/day *O*-DMA (OVX + *O*-DMA), or 0.5 mg/day equol (OVX + Eq), or 0.03  $\mu$ g/day E<sub>2</sub> (OVX + E<sub>2</sub>). **A** Body weight, **B** uterine weight. Values are means  $\pm$  SEM, *n* = 5 per group. Means with different letters differ significantly, *P* < 0.05





mice was greater than that in OVX mice ( $P < 0.05$ ), but the BMD of the *O*-DMA and equol-treated mice was equal to that in OVX mice (Fig. 2A). The

◀ **Fig. 2** Body composition and bone mineral density (BMD) of the whole body of sham-operated (sham) mice, OVX mice, and OVX mice treated with 0.5 mg/day *O*-DMA (OVX + *O*-DMA), or 0.5 mg/day equol (OVX + Eq), or 0.03 µg/day E<sub>2</sub> (OVX + E<sub>2</sub>) for 3 weeks. **A** BMD of the whole body, **B** body fat (%), **C** lean body mass. Values are means ± SEM,  $n = 5$  per group. Means with different letters differ significantly,  $P < 0.05$

percentage of body fat in OVX mice was significantly higher than that in sham mice ( $P < 0.05$ ), and the percentage of body fat in the E<sub>2</sub>, *O*-DMA, and equol-treated mice were significantly lower than that in OVX mice ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B). The lean body mass in the E<sub>2</sub>, *O*-DMA and equol-treated mice was significantly higher than that in the OVX mice ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2C).

#### ■ Bone mineral density of the femur

The BMD of the whole, proximal and distal femur in OVX mice were significantly lower than those in sham mice ( $P < 0.05$ ), and equol administration inhibited the bone loss in the whole, proximal, and distal femur ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3A, B, D). The BMDs of the whole, proximal, middle, and distal femur in *O*-DMA treated mice were the same as those in OVX mice. E<sub>2</sub> treatment maintained the BMD over the four regions of femur in OVX mice ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3A–D).

#### ■ Plasma concentrations of E<sub>2</sub>, *O*-DMA, equol and lipids

Plasma E<sub>2</sub> concentration was significantly lower in OVX mice than that in sham-operated mice ( $P < 0.05$ ), and *O*-DMA and equol administration did not affect the E<sub>2</sub> concentration in OVX mice (data not shown). Administration of *O*-DMA or equol increased plasma *O*-DMA or equol level in OVX mice (*O*-DMA group;  $11,864 \pm 2,071$  nmol/l of *O*-DMA, equol group;  $1,545 \pm 453$  nmol/l of equol). Plasma TC concentration tended to be higher in OVX mice than that in sham-operated mice, whereas the TC levels in equol and E<sub>2</sub>-treated OVX mice were significantly lower than that in OVX mice (Table 1). Plasma TG concentration tended to be higher in OVX mice than that in sham-operated mice, whereas the TG levels in *O*-DMA, equol and E<sub>2</sub>-treated OVX mice were significantly lower than that in OVX mice ( $P < 0.05$ ) (Table 1).

#### ■ Effects of *O*-DMA and equol on osteoclast-like cell formation

In the co-culture system employed, TRAP-positive MNC were induced by 100 nmol/l  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . The addition of 10 nmol/l E<sub>2</sub> significantly decreased the number of MNC induced by  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Equol inhibited the  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induced MNC formation in a dose-