

201083003B

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

食品の安心・安全確保推進研究事業

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 石見 佳子

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

検査機関の信頼性確保に関する研究

石見 佳子

----- 3

II. 資料

研究成果の刊行物

----- 20

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)
総合研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究代表者 石見 佳子

独立行政法人国立健康・栄養研究所

食品保健機能プログラムリーダー

本研究は、異なる複数の施設間において、分析精度を含めた分析法の妥当性と各試験機関における試験結果の信頼性の確保を行うため、様々な食品形態の食品を用い、分析値のばらつき、分析法、精度管理などに関する検討を行い、どの施設でも精度の高い結果を得るための管理法を探ることを目的とした。特別用途食品ならびに健康食品のうち、多くの栄養素を含む食品として乳児用調製粉乳を、また、利用頻度の高い機能性食品成分として、難消化性デキストリン、茶カテキン、大豆イソフラボンを選択し、食品形態の違いによる分析精度を含めた分析法の妥当性ならびに登録試験機関における試験結果の信頼性の確保を計るための室間共同試験を実施した。その結果、乳児用調製粉乳中の栄養成分である脂肪、リノール酸、 α リノレン酸、ナトリウム、塩素では良好な結果が得られた。一方、微量成分である VB_{12} は、施設間でばらつきが大きかったが、標準作業書の作成と接種菌の状態を統一することで良好な分析結果が得られた。市販のビタミンサプリメントでは、含有量の高い食品で現在の公定法では対応できないものがあることから、分析方法の改善の必要性が示された。同様に、室間共同試験でばらつきの大きかったビタミン D については、標準作業書の作成と公定法における分析方法を改良することで、粉乳中の含有量を精確に定量できることが示された。難消化性デキストリンについては、従来法では良好な室間再現性が得られたが、改良法はさらに検討する余地があることが明らかになった。茶カテキンでは、多様な健康食品に適用できる標準的な分析手法を確立することができた。大豆イソフラボンに関しては、厚生労働省により通知された方法により、概ね良好な室間再現性が得られたが、軟カプセル状の食品では抽出法を改良する必要性が示された。これらの試験に加えて、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」の改訂案を提示した。以上より、分析値の信頼性を確保するためには、分析方法を統一または改良する必要があることが示唆された。今回構築した試験機関間の精度管理体制を継続維持し、他の食品成分も含めた分析値の信頼性確保を計りたい。

食品保健機能プログラム 石見佳子
食品保健機能プログラム 山田和彦
食品保健機能プログラム 永田純一
情報センター 梅垣敬三
リサーチレジデント

(社)日本食品衛生協会(平成21年)、(財)日本公衆衛生協会(平成22年)東泉裕子
協力研究者

独立行政法人国立健康・栄養研究所
松本輝樹、竹林純、谷中かおる、鈴木春奈、
鴨下渚、勝浦 彩、町野礼、鈴木佳織、
協力研究機関

(財)日本食品分析センター、(財)日本冷凍食品検査協会、(財)食品環境検査協会、大阪市立環境科学研究所

A. 研究目的

天然物由来成分や新規食品成分を含む新開発食品が開発されているが、これら食品の分析法の妥当性ならびに精度管理に至るまでの検討はほとんど実施されていない。食品に含まれる成分の表示値の妥当性の確保は、製品の有効性及び安全性を確保する上で極めて重要であり、分析法と精度管理に関する取り組みは行政上早急に対応すべき課題である。

また健康増進法の改正に伴い、特別用途食品の許可時の試験が登録試験機関でも可能となり、各試験機関で実施する試験結果の精度管理は、安定した値を要求される許可試験では重要な問題である。しかし、各施設間の分析精度についてはこれまで検討されておらず、制度の安定した運用のためには各試験機関間で一定の評価が担保される必要がある。

本研究は、異なる複数の施設間において、分析精度を含めた分析法の妥当性と各試験機関における試験結果の信頼性の確保を行う

ため、利用頻度が高く、様々な食品形態の食品を用い分析値のばらつき、分析法、精度管理などに関する検討を行い、どの施設でも精度の高い結果を得るための管理法を探ることを目的とした。本事業を通して、適正な分析を実施するための必須条件や問題点を明確し、各登録試験機関で行われる分析精度の標準化を図る指標とすると共に登録試験機関間における精度管理のための基準策定を目指す。

なお、協力研究機関は、(財)日本食品分析センター、(財)日本冷凍食品検査協会、(財)食品環境検査協会、大阪市立環境科学研究所の4登録試験機関である。

B. 研究方法

1. 乳児用調製粉乳中の栄養素の分析精度管理

[H20 年度] 特別用途食品の許可試験において必須分析項目の栄養成分である脂肪、リノール酸、 α リノレン酸、ナトリウム、塩素、ビタミンB₁₂(VB₁₂)及びビタミンD(VD)の分析を行った。分析法は、栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第13号、平成11年4月26日通知)に従った方法を基本とし、各試験機関が実際に実施している分析法を用いた。試験結果は、平均値、表示値に対する割合、標準偏差、標準誤差及び相対標準偏差(変動係数:CV)で表し、施設間における分散と表示規格範囲との適合性を合わせて確認した(永田、山田)。

[H21 年度] H20 度実施した室間共同試験では、VB₁₂及びVDのばらつきが大きかったことから、H21年度は、両ビタミンについて、栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第13号、平成11年4月26日通知)に従った分析方法を基本として標準作

業書を作成し、VB₁₂ については接種菌の状態についても統一した。試料には、両ビタミン共、アメリカ合衆国国立標準技術研究所 (NIST) から提供されている Standard Reference Material[®] 1849 (SRM 1849, Infant/Adult Nutritional Formula) を用い、非明示試験を実施した。

試験結果は、平均値、表示値に対する割合、標準偏差及び相対標準偏差(変動係数:CV)、併行相対標準偏差 (RSD_p)で表し、施設間の分析精度の指標としては、室間再現相対標準偏差 (RSD_R)を、分析方法の妥当性の確認のための値として HORRAT 値を算出した。また、ミネラルとして栄養表示の対象となっているナトリウムを選択し、室間共同試験を実施した(石見)。

