

棘梨熱水抽出物が骨粗鬆症モデル 卵巣摘出ラットに及ぼす影響

北出洋子, 山田知哉, 松井 徹, 矢野秀雄

(京都大学大学院農学研究科動物栄養科学研究室)

Cili Extract Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis

Yoko Kitade, Tomoya Yamada, Tohru Matsui and Hideo Yano

Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Firstly, the effects of cili (*Rosa roxburghii*) extract on bone metabolism and uterotrophic activity were studied in an ovariectomized rat model of osteoporosis. Secondly, cili extract was examined for the effects on osteogenic activity in UMR106 cells, a clonal osteoblastic line derived from rat osteosarcoma. Thirteen-week old female Wistar rats were randomly assigned to following five groups, i.e., shamoperated (Sham); ovariectomized (Ovx); Ovx and fed a diet containing 4.5% ciliextract (Ovx+LC); Ovx and fed a diet containing 9.0% cili extract (Ovx+HC); Ovx and injected daily with $5\mu\text{g}$ of 17β -estradiol/kg body wt./day (Ovx+E₂). The Ovx group showed significantly lower bone mineral density of the right femur than did the Sham group. Bone mineral density did not differ among the other groups from the Ovx group. These results suggest that cili extract is effective in preventing bone loss induced by ovarian hormone deficiency. Ovariectomy caused atrophy of the uterus. The atrophy was completely prevented by the E₂ treatment and partly prevented by the higher intake of cili extract. These results suggest that compared to E₂, cili extract has similar action on bone metabolism but less uterotrophic activity. Thus cili extract might be more suitable drug than estrogen for prevention of osteoporosis because estrogen administration is accompanied by severe adverse effects such as vaginal bleeding and carcinogenesis. In *in vitro* study, alkaline phosphatase activity was significantly increased in UMR106 cells by the additions of E₂ or cili extract. This implies that cili extract directly stimulates osteoblastic activity. In conclusion, cili extract contains a phytoestrogen which is effective in preventing bone loss due to ovarian hormone deficiency.

棘梨 (*Rosa roxburghii*) は中国に自生するバラ科の灌木であり, その果実の熱水抽出物は健胃や強壯作用を有する漢方薬として用いられている。前回の本研究会において成長中ラットへの棘梨抽出物給与

は小腸上部におけるカルシウム能動吸収を促進し、骨中カルシウム密度を有意に増加させるが骨の伸長を抑制することを報告した¹⁾。これらの現象は、動物にエストロジェンを投与した場合の反応に類似している。また多くの植物にはエストロジェン様作用を有するイソフラボンが存在していることが知られている。そこで棘梨抽出物中にエストロジェン様物質が含まれている可能性が示唆された。本試験では、まず棘梨抽出物を骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出ラットに給与し骨代謝ならびに生殖器に及ぼす影響を検討した。次に UMR106 骨芽細胞を用い、棘梨抽出物が骨芽細胞の活性に直接及ぼす影響について検討した。

実 験 方 法

1) 卵巣摘出ラットによる棘梨抽出物給与試験

13週齢のウィスター系雌ラット40頭を8頭ずつ次の5区に分けた。擬似手術を施し対照飼料を給与した Sham 区、卵巣摘出手術を施し対照飼料を給与した Ov_x 区、卵巣摘出手術を施し 45g/kg の棘梨抽出物 (エーザイ 東京) を給与した Ov_x+LC 区、卵巣摘出手術を施し 90g/kg の棘梨抽出物を給与した Ov_x+HC 区、卵巣摘出手術を施し対照飼料を給与し 17β -エストラジオールを投与した Ov_x+E₂ 区の5区を設けた。13週齢で各手術を行い、各々の試験食を30日間給与した。 17β -エストラジオールは 5 μ g/kg body weight/day 皮下投与した。Ov_x+E₂ 区以外のラットには同濃度の溶剤のみを皮下投与した。飼料摂取量は毎日測定し、最も少ない区にあわせて等量の飼料を給与した。試験終了時に屠殺し、増体量、子宮重量、右大腿骨性状、血清中カルシウム・無機リン・カルシトニン濃度を測定した。統計処理は SAS の GLM プロシージャーにより分散分析を行った。その後、平均値間の差の検定を Duncan's Multipule Range Test を用いて行った。

