

# 骨の構造変化に対する大豆イソフラボン 抽出物投与の影響

## — 第2報 皮質骨における微小構造変化

海老沢秀道・不破眞佐子・白石貴子

Effects of Dietary Isoflavone-Extract from Soybean Hypocotyl on  
Bone-structural Properties in Ovariectomized Adult Female Rats  
— II Microarchitectural changes in cortical bone

Hidemichi EBISAWA, Masako FUWA and Takako SHIRAISHI

In order to elucidate the usefulness of dietary soybean-isoflavone as the anti-osteoporotic agent in the view of bone-microarchitectural analyses, experimental diet supplemented with 2.5% soybean-isoflavone (group OVX-IFH) were given to the ovariectomized adult rats for 12 weeks.

Consequently, 1) No significant differences were observed in Euler, Run Length, CT-value, S-Areas, PM and B-thickness in cortical bone of soybean-isoflavone treated rats than that of the control rats. 2) Relatively higher values in SMI and PMI value in the cortical bone of soybean-isoflavone treated rats than that of the control rats were observed in the distal femur.

From these results, we concluded that the soybean-isoflavone has beneficial effects on maintaining the mechanical strength of femoral cortical-bone in OVX rats, even though the condition under bone mineral had not increased.

*Key words:* soybean-isoflavone (大豆イソフラボン), ovariectomized rat (卵巣摘除ラット), osteoporosis (骨粗鬆症),  $\mu$ CT scan (マイクロCTスキャン)

### 1. 緒言

大豆イソフラボンの主要分画を占めるゲニステインやダイゼインは、破骨細胞による骨吸収を抑制し<sup>1)</sup>、閉経後女性および骨粗鬆症モデルラットの骨量低下を抑制する<sup>2)</sup>ことが報告されている。我々は骨の構造解析による大豆イソフラボンの食事性骨粗鬆症抑制因子としての有効性を検証している。そしてこれまでに<sup>3)</sup>、ダイゼインを主分画とする大豆イソフラボンはラット大腿骨遠位端付近の皮質骨の平均骨幅、皮質骨および海綿骨のCT値および骨密度維持に有効な結果を得ており、閉経に伴う骨構造喪失を抑制する可能性が示されている。しかし、骨の

連続性や曲げに対する強さなど骨の微小構造解析変化に対する大豆イソフラボンの影響についてはほとんど不明である<sup>4)</sup>。

本研究は、大豆イソフラボンを投与した骨粗鬆症モデルラットの骨微小構造を測定した。

### 2. 実験方法

#### 実験動物および食餌条件

実験動物は卵巣摘除した3ヶ月齢のウィスター系雌ラット9匹(OVX群)を用いた。これらラットを3群に分け、20%カゼインタンパク質食飼料(20CA)を投与する群(OVX-CA群)、20CAに大豆イソフラボン抽出物を1 mg/gの割合で添加した飼

Table 1. Compositions of experimental diet and isoflavone extract

Ingredients	OVX-CA, OVX-E <sub>2</sub> , Sham		OVX-IFH		
Isoflavone extract (g)*	0		25		
Casein (g)	230		230		
$\alpha$ -corn starch (g)	400		383		
Sucrose (g)	200		192		
Cellulose powder (g)	50		50		
Mineral mixture (g)	50		50		
Vitamin mixture (g)	20		20		
Corn oil (g)	50		50		
<hr/>					
Isoflavone contents (mg/1000g)	0		1000		
<hr/>					
Composition of isoflavone extracted from soybean hypocotyl					
(%)					
Moisture	3.2	Daidzin	2.192	Daidzein	0.106
Protein	24.0	Genistin	0.481	Genistein	0.015
Lipids	0.1	Malonyldaidzin	0.046	Glycitin	1.183
Ash	7.2	Malonylgenistin	0.009	Glycitein	0.271
Carbohydrate	64.1	Acetyldaidzin	1.978	Acetylglycitein	0.568
Fiber	1.4	Acetylgenistin	0.032	Malonylglycitin	0.050

\* Soyaflavone E, gifted from Fujioil Co., Osaka.