[H22 年度] H21 年度に実施した室間精度管理試験では、VD のばらつきが大きかったことから、H22 年度は、公定法の問題点を解消した改良分析法を開発し、その妥当性を室間共同試験にて確認した。含量明示の粉乳 (1 種) を用い予備試験を行い、改良法の試験手順書に不備等がないことを確認した。さらに、4 種類の粉乳を未知試料として用い、室間共同試験を実施した。報告された結果を集計し、AOAC ガイドラインを参考に精度指標を算出し定量分析法としての妥当性を判断した。

VB₁₂ については、栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第 13 号、平成 11 年 4 月 26 日通知)に従った分析法(微生物試験法)を基本として標準作業書を作成した。試料には認証標準物質であるアメリカ合衆国国立標準技術研究所 (NIST) から提供されている Standard Reference Material[®] 3280 (SRM 3280, Multivitamin/ Multielement Tablets, 検体 A)及び含有量の異なる市販の

ビタミンサプリメント 4 種 (検体 B-E) を用いた。試験結果は、平均値、表示値に対する割合、標準偏差及び相対標準偏差(変動係数:CV)、併行相対標準偏差 (RSD_p)で表し、施設間の分析精度の指標としては、室間再現相対標準偏差 (RSD_R)を、分析方法の妥当性の確認のための値として HORRAT 値 (許容範囲 0.5-2.0)を算出した(石見)。

2. 難消化性デキストリンの分析精度管理(永田)

[H21 年度] 難消化性デキストリンについて、緩衝作用に優れた MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)/Tris-(2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) Buffer を用い pH の調製を行わない酵素反応と市販カートリッジカラムを用いた脱塩操作を組み合わせた簡便、迅速で精度の高い分析法の確立を試みるため、難消化性デキストリンを含む食品を用いて、従来用いられている分析方法による分析値との比較検討を行った。また、新たな方法で処理した内部標準物質及び難消化性デキストリン標準品の直線性あるいは検出感度に関する試験を実施し、分析精度に関する検討を行った。

[H22 年度] 難消化性デキストリンについて、H21 年度に改良した、簡便、迅速な分析法を用いて、室間共同試験を実施し、従来法との比較を行なった。検体は、添加された難消化性デキストリンの規格値が明らかな粉末及び液体試料を各試験機関に配布した。分析は非明示で、分析回数をいずれの検体も 3 回に統一して実施した。

3. 茶カテキンの分析精度管理(梅垣)

[H20 年度] 市販の緑茶飲料 2 種類、牛乳、清

涼飲料水(抹茶ミルク)を試験試料とし分析を実施した。移動相が異なる2つのUV法とEC法を用いて分析を行い、結果を比較検討した。脂質を含む食品に添加されたカテキン類の定量方法の検討は、酸または有機溶媒の添加、加熱などの操作を行い、牛乳中に含まれる茶カテキンの遊離及び除タンパク、さらに固相抽出などによりHPLC測定用の試料を調製した。[H21年度]茶カテキン飲料中のカテキン類の分析法の妥当性や実施における問題点について、5機関(HPLC-UV法5機関、HPLC-ECD法4機関)で検討した。各試験機関に緑茶飲料のモデルと8種の標準品混合物を配布し、定性試験、検出限界、検体中の茶カテキン量、規格化された緑茶抽出物を用いた添加回収率の算出、ピークの分離が問題となった場合の分離度・分離係数の比較を行った。

[H22年度]茶カテキンについて、ECD-HPLC法及びUV-HPLC法を用いて、21種類のサプリメントを対象に定量分析を行った。茶カテキン類標準品は(C、EC、GC、EGC、EGCg、Cg、ECg、GCg)栗田工業社製を使用した。錠剤・カプセル状のいわゆるサプリメントはインターネットで21種類を購入した。HPLC-ECD法では、クーロメトリック検出器(esa Coulochem II)を装着したHPLCシステムを用いた。UV法ではUV-VIS検出器(230nm、島津SPD-10)を装着したHPLCシステムを用いた。

4.大豆イソフラボンの分析精度管理(石見)

[H20年度]食品形態の違が大豆イソフラボンの分析結果に及ぼす影響を評価するため、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)」の方法に基づき定量分析を実施した。液状食品、固体状及びペースト状の食品、カプセル状食品は、食品形態に適した前処理による適正な分析を試みた

[H21年度]大豆イソフラボンの分析方法の妥当性を確認することを目的として、厚生労働省が通知した方法(食安発第0823001号)に基づき、5機関による室間共同試験を実施した。マトリックスとしては、液状及び粉末を選択し、各々3濃度の検体を調製して試験機関に配布し、非明示試験を実施した。また、15種類の標準物質も各機関に配布した。

[H22年度]形態の異なる「健康食品」中の大豆イソフラボンの施設間の分析精度を確認することを目的として、厚生労働省が通知した方法(食安発第0823001号)に基づき、室間試験を実施した。健康食品としては、固体状、液状及び粉末食品を選択し、分析は非明示で、各々3検体ずつ実施した。

5. 栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第13号)改訂に関するとりまとめについて

[H20年度]栄養表示基準に関わる分析法について、登録試験機関によるアンケート調査を基に、栄養表示基準に関わる分析方法を検証し、分析操作・条件の記載の中でその表現が固定的な場合、指定された操作・条件単独では適切な対応が難しい場合の方法について、フレキシブルに対応可能とするための改良を行なった。

[H21年度]平成21年度の特別用途食品制度改正並びに種々の要因を踏まえて、平成20年度の改訂案に必要な箇所を追加した。

C. 研究結果

1. 乳児用調製粉乳中の栄養成分の分析精度管理

平成 20 年度は登録試験機関間における分析値のばらつき及び各試験室の分析精度を確認するため、乳児用調製粉乳を用いた試験を行った。各機関で通常分析を行っている試験法に従って、分析を実施したところ、脂質、リノール酸、 α リノレン酸、ナトリウム、塩素については良好な結果が得られたが、ビタミン B₁₂ (VB₁₂) 及びビタミン D (VD) については試験機関間の変動が大きいことが明らかとなった。