2) UMR106 骨芽細胞による棘梨抽出物添加試験

試験にはラット由来の骨芽細胞株である UMR106 細胞を用いた。プレコンフルエントの状態で培地をフェノールレッド・フリーの牛胎児血清を含むイーグル MEM から血清を取り除き、48時間後に棘梨抽出物、 17β -エストラジオールを添加した。添加4日後に細胞を回収し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。Student's t-Test により統計処理を行った。

結 果 と 考 察

飼料は等量給与したため、摂取量に差はなかったにも関わらず、増体量は Sham 区に比べ Ov_x 区において有意に高く (Table 1)、これは従来²⁾の報告に一致していた²⁾。卵巣摘出による体重増加は、エストロジェン投与、及び HC 給与により有意に抑制された。卵巣摘出により、Ov_x 区において子宮重量が減少した。Ov_x+E₂ 区では子宮重量は Ov_x 小区に比べ有意に高い値を示した。一方 Ov_x+HC 区では Ov_x 区に比べ高値を示したが、Ov_x 区と比較するとこの値は低いものであった。これらの結果から、棘梨抽出物中にはエストロジェン様物質即ち植物エストロジェンが含まれていることが示唆された。しかしながら棘梨抽出物給与による子宮重量回復作用はエストロジェン投与に比べ微弱であり、棘梨抽出物の生殖器に対する影響は弱いことが示された。

右大腿骨骨塩密度はOvx区と比較しSham区, Ovx+HC区, 及びOvx+E₂区で有意に高い値を示し, また一方Ovx区以外の区間で有意差は認められなかった (Table 2)。またカルシウム含量は, Ovx区に比べ, Ovx+LC区, Ovx+HC区で有意に高い値を示した。以上の結果から棘梨抽出物中の植物エストロジェンは卵巣摘出ラットにおける骨代謝の改善作用を有することが示された。

小腸上皮細胞にはエストロジェンのレセプターが存在しており, エストロジェンによりカルシウム吸収が増加することが報告されている^{3), 4)}。また我々は成長中ラットへの棘梨抽出物給与により小腸上部のカルシウム能動吸収が高まったことを報告した¹⁾。本試験において血清中カルシウム濃度はOvx区に比べ, Ovx+HC区, Ovx+E₂区において有意に高い値を示した (Table 3)。これは棘梨抽出物及びエストラジオールによりカルシウム吸収が高まったためと推察される。また血清中カルシトニン濃度はSham区と比較して, Ovx区において有意に低く, その他の区はSham区と類似した値を示した。これは血清中のカルシウム濃度が上昇したことが一因である。またエストロジェンはカルシトニン分泌を直

Table 1. Effects of ovariectomy (Ovx), Cili extract, and 17 β -estradiol (E₂) on food intake, body weights, and organ weights in rat

Group	Measure		
	Food intake (g/day)	Body weight gain (g)	Uterine weight (g)
Sham	16.6 \pm 0.4	26.9 \pm 2.8 ^c	0.526 \pm 0.065 ^a
Ovx	17.6 \pm 0.0	46.5 \pm 2.4 ^a	0.160 \pm 0.018 ^b
Ovx+LC	17.1 \pm 0.3	43.8 \pm 4.4 ^{ab}	0.162 \pm 0.017 ^b
Ovx+HC	16.9 \pm 0.4	32.1 \pm 6.1 ^b	0.298 \pm 0.060 ^b
Ovx+E ₂	16.8 \pm 0.3	8.6 \pm 4.1 ^c	0.600 \pm 0.004 ^a