料を投与する群 (OVX-IFH群) あるいは20CAを与えさらに17 $\beta$ -エストラジオールを皮下投与する群 (OVX-E<sub>2</sub>) のいずれかに割り振った。一方, OVXに対する対照として, 擬手術を施し20CAを投与する群 (Sham群) を設けた。このような条件で3ヶ月間ラットを飼育した。食餌投与量は1日あたり13gの制限条件とした。実験食組成は表1に示した。

#### 大腿骨微小構造解析

実験食期間終了後, ラットを麻酔下に採血屠殺し, 大腿骨を得た。大腿骨はアルコール固定した。その後, 大腿骨遠位端の成長線から近位端側に2mmの位置および近位端回転子から遠位端側に3mmの位置でエックス線 $\mu$ CTスキャン (エレスキャン, 日鉄エックス㈱, 日本) による3次元構造解析を行い骨の石灰化度を示す平均CT値, 断面積 (Sectional areas, S-Areas), 骨の形状が複雑で表面積が大きいことを示す周囲長 (PM), 骨の厚さを示す平均骨幅 (Bone thickness, B-thickness) など骨のサイズに関する測定の外に骨構造の枝分かれ構造の数を示すオイラー数 (Euler), 骨構造の連続性を示すランレングス (Run Length), 曲げにくさを示す断面二次モー

メント (SMI), ねじりにくさを示す断面極慣性モーメント (PMI) を測定した。

#### 測定結果の解析

実験データは, 一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後, Studentの*t*-testにより各群間の有意差検定を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 摂食量, 体重, 子宮重量および血液分析

実験食期末の体重, 平均摂食量, 子宮重量および血液分析の結果は表2に示した。

実験期間中の残食量を測定し, 平均摂取量を計算した。その結果各群の平均摂食量はおおよそ11g/日となった。各群間の摂食量に有意差はなかった。その結果全てのラットの体重は実験期間を通して増加し, 実験食期終了時における体重はOVX-CA群, OVX-IFH群, OVX-E<sub>2</sub>群およびSham群でそれぞれ220 $\pm$ 5g, 204 $\pm$ 12g, 193 $\pm$ 2gおよび193 $\pm$ 12gとなった。子宮重量はSham群に比べてOVX-CA群で明らかな低値を示した。OVX-IFH群の子宮重量はOVX-CA群とほぼ同値を示し, イソフラボン摂

取は子宮を肥大させなかった。血液分析の結果、血清カルシウム濃度は全てのラットで正常値を示した。また、この他にアルブミン、クレアチニン等も測定したがいずれも正常範囲の値を示していた。

### 大腿骨構造解析

左大腿骨遠位端付近の一定部位を決め、エックス線 $\mu$ CTスキャンにより、大腿骨遠位端付近のいくつかの骨構造指標を測定し、その結果を表3に示した。

骨の代謝は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により維持されている。また骨の代謝速度は皮質骨より海綿骨でおよそ4倍高く、この理由で、海綿骨リッチな骨である腰椎は、骨粗鬆症によ

る骨折が起こりやすい。しかし前回の報告で明らかのように、大豆イソフラボンは卵巣摘除した骨粗鬆症モデルラットの海綿骨だけでなく皮質骨の構造維持にも有効であった<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、実験方法に記載した部位において3次元 $\mu$ CTスキャンによる大腿骨微小構造解析を実施した。

その結果、骨密度を反映するCT値はOVX-CA群とOVX-IFH群の差を全く認めず、本研究条件ではラットの骨量に対する大豆イソフラボンの利的効果は見られなかった。オイラー数およびランレングスの値はOVX-CA群とOVX-IFH群ではほとんど差が見られず、大豆イソフラボンによる骨構造の複雑さや連続性の維持に関する利的効果は観察されなかった。

Table 2. Effects of dietary isoflavone on feed intake, uterus weight and serum calcium concentration in ovariectomized female rat

	n	Body wt <sup>1</sup> . g	Feed intake g/day	Uterus g/kg BW	Serum Ca mg/100ml
OVX-CA	3	220 ± 5 <sup>a</sup>	11.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.87 <sup>a</sup>	11.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
OVX-IFH	3	204 ± 12 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.23 ± 1.17 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.2 <sup>a</sup>
OVX-E <sub>2</sub>	3	193 ± 2 <sup>b</sup>	11.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.06 ± 1.20 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.4 <sup>a</sup>
Sham	3	193 ± 12 <sup>b</sup>	10.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.56 <sup>a</sup>	10.8 ± 0.6 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Body wt: Body weight at the end of experimental period. Initial body weight of the rats ranged 142g to 172g. Numbers with different superscript expressed significantly different at p<0.05. Mean ± SD.