平成 21 年度は、各試験機関で通常用いられている VB₁₂ 及び VD 分析法の細部が異なることから、公定法に準じた方法に統一して標準作業書を作成し、非明示で配布した粉乳中の VB₁₂ 及び VD 含量の測定を行った。その結果、VB₁₂ では、検体に含まれる VB₁₂ を非明示にしたにも拘らず、併行再現性(RSD_r=6.7)及び室間再現性(RSD_R=9.4)ともに良好な結果が得られた。平成 22 年度の VB₁₂ の分析では、市販のビタミンサプリメント 4 種は各試験機関の結果において表示値と同等かわずかに高い値を示した。しかし、検体 C において一部の機関で表示値の誤差の許容範囲を逸脱するものがあった。また、検体 D は、全機関で表示値の誤差の許容範囲よりも低い結果が得られた。併行相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)を求めたところ、前年度よりも悪化したことが明らかとなった。また、HORRAT 値は、検体 A 及び E は AOAC の規定する範囲(0.5-2.0)に収まっていたが、検体 B、C 及び D は範囲を超えており、本検討において何らかの問題があることが示された。

H20 年度に実施した VD の室間共同試験では、各登録試験機関が採用している VD 分析

標準作業書の詳細を比較した結果、食品サンプルの採取→けん化→分取 HPLC (逆相)→分析 HPLC (順相) という分析概要は一致していたが、試験方法の細部においては種々の差異が認められた。これらの結果を基に、公定法に準じた試験手順書を作成した。粉乳 (SRM 1849) を各試験機関に非明示で配付し、3 連の測定を、日を違えて 3 回 (計 9 回) 行うよう依頼した。その結果、各試験室での分析値の日内変動の平均値は 1.9 - 13.9 % であった。また、3 試験機関で得られた分析値は NIST による粉乳 (SRM 1849) の認証値の範囲内であったが、2 試験機関で得られた分析値は一部認証範囲外であった。公定法に準じた VD 分析では試験機関によっては精確な分析ができなかった原因として、分取 HPLC (逆相) サンプル調製時の不溶物の影響が疑われた。そのため、平成 22 年度は、分取 HPLC を順相で、分析 HPLC を逆相で行う改良を加えた。室間共同予備試験の結果、改善法では分析値の日内変動が 0.5 - 2.4 % と顕著な改善が認められた。室間共同本試験の結果、4 種の粉乳中 VD 含量分析値について、室内変動の指標である併行分析相対標準偏差 (RSD_r) は 2.6 - 10.3 % であり、室間変動の指標である室間再現性相対標準偏差 (RSD_R) は 4.0 - 18.9 % であった。また、定量分析法の性能指標である HORRAT は、各試料について 0.18 - 0.97 の範囲であった。

ナトリウムの室間共同試験では、併行再現性に関しては許容誤差範囲内の結果が得られたが (RSD_r =1.9)、1 機関が異なる分析方法を用いていたため、室間再現性では許容範囲を超えていた (RSD_R=10.3)。

2. 難消化性デキストリンの分析精度管理

平成 21 年度は、難消化性デキストリンの分析法について検討した。難消化性デキストリンの従来の分析法は、酵素による加水分解を行う際に至適 pH への調整やイオン交換用カラムクロマトを用いた脱塩処理が必要であったが、今回使用した酵素とバッファーは、pH の調整を必要としないことで操作時間の短縮と酵素反応の操作性が著しく向上した。この酵素を用いた酵素-重量法による食物繊維の分析が Kanaya らによって示され、再現性が高い酵素処理が可能であることを明らかにしている。すなわち今回使用した酵素によって食物繊維分析における酵素加水分解が良好に行われることが示されている。また、市販のカートリッジカラムを使用することで、カラム処理にかかる時間も短縮され溶媒も少量(200ml から 10ml にスケールダウン)で処理が可能となった。一方、分析結果は、従来の方法で分析を行った値は理論値に対して 101%であったのに対し、新たに用いた方法では、133%と高い値を示した。これらの結果から、今回我々が示した難消化性デキストリンの分析法は、従来法と比較しても十分な検出感度を示し、再現性に優れた良好な分析法であることが示されたが、理論値との乖離を抑える検討が必要と考えられた。

平成 22 年度は、添加された難消化性デキストリンの規格値が明らかな粉末及び液体試料を各試験機関に配布し、従来の難消化性デキストリン分析法(従来法)と今回改良を行った方法(改良法)を用いて室間共同試験を実施した。従来法と比較して改良法は、いずれの試験機関においても操作性の簡便化と分析時間の短縮を認めたが、施設内における分析値のばらつきと施設間分析精度において理論値に対する乖離(HORRAT: 粉末食品=9.68、液状食品=13.2)を示した。

3. 茶カテキンの分析精度管理

平成 20 年度に実施した茶カテキンの分析法の比較では、EC 検出-HPLC 法は UV 検出-HPLC 法よりも特異的かつ高感度に茶カテキンの個別成分を分析することができ、固相抽出を組み合わせることで油脂や乳製品の分析にも適用できる簡便な方法であることが明らかになった。

平成 21 年度は、これらの分析方法を用いて茶カテキンの室間共同試験を実施した。その結果、検討した HPLC-UV 法の 1 つ(検出波長: 230nm)が優れていること(併行再現性 $RSD_r=5.0$ 、室間再現性 $RSD_R=6.6$ 、HORRAT 値=1.1)、また、夾雑物が多く、含有量が微量である飲料の分析には、高感度で特異性の高い HPLC-ECD 法が適していることが示された。

平成 22 年度は、市販サプリメント 21 種類についてカテキン類の抽出条件を設定し分析したところ、HPLC-ECD 法に比べて HPLC-UV(230nm)法では測定値がやや高くなる傾向が認められたが、総カテキン含量の測定値はほとんど差異がなかった。21 製品中で製品に茶カテキン量の表示があったのは 13 検体であり、その中の 10 検体の測定値は表示値よりも低かった。本試験により、2つの分析法は飲料形態だけでなく、錠剤・カプセル状の製品の分析にも適用できること、HPLC-UV 法に比べて HPLC-ECD 法は機器の汎用性に難点があるがカテキンに対する特異性と感度が高いことが明らかになった。