Values are means \pm SE

LC: A low level of Cili extract

HC: A high level of Cili extract

Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

Table 2. Effects of ovariectomy (Ovx), Cili extract, and 17 β -estradiol (E₂) on femoral characteristics in rats

Group	Measure		
	Bone mineral density (g/cm ³)	Ca content (mg)	P content (mg)
Sham	0.63 \pm 0.02 ^a	122.0 \pm 3.0 ^{ab}	54.9 \pm 1.5
Ovx	0.57 \pm 0.01 ^b	115.8 \pm 2.9 ^b	52.4 \pm 1.4
Ovx+LC	0.61 \pm 0.01 ^{ab}	125.7 \pm 2.0 ^a	55.4 \pm 1.9
Ovx+HC	0.64 \pm 0.01 ^a	124.5 \pm 3.9 ^a	56.4 \pm 1.8
Ovx+E ₂	0.63 \pm 0.01 ^a	122.3 \pm 2.0 ^{ab}	54.8 \pm 0.9

Values are means \pm SE

LC: A low level of Cili extract

HC: A high level of Cili extract

Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

接促進することが知られている⁵⁾。植物エストロゲン誘導体であるイプリフラボンは、カルシトニン分泌を促進することが報告されている^{6),7)}。従って棘梨抽出物中の植物エストロゲンがカルシトニン分泌を促進し、骨吸収を抑制している可能性もある。

UMR106 は、エストロゲン投与によって活性が促進される⁸⁾。17 β -エストラジオールを添加した細

Table 3. Effects of ovariectomy (Ovx), Cili extract, and 17 β -estradiol (E₂) on serum concentrations of calcium, inorganic phosphorus and calcitonin in rats

	Measure		
	Calcium (mg/l)	Inorganic phosphorus (mg/l)	Calcitonin (ng/l)
Sham	102.9 \pm 1.3 ^b	38.9 \pm 4.2 ^b	134.76 \pm 16.56 ^a
Ovx	102.3 \pm 2.4 ^b	46.4 \pm 3.5 ^{ab}	61.60 \pm 5.91 ^b
Ovx+LC	101.9 \pm 1.4 ^b	45.5 \pm 3.3 ^{ab}	95.50 \pm 13.71 ^{ab}
Ovx+HC	109.5 \pm 2.0 ^a	53.0 \pm 2.2 ^a	101.73 \pm 17.56 ^{ab}
Ovx+E ₂	112.2 \pm 1.6 ^a	40.7 \pm 4.7 ^b	134.04 \pm 15.60 ^a