Table 3. Effects of dietary isoflavone on micro-architecture of femoral cortical-bone in distal of OVX-female rats

	n	Euler number	Run Length mm	SMI mm × mm × mm × mm	PMI
OVX-CA	3	36068 ± 9210	0.643 ± 0.084	9051 ± 938	19776 ± 1956
OVX-IFH	3	36122 ± 6957	0.629 ± 0.051	9605 ± 888	20653 ± 1615
OVX-E <sub>2</sub>	3	35836 ± 7215	0.566 ± 0.019	8217 ± 1514	17329 ± 2300
Sham	3	32271 ± 9128	0.575 ± 0.021	9658 ± 1160	20137 ± 2168

  

	n	CT value	S-Areas mm <sup>2</sup>	PM mm	B-thickness mm
OVX-CA	3	245.5 ± 1.8	4.450 ± 0.098	12.9 ± 0.69	0.690 ± 0.047
OVX-IFH	3	245.9 ± 1.2	4.453 ± 0.235	13.1 ± 0.32	0.679 ± 0.037
OVX-E <sub>2</sub>	3	244.4 ± 1.5	3.969 ± 0.160	14.1 ± 1.74	0.585 ± 0.059
Sham	3	243.2 ± 1.0	4.284 ± 0.221	13.3 ± 0.61	0.644 ± 0.019

No significant differences were observed among the experimental group. OVX: Ovariectomized rat. Mean ± SD.

またさらに、断面積 (S-Areas)、周囲長 (PM) および平均骨幅も大豆イソフラボン摂取による明らかな改善は観察されず、本研究条件では、大豆イソフラボンは骨のサイズに対する明らかな効果を示さなかった。一方、SMIおよびPMI値は、有意ではないが、OVX-CA群に比べてOVX-IFH群ではそれぞれ6%および4%高値を示した。イソフラボンが骨量維持に有効なことはほぼ確認されているがその作用機序は十分明らかにされていない。さらに、大豆イソフラボン摂取ラットの皮質骨の構造解析を行った報告はほとんどない<sup>5)</sup>。そのため本研究結果の妥当性を検証することは大変困難である。しかしながら我々は、骨量増加を認めない食事条件でも大豆イソフラボンは皮質骨強度を維持できる可能性を示唆しているものと考えた。

#### 4. 要 約

食事性骨粗鬆症抑制因子としての大豆イソフラボンの有用性を骨構造解析から明らかにする目的で、骨粗鬆症モデルラットに2.5%大豆イソフラボン混合物添加食を12週間投与した。

その結果、コントロール (OVX-CA群) に比べて大豆イソフラボン摂取群では、1) ラットの子宮重量は増加しなかった。2) CT値はほとんど影響を受けなかった。3) 平均骨幅やランレングスなど、骨構造は増加しなかった。4) 骨強度を示す指標であるSMI値およびPMI値は、いずれも高値傾向を示した。

以上から、大豆イソフラボンは、骨密度増加効果とは別に骨強度維持に対して有効である可能性が示された。

#### 5. 謝 辞

本研究は、東京都老人総合研究所骨代謝研究グループとの共同研究として行われた。また、不二たん白質研究振興財団の研究助成を受けた。

#### 6. 文 献

- 1) 海老沢秀道, 腰原康子: ヒト破骨細胞形成に対する大豆イソフラボンの抑制効果, 大豆たん白質研究, 4, 129-134 (2001).
- 2) Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K and Tsuji K: Preventive effects of the plant isoflavones, daidzein and genistein, on bone loss in ovariectomized rats fed calcium-deficient diet. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 62-66 (1998).
- 3) 海老沢秀道, 不破眞佐子, 白石貴子: 骨の構造変化に対する大豆イソフラボン抽出物投与の影響, 昭和女子大学学苑, 770, 15-20 (2004).
- 4) Fonseca D, Ward WE: Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone*, 35, 489-497 (2004).
- 5) Keneth DR Setchell and Lydeking-Olsen: Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention. *Am.J.Clin.Nutr.*, 78, 593S-609S (2003).

(えびさわ ひでみち 生活機構研究科)  
(ふわ まさこ 生活科学科)  
(しらいし たかこ 生活科学科)