4. 大豆イソフラボンの分析精度管理

平成 20 年度は、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。一方、固体状食品のうち、錠剤型及びカプセル型食品では良好な結果が得られたが、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。表示との関連では、21品目のうち、液剤型食品1品目、錠剤型食品1品目で、分析値が表示値よりも低かった。

一方、アグリコン当量を求めるためモル濃度換算による以下の計算式を提案した。

$$T_{D_e} = TA_{D_e} / A_D \times MC_D \times M_{D_e}$$

T_{D_e} : ダイゼイン型アグリコン当量 mg/L

TA_{D_e} : ダイゼイン型イソフラボンのピーク面積の総和

A_D : 標準液ダイゼインのピーク面積

MC_D : 標準液ダイゼインのモル濃度

M_{D_e} : 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。

平成 21 年度は、分析方法の妥当性を確認するため、液状及び粉末状の 2 種のマトリックスを用いた大豆イソフラボンの室間共同試験を実施した。その結果、液状食品では併行再現性(RSD_r)、室間再現性(RSD_R)ともに良好であり、HORRAT 値も 0.5 付近であった。一方、粉末状食品では HORRAT 値が、濃度によっては許容範囲上限の 2 を越えていた。平成 22 年度は、種々の形態の「健康食品」を対象として、室間共同試験を実施した。固体状食品、液状食品、粉末状食品、何れの検体における変動係数(CV 値)は 5%未満であった。また、各検体における併行再現性(RSD_r)、室間再現

性(RSD_R)ともに 5%以下であり、良好な結果が得られた。分析方法の妥当性の指標となる HORRAT 値は、固体状食品 0.80、液状食品 0.35、粉末状食品 1.02 であった。これにより、厚生労働省により通知された大豆イソフラボンの分析方法は、液状、粉末状、錠剤型の「健康食品」に適用できることが明らかになった。

5. 栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第 13 号)改訂に関するとりまとめについて

平成 20 年度は、以下の背景から栄養表示基準に関わる分析法の改訂案を検討し、班会議にて提案・検討後、登録試験機関内でのアンケート調査を行った。アンケート結果を踏まえてこれらの内容は平成 20 年度厚生労働科学研究報告書中に別表として改訂箇所の詳細及びその理由を取りまとめた。

<平成 20 年度時点における栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第 13 号)改訂の背景と概要>

- ① 分析操作・条件の記載の中でその表現が固定的な場合、指定された操作・条件単独では適切な対応が難しい場合があるため、これをフレキシブルに対応可能とする。
- ② 新規の技術、知見、機器、器具、操作等について追加が望ましい場合に対応する。
- ③ 記載中に現状との齟齬が生じている場合に対応する。
- ④ その他現状で必要と思われる方法(テオブロミン、カフェインなど含窒素成分の件、アミノ酸分析法、塩素分析法等)。

平成 21 年度は、下記の項目について新たに検討し、加筆した。

- ① 特別用途食品制度改正に関してヨウ素、セレン、クロム、モリブデン(新規)に ICP/MS 法の導入を提案した。また、不飽和脂肪酸について飽和脂肪酸分析法が準用可能と追記した。さらにイノシトールについて新たに分析法を追

記した。

②葉酸の試薬(分解酵素)製造中止に対応して、ブタ腎臓由来酵素を含めて選択肢を広げた。

③ガムの抽出液の調製法について定めた。

④加工食品のマトリックスのバリエーション等により、規定の操作手順を変更する場合の確認方法について示した。

⑤乳製品等で低級脂肪酸を抽出する方法としてクロロホルムメタノール法を追記した。

⑥炭水化物への影響を除くため、タンニンの分析法を追加した。

⑦たんぱく質について自動化装置の条件をわかりやすくした。

これらの内容は平成 21 年度厚生労働科学研究報告書中に別表として改訂箇所の詳細及びその理由を取りまとめた。

登録試験機関のひとつである、日本食品分析センターによる平成 20 年度及び 21 年度に提案した栄養表示基準の改定分析方法で得られたデータの検証では、ビタミン類、ミネラル類、脂肪酸類、糖類、有機酸において、分析方法の妥当性が確認された。

D. 考察

本研究では、分析精度を含めた栄養表示基準に関わる分析法の妥当性と各試験機関における試験結果の信頼性の確保のため、消費者の利用頻度が高い機能性食品素材を用いた食品を選び、食品形態の相違による分析値のばらつき、分析法、精度管理などについて検討を行った。

1. 乳児用調製粉乳中の栄養成分の分析精度管理

栄養成分を多く含む乳児用調製粉乳の分析では、初年度においてVB₁₂及びVD等の微量成分分析でのばらつきの改善と施設間における分布の収束のために、方法の見直しで対

応可能か否かが検討課題となった。そこで、平成 21 年度では、VB₁₂及びVD分析法について、先ず公定法に準じた方法に統一して標準作業書を作成し、室間共同試験を実施した。微生物定量法を用いるVB₁₂においては、標準作業書の作成と接種菌の状態を統一することで乳児用調製粉乳では良好な分析結果が得られることが明らかになったが、通常業務において各試験機関で保管している菌の状態を確認するための判断基準が必要であると考えられた。一方、市販の「健康食品」のうち、特にVB₁₂含有量の高い食品については抽出法を改良する必要があることが明らかになった。一方、このような健康食品では、微生物定量法よりもHPLC法の再現性が高いことが明らかとなった。

ビタミンDの分析では、標準作業書を作成しても試験機関によっては結果がばらついた。公定法に準じて統一した分析法では、分取HPLCを逆相で行うため、試験溶液作成時に低極性の不けん化物が不溶物となる。満足な結果が得られなかった2つの試験機関では、分取HPLC用試験溶液調整時にこの不溶物の影響によりVDの再溶解が不完全であった可能性が考えられた。また、これら2つの試験機関でも、分析値の日内再現性は日間再現性と比較すると良好であり、日を違えた分析を複数回行わないと不正確な分析値が得られてもそれに気付けない可能性が示唆された。分取HPLCを順相で行う改良法は、公定法に準じたVD分析法と比較して、分取HPLC用試験溶液調整時の不溶物が大きく減少しており、分析値の日内再現性が大きく向上していた。非明示の4種の粉乳を用いた改良法の室間共同試験では、定量分析法の性能指標であるHORRATは、各試料について0.18