Values are means \pm SE

LC: A low level of Cili extract

HC: A high level of Cili extract

Within a row, values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

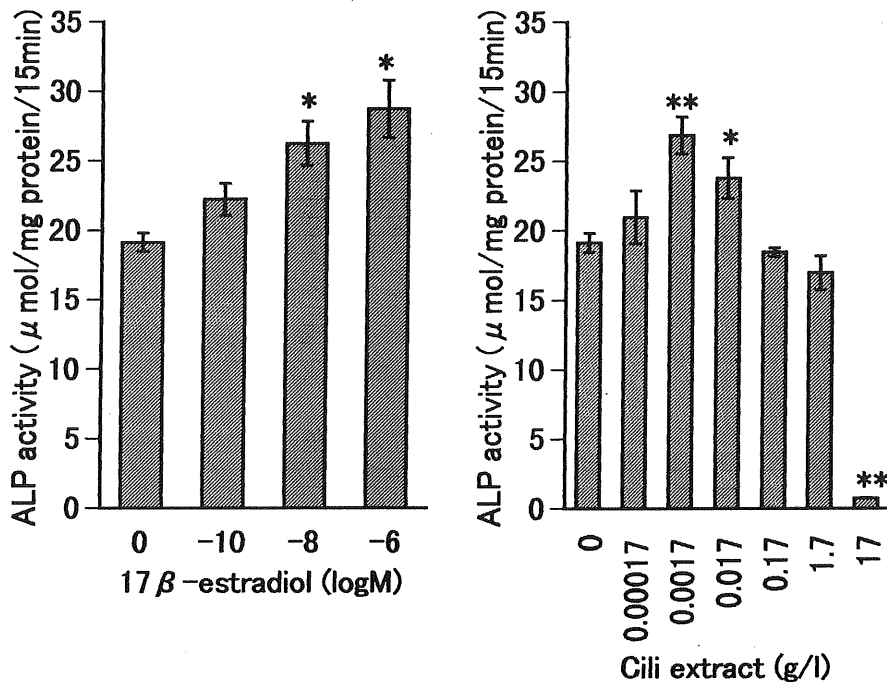


Fig. 1 Effect of 17 β -estradiol and Cili extract on alkaline phosphatase activity in UMR106 cells. Values are means \pm SE for triplicate experiments. *P<0.05, **P<0.01, compared with the control.

胞の ALP 活性は 10^{-8} M, 10^{-6} M の濃度で有意に高い値を示した (Fig. 1)。一方棘梨抽出物を添加した場合 1.7mg/l, 17mg/l の濃度において対照区より有意に高く, エストロジェンと同様, 棘梨抽出物中の植物エストロジェンも直接骨芽細胞に作用する可能性が示された。また 17g/l の棘梨抽出物を添加すると, ALP 活性は非常に低い値を示した。このような高濃度では棘梨抽出物は UMR106 細胞に対し, 毒性を示す可能性が推察できるが詳細は不明である。

代表的な植物エストロジェンには, ダイゼイン, ゲニステイン等のアグリコンとその配糖体のダイジン, ゲネスチン等がある。高速液体クロマトグラフィーを用い, 棘梨抽出物中のこれらフラボノイドとその配糖体を測定したがいずれも検出されなかった。従って, 棘梨抽出物中には上記以外の植物エストロジェンが存在すると思われるが, さらに同定を進める必要がある。

本試験より棘梨抽出物中には植物エストロジェンが存在し, 棘梨抽出物を卵巣摘出ラットに給与すると骨芽細胞に直接作用して, あるいはカルシウムの吸収促進やカルシトニンの分泌促進等を介して骨量を維持することが示された。また棘梨抽出物は子宮に対する作用が弱いため, 生殖器に対する副作用の問題があったエストロジェン^{9), 10)}に代わる骨粗鬆症治療薬として利用できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 平林美穂, 平原さつき, 松井 徹, 植木 規, 矢野秀夫. 棘梨熱水抽出物給与がラットのカルシウム・骨代謝に及ぼす影響. 微量栄養素研究. 第13集. 67-73. 1996
- 2) Kalu DN, Liu CC, Salerno E, Hollis B, Echon R, Ray M. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17β -estradiol. Bone Mineral, 14 : 175-187. 1991
- 3) Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DN. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. Bone Mineral, 21 : 63-74. 1993
- 4) Gallagher JC, Riggs BL, Deluca HF. Effect of estrogen on Calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 1359-1364. 1980
- 5) Greenberg C, Kukreja SC, Bowser EN, Hargis GK, Henderson WJ, Williams GA. Effects of estradiol and progesterone on calcitonin secretion. Endocrinology, 118 : 2594-2598. 1986
- 6) Yamazaki I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. Life Sciences 38 : 757-764. 1986
- 7) Yamazaki I, Kinoshita M. Calcitonin secretion property of ipriflavone in the presence of estrogen. Life Sciences, 38 : 1535-1542. 1986
- 8) Gray TK, Flynn TC, Gray KM, Nabell LM. 17β -Estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84 : 6267-6271. 1987
- 9) Peck WA, Riggs BL, Bell NH, Wallace RB, Johnston Jr CC, Gordon SL, Shulman LE. Research directions in osteoporosis. Am. J. Med., 84 : 275-282. 1988
- 10) Vessey MP. Exogenous hormones in the aetiology of cancer in women. Proc. R. Soc. Med., 77 : 542-549. 1984