- 0.97 の範囲であり、AOAC ガイドラインの妥当性判断基準 ($HORRAT \leq 2$) を満たしていた。従って、改良法は粉乳中の VD 含量を精確に定量できることが示された。

VD 及び VB_{12} は他の栄養成分と比較して含量が極めて微量である。このような微量成分の分析においては工夫が必要であり、特に繰り返し分析を行って結果を平均すること及び分析方法の改良が必要であると考察された。

以上より、乳児用調製粉乳中の微量成分の分析は、標準作業書を作成すること及び分析法を改良することで精度管理が可能であることが明らかとなった。

2. 難消化性デキストリンの分析精度管理

難消化性デキストリンの分析では、従来の方法で分析を行った分析値は理論値に対して 101%であったのに対し、新たに用いた方法では、133%と高い値を示したことから、改良した難消化性デキストリンの分析方法は、従来法と比較しても十分な検出感度を示し、再現性に優れた良好な分析法であることが示されたが、理論値との乖離を抑える検討が必要と考えられた。改良法では、操作性の向上や分析時間の短縮は、従来の方法より著しく改善されたが、室間共同試験では、各施設内及び施設間における改良法による分析値のばらつきが認められた。今回の試験で最も定量値に与えた要因として酵素中に含まれるグリセロールが各試験機関から指摘されている。今回の分析では、ブランク値を差し引いて対応したが、グリセロールのピーク面積に及ぼす影響を完全に補正することが困難であった。今回用いた改良法では、酵素溶液中に存在するグリセロールが、内部標準物質として用いるグリセロールに混入し、定量値に影響を及ぼす可能性が高い

ことから、今後は、外部標準法による定量分析の検討が不可欠と考えられた。

3. 茶カテキンの分析精度管理

茶カテキンの分析法は、EC 検出-HPLC 法は従来の UV 検出-HPLC 法に比べて特異性が高く、高感度であり、茶カテキンの個別成分の分析に適していることが明らかになった。試料の調製もアセトニトリル処理は酸処理と比較して良好な結果が得られることが示された。油脂や乳製品を分析する場合も、固相抽出による EC 検出-HPLC 分析が適することが明らかになった。本研究の EC 検出-HPLC 法は、簡便かつ高精度であり、特定保健用食品を含めた多様な食品に添加された茶カテキンの分析に適しており、精度が高い分析の可能性が示唆された。

室間共同試験では、ECD 法は UV 法と比較すると、併行再現性 ($RSD_p, \%$)、室間再現性 ($RSD_R, \%$)、 $HORRAT$ 値が大きかった。この要因として、検出器が不安定なことが考えられる。ECD 検出器は、感度・特異性が高いためカテキン類の分析には有用であるが、安定しにくいという難点があり、良好な室間再現性が得られなかったと考えられる。一方で UV 法 (230nm 検出) では、両方の検体で $HORRAT$ 値が 1.5 以下となり、良好な室間再現性が得られた。

健康食品を対象とした茶カテキンの分析法の検討では、UV 検出器の汎用性を考慮すると、一般的な測定法としては HPLC-UV 法で十分に対応できること、HPLC-ECD 法は夾雑物の多い製品について、確認として利用することが適切であると考えられた。表示値との比較では、表示値より測定値が低い検体が約半数あった。この原因は定かではないが、製品の製造過程で正しく添加されていないことが

可能性、流通やその後の保存状態におけるカテキン類の分解などの可能性も考えられる。ただし、一部の製品を除けば、表示値は分析値の約70-120%の範囲になっていた。今回検討した試料からの抽出条件や分析法は、製品の製造管理、ならびに市場に流通している製品の表示の妥当性の評価、さらに製品の安全性・有効性の評価に役立つと考えられる。

4.大豆イソフラボンの分析精度管理

形態の違いによる大豆イソフラボンの分析法の妥当性の検討では、軟カプセル型の健康食品で、食品形態に対応した新たな前処理が必要であることが明らかになった。また、モル濃度換算による簡便な算出式により、一層正確な分析値の提供が可能となることを提案した。分析法の妥当性を確認するための大豆イソフラボンの室間共同試験では、液状食品では併行再現性(RSD_p)、室間再現性(RSD_R)ともに良好であったが、粉末状食品では HORRAT 値が、高濃度で2を越えていた。この要因として、液状食品に比べて粉末食品では、試料採取時に誤差が生じること、抽出操作の影響を受けること等が考えられた。「健康食品」を対象とした大豆イソフラボンの室間共同試験では、液状食品について併行再現性(RSD_p)、室間再現性(RSD_R)は何れも5%未満と良好な値を示した。液状食品における分析精度を示す指標が、昨年度の本研究と同様、良好な値が得られたことから、通知の方法により、健康食品についても、液状食品の室間分析精度が高いことが検証された。粉末状食品では、室間再現性(RSD_R)で5.00であったものの、併行再現性(RSD_p)は0.99と良好な値を示した。平成21年度と22年度の試験で用いた粉末検体を比較すると、21年度の粉末食品の含有量が高い。

このことより、粉末食品については、含有量が高い場合にばらつくことが考えられる。VB₁₂の場合と同様、食品中の含有量が高い場合に、抽出効率を考慮する必要があると考えられた。

5. 栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について(衛新第13号)改訂に関するとりまとめについて

本研究では、栄養表示基準に関わる分析法の改訂案を検討する目的で、登録試験機関内でのアンケート調査を行った後、アンケート結果を踏まえて、改訂箇所の詳細及びその理由を取りまとめた(平成21年度総括・分担研究報告書)。また、特別用途食品制度改正により新たに分析が必要となった栄養成分について、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」に記載されていない成分及び現行法では対応できない栄養成分の分析法を確立し、妥当性を確認した。これらの研究により、特別用途食品制度改正により新たに分析が必要となった栄養成分である多価不飽和脂肪酸、モリブデン、ビタミンKについては、さらなる分析精度管理が必要であることが明らかとなった。

E. 結論

本研究を通じて、各試験機関が通常行っている分析手法では、測定項目によっては各研究機関間で分析値のばらつきがあり、分析値の信頼性を確保するためには、分析方法を統一または改良することにより分析精度を高める必要があることが示唆された。今回個別に検討を行った脂肪、リノール酸、 α リノレン酸、ナトリウム、塩素、VB₁₂、VD、難消化性デキストリン、茶カテキン、大豆イソフラボンについては、各試験機関で同等な分析値を得る方法を見出すことができた。本研究により、登録試験機関間の分析精度管理のための基盤が確立さ

れたとともに、今後の検査機関の信頼性の確保ならびに食品の安心・安全確保につながると考えられた。

今回構築した試験機関間の精度管理体制は今後も引き続き維持し、他の食品成分も含めた分析値の信頼性確保を計りたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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, Wu J. et al. 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* 67:49-57, 2009
6. Taku k, Melby M, Takebayashi J, Mizuno S, Ishimi Y. et al. Effect of soy isoflavone extract supplements on bone mineral density in menopausal women:

meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr*19:33-42, 2010.

7. 谷中かおる, 東泉裕子, 松本輝樹, 竹林純, 卓興鋼, 山田和彦, 石見佳子. 「健康食品」中の大豆たんぱく質及び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* 68:234-241, 2010
 8. Ishimi Y. Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice. *J Nutr* 140: 1373S-1376S, 2010
 9. Taku K, Melby M, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S, Ishimi Y. Effect of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone* 47: 413-423, 2010
 10. Taku K, Lin N, Cai D, Hu J, Zhao X, Zhang Y, Wang P, Melby MK, Hooper L, Kurzer MS, Mizuno S, Ishimi Y, Watanabe S. Effects of soy isoflavone extract supplements on blood pressure in adult humans: systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *J Hypertens* 28:1971-82, 2010
 11. 石見佳子. イソフラボン *New Diet Therapy* 26(4): 33-36, 2011
- ### 2. 学会発表
1. 谷中かおる, 東泉裕子, 松本輝樹, 竹林純, 卓興鋼, 山田和彦, 石見佳子. 「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量と表示に関する研究. 第 57 回日本栄養改善学会(東京) 平成 22 年 9 月 11 日
 2. 梅垣敬三 ポリフェノールの安全性確保. ポリフェノール学会(新座市) 平成 22 年 8 月 6 日
 3. 梅垣敬三 植物成分を利用した健康食品の現状と問題点. 第 18 回天然薬物の開発と

応用シンポジウム(東京) 平成 22 年 11 月
11 日

4. 鈴木佳織、佐々木菜穂、石見佳子、梅垣敬三。飲料ならびに健康食品に含まれる茶カテキン類の分析方法について-電気化学検出-HPLC法とUV検出-HPLC法の比較-第 65 回日本栄養・食糧学会(東京) 平成 23 年 5 月 15 日
5. 松本輝樹、鈴木春奈、谷中かおる、石見佳子。室間共同試験による食品中ビタミン B₁₂ 測定法の分析精度について。第17回日本食品化学学会(東京) 平成 23 年 5 月 20 日

G. 健康危険情報

特になし

H. 知的所有権の取得状況

特になし

本研究の目的

特別用途食品に含まれる栄養成分あるいは特定保健用食品の関与成分の分析は、食品の安全性と有用性を保証する上で極めて重要であり、各登録試験機関間における分析法の標準化と精度管理に関する取り組みは行政上早急に対応すべき課題である。

複数の施設で分析を行った場合でも、一定の結果を得るために必要な精度管理手法を探るとともに分析方法の充実を図る。

健栄研+4登録試験機関

「健康食品」の安心安全確保

研究が必要となる背景

特別用途食品の許可試験

従来(独)国立健康・栄養研究所が法定業務として行ってきた。

健康増進法の改正(H15年改正)

登録試験機関においても特別用途食品の許可試験を行うことが可能となった。

現在登録されている5試験機関

〔 大阪市立環境科学研究所 (財)日本冷凍食品検査協会 平成21年8月より
(財)日本食品分析センター (財)食品環境検査協会 (財)食品分析開発センター 〕

問題点

各施設は独立した事業体であり、運営等は一定の要件が求められ個別に管理運営が行われている。しかし各施設間相互における分析精度管理に関する検討はこれまで行われていない。

食品中ビタミンB₁₂ 分析の空間分析精度管理

食品含有量は極わずか (≒ 20 ppb)

微生物学的定量法は、分析精度に難あり

公定法 → 標準作業書 (SOP, 自由度の高い記述の規制, 操作を詳細に記述)

	分析法	n 数	形状	形態, 含有量 (μg/ g)	% value	CV	RSD _r	RSD _R	HORRAT	
1st	公定法	3~72	粉ミルク	市販品, 0.02	88.0 ~ 125.9	12.4	14.2	16.0	0.6	
2nd	SOP: 株・希釈・ 試薬の統一 (blind)	3	粉ミルク	認証標準物質 (CRM), 0.04	99.0 ~ 101.5	5.3	6.1	9.4	0.4	
3rd	SOP: 希釈範囲 の制限 (blind)	2	ビタミン タブレット	CRM	マルチビタミン &ミネラル, 4.9	87.6 ~ 130.6	5.5	8.8	17.5	1.4
				市販品	B ₁₂ のみ, 166.7	83.9 ~ 150.0	10.1	11.8	16.5	2.3
					VB複合体, 42.9	73.3 ~ 125.9	10.5	20.5	21.7	2.4
					マルチビタミン, 3.1	15.3 ~ 74.1	18.9	22.7	42.0	2.8
マルチビタミン &ミネラル, 1.7	84.8 ~ 138.2	11.4	14.7	17.6	1.2					

公定法に対して、より詳細な操作法を記載することにより、分析精度は向上する
要求株の状態によって、分析値は変化する可能性がある。

食品中ビタミン D 分析の空間分析精度管理

【1 年目 現状把握】 粉乳中 VD 測定値には、試験機関間で大きなばらつきがある

【2 年目 公定法に準じた方法で標準化】

各機関の分析
方法に差異

公定法に準じた
方法に統一

機関によっては
精度が悪い

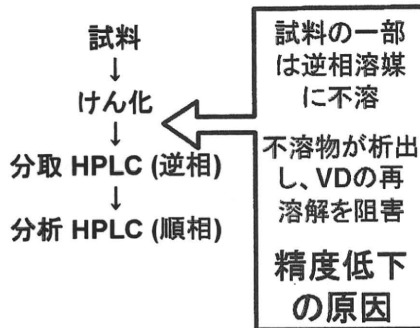


表 1. 改良法の予備試験結果

日内再現性の改善 (n=3, RSD (%))

機関	公定法	改良法
A	1.9	1.8
B	13.6	1.9
C	2.8	2.3
D	4.4	0.5
E	9.3	2.4

(2 年目) 検体: SRM (粉乳) (3 年目予備試験) 検体: 乳児用調製粉乳

【3 年目 分析方法の改良・妥当性確認】

不溶物を減らす
方法に改善

予備試験で
精度向上を
確認 (表 1)

空間共同試験で
妥当性を確認 (表 2)

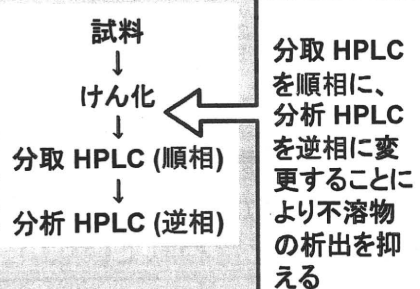


表 2. 改良法の妥当性確認試験

	粉乳 1	粉乳 2	粉乳 3	粉乳 4
平均値 (μg/100 g)	7.91	9.24	10.2	26.3
併行相対標準偏差 RSD _r (%)	10.7	2.6	2.8	10.3
空間再現性相対標準偏差 RSD _R (%)	10.7	4.6	4.0	18.9
HorRat	0.46	0.20	0.18	0.97

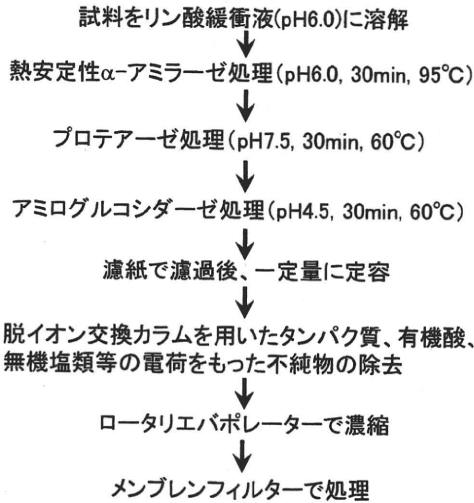
HorRat: 空間再現性相対標準偏差の実測値と経験則の比率

▽ 0.5 ~ 2.0 だとその分析法は妥当と判断 (AOAC)

▽ 粉乳 1 ~ 3 は夾雑ピークが全く認められず、経験則より高精度で分析できた
検体: 粉乳 1 ~ 3 = 乳児用調製粉乳, 粉乳 4 = 妊産婦・授乳婦用粉乳

難消化性デキストリンの空間分析精度管理

難消化性デキストリン従来の分析法



改良点①
酵素処理でのpHの再調整が必要な為、操作が煩雑

(大和化成社製)
熱安定性α-アミラーゼ(pH6.3) MES/Tris緩衝液(pH6.3)
プロテアーゼ(pH6.3)
アミログルコシダーゼ(pH6.3)

改良点②
充填カラムを用いた脱イオン交換は処理量が多く、作業に時間と手間が非常にかかり酵素処理に次いで律速となる。

市販のカートリッジカラムを使用

HPLC分析

難消化性デキストリンの空間共同試験結果

	粉末状食品		液状食品	
	従来法	改良法	従来法	改良法
併行再現性 (RSDr%)	2.60	19.40	0.60	27.18
室間再現性 (RSDR%)	5.82	27.35	3.85	47.19
HORRAT値	2.15	22.68	0.16	1.97

健康食品中の茶カテキン類の分析精度管理

主要カテキン
EGCgの
検出限界
(ng/mL)

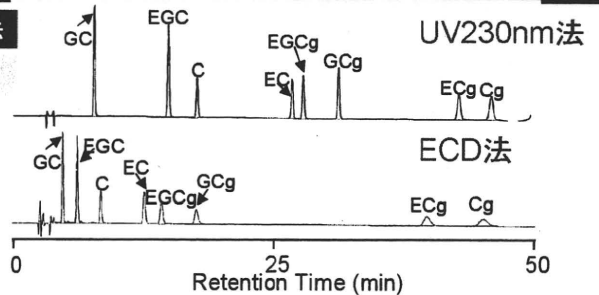
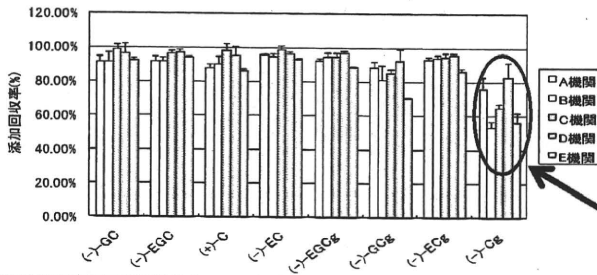
UV280nm検出法 UV230nm検出法 ECD検出法

50~300

25~100

0.01~5

例 UV230nm法(検体A)



保持時間が長く、含有量の少ない
Cgでは機関の変動が大きい

5機関による共同試験結果

- 定性試験: いずれの方法でも、CV(%)が1%以下
- 感度: ECD検出法 < UV230nm検出法 < UV280nm検出法
- 添加回収率: 特にCgのばらつきが大きい(特にECD(アンペロメトリック)法)
- 緑茶飲料中の茶カテキン量: HORRAT値がECD法でのみ許容範囲を越した。
- ECとEGCgの分離: UV280nm法でのみ完全分離が達成されていない機関があった。
- 利用機器: ECDが実際に稼働していない機関もあり、ECD法は実用性に問題があった。

健康食品(錠剤・カプセル状)21製品中の茶カテキン類の抽出と分析

・分析値にUV230nm法とECD法で差異はない。

→ UV230nm検出法が適しており、この方法が統一した方法になりうる。
また、微量で夾雑物が多い場合はECD検出法も有効と考えられる。

健康食品中の大豆イソフラボンの分析精度管理

□「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 (20年度)

	分析方法	品目数	検体	表示品目数	% value	CV(%)
H20	通知法	計21	液状	7	81~122	0.7~9.6
			粉末状	9	88~275	0.4~9.1
			固形状	5	82~102	3.0~6.5
				15/21		

□ 5機関による室間共同試験(21~22年度)

	分析方法	n数	検体	表示値 (アグリコン 等量 μg/g)	% value	CV (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	HORRAT
H21	通知法	9 (blind)	液状	75	99.7~107.1	4.1	2.50	4.41	0.53~0.63
				150	94.7~104.9	4.4	1.39	4.73	
				175	92.7~100.8	3.9	0.88	4.24	
		9 (blind)	粉末	3125	82.1~95.7	9.5	9.44	9.57	2.01~3.13
				15625	78.6~91.6	10.6	10.23	10.72	
				31250	82.1~92.5	10.6	11.34	10.53	
H22	通知法	3 (blind)	液状	130	184.5~194.6	0.9~1.9	0.54	1.13	1.04
		3 (blind)	健康食品 粉末	表示なし	—	0.4~1.4	0.54	1.09	0.35
		3 (blind)	固形	100000	102.7~107.5	0.4~2.4	0.37	0.59	0.80

共同試験結果から、厚生労働省の通知した分析方法は、液状食品、固形状食品に概ね適していると考えられる。濃度の高い粉末状食品のHORRAT値がやや高い値を示したことから、分析精度向上のためのより詳細な操作法等について検討する必要があると考えられた。

検査機関の信頼性確保に関する研究まとめ

H20年度

ビタミン、
ミネラル、脂質
公定法

室間共同試験
乳児用調製粉乳

大豆イソフラボン
厚生労働省通知

UV-HPLC法
食品形態の違いによる
分析法の検討

茶カテキン
公定法なし

ECD-HPLC法
の開発

H21年度

分析方法の検証・統一
室間共同試験
VDばらつきあり
VB12良好な結果

液状・粉末状食品
室間共同試験
良好な結果

UV検出-HPLC法
ECD検出-HPLC法
室間共同試験
UV2法が適切

難消化性
デキストリン
公定法なし

分析法の改良

H22年度

VB12室間共同試験

VDは分析法の改良により分析精度が向上した・VB12は含有量の高い健康食品では公定法で対応できないものがある。

室間共同試験

食品形態の違う健康食品においても、公定法で対応可能。

食品形態の違う健康食品においても分析UV2法で対応可能

室間共同試験

健康食品中の分析法は従来法で対応可能

栄養成分の分析方法の見直し

消費者へ正しい情報を提供するためには
精度の高い分析方法とより適切な分析手法の検討が必要

平成20年度は、栄養表示基準における栄養成分の分析法について
改訂が望ましいと考えられる点を指摘した。
検証項目：ビタミン類、ミネラル類、飽和脂肪酸、糖類、有機酸等

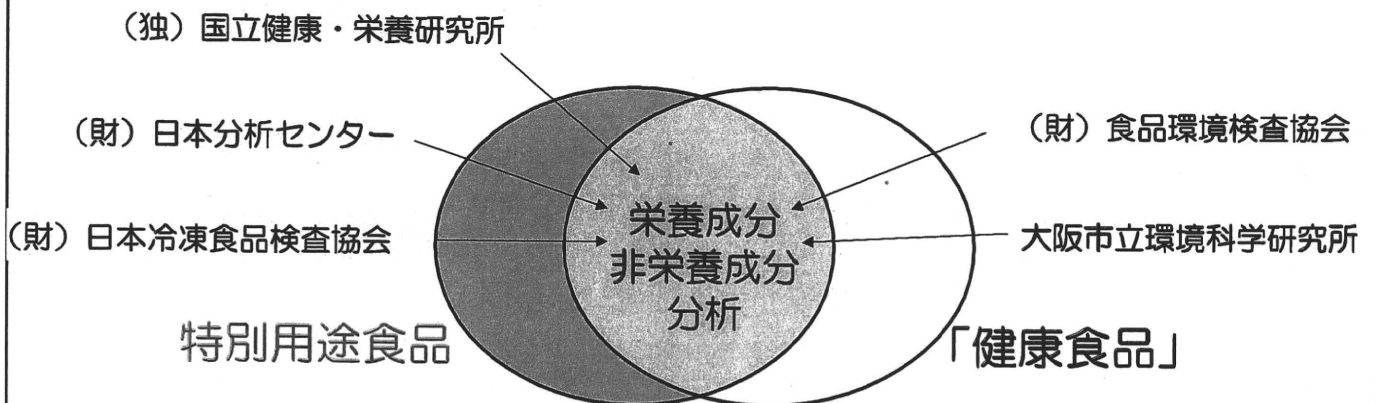
平成21年度は、特別用途食品制度改正に伴い、以下の項目を検討した。
検証項目：ヨウ素、セレン、クロム、モリブデン等

さらなる分析法の妥当性確認が必要な項目
検証が必要な項目：不飽和脂肪酸、モリブデン、ビタミンK等

消費者への正しい情報の提供・食品の安心安全確保

検査機関の信頼性確保に関する研究

登録試験機関間における食品成分分析精度管理体制の確立



+ 栄養成分の分析方法の見直し

(独) 国立健康・栄養研究所
今後：定期的な室間共同試験
標準食品の作製等

消費者への正しい情報の提供・食品の安心・安全確保

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)₂D₃ 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; E₂: 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)₂D₃: 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