

骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収に及ぼすクズ葛抽出物の作用

田中 照佳, 鈴木 佐和子, 内山 貴裕, 唐 漢軍,
 鶴澤 有希, 森山 達哉, 河村 幸雄
 (近畿大学大学院農学研究科応用生命化学*)

Kudzu Isoflavonoids Suppress Bone Resorption in Ovariectomized Mice

Teruyoshi TANAKA, Takahiro UCHIYAMA, Hanjun TAN,
 Yuki UZAWA, Tatsuya MORIYAMA and Yukio KAWAMURA
 Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kinki University

Summary

We designed to examine the effect of kudzu vine extracts (PVEE) on bone resorption and bone organization in ovariectomized mice. The uterine of all OVX mice was atrophic. Oral administration of PVEE did not affect the uterine size of OVX mice. A bone resorption marker (Deoxyypyridinoline) was significantly increased by OVX, and the increase was effectively suppressed by administration of PVEE for 2 weeks. The femoral bone mineral density (BMD) of OVX mice with CT analysis was significantly restored by the administration of PVEE. These results clearly demonstrated that PVEE improved effectively the postmenopausal bone loss in ovariectomized mice, and kudzu vine might be a promising food resource preventing osteoporosis.

骨粗鬆症は、骨量の減少と骨内部の構造変化という生理現象が過度に進行した疾患である。骨量は加齢により減少するが、とくに女性は閉経をむかえる40～50歳代以降に急激な骨量減少がみられる。骨は、体の支持組織としての役割だけでなく、カルシウム代謝や細胞の分化成熟を担う組織である。したがって、骨粗鬆症は生活の質(QOL)の低下をもたらすため、その予防食品素材の開発が囑望されている。

クズ (*Pueraria lobata*) は植物分類上、マメ科ソラマメ亜科アズキ族クズ属に属し、日本、朝鮮半島、中国大陸などに自生している。クズは土壌を選ばず、温暖で湿潤な気候のもと、さかんに繁殖する屈強な植物であり、その繁殖力の強さから害草として扱われている。主な利用法としては葛粉が有名で、紡錘型の貯蔵根から採られる高級なデンプンとして、病人の食料や葛餅、葛素麺、葛切などの原料として古くから使われている。また葛根は発汗、解熱作用を有する生薬素材として、葛根湯に用いられている。しかし現在、葛根は薬事法により薬品として扱われている。そこで、機能性食品素材としてクズ葛に注目した。これまで、われわれはクズ葛エタノール抽出物(PVEE)の経口摂取が、マウスの骨吸収マーカーの発現を抑制すること、それが骨吸収のマスター転写因子のNFATc1の下方制御によることを示した¹⁾。この結果にもとづいて、PVEEの経口摂取が骨

粗鬆症モデルマウスの骨吸収と骨組織に与える影響を検討した。

実験方法

1. クズ葛エタノール抽出物の調製

クズは、近畿大学構内で採取したものをを用いた。採取し乾燥させた蔓を、はさみで細かく切った後、粉碎機でエタノールを入れながらさらに細かく粉碎した。この粉碎物をクズの重量に対し、5倍量のエタノールで一晩攪拌した。その後、フィルターで吸引ろ過し、エバポレーターで濃縮させた。これを、凍結乾燥し、粉末状にしたものを投与サンプル(PVEE)とした。

HPLCでPVEEのイソフラボノイド含量を定量した結果、クズ特有のグリコシド型イソフラボンであるプエラリンがもっとも多く、同じくグリコシドであるダイゼン、グリシチンなども含まれることが分かった。

2. 動物

Slc: ddY系統の13週齢で卵巣摘出(OVX, n=14)または卵巣摘出擬似手術(Sham, n=7)したマウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。OVXマウスはコントロール群(OVX-control, n=7)とPVEE投与群(OVX-

*所在地：奈良市中町3327-204 (〒631-8505)

PVEE, n=7)に分けられた。餌と水は自由摂取させた。餌(MF)はオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。水は水道水を用いた。

クズ蔓抽出物の濃度が20 mg/kgとなるように体重換算し、蒸留水で溶解した。調製したサンプルはマウス用ゾンデを用い、経口投与した。

3. 尿サンプルの調製

遠心分離で不純物を取り除いた1 mL尿に、0.5 mLの12 N HClを加え、110°Cで12時間加水分解した。

0.5 mL分解物を15 mLの遠沈管に分注し、0.5 mLの酢酸、2 mLの1-butanol、2.5 mLの5% CF-1セルロースを加え、攪拌後、遠心分離を行った(1,500 g, 2 min)。その後、上澄みを除去し、沈殿に2.5 mLの1-butanol:酢酸:水=4:1:1(v/v/v)の混合溶液を加え、攪拌後、遠心分離を行った(1,500 g, 2 min)。その後、沈殿に2.5 mLの超純水を加え、攪拌後、遠心分離(3,000 g, 10 min)し、上澄みを回収した。その後、集めた上澄み液を凍結乾燥し、0.5 mLの0.1 N HClを加え、0.45 μmのフィルターでろ過したものを尿サンプルとした。

4. 尿中デオキシピリジノリン (DPD) の定量

尿中DPDの定量にはHPLCを用いた。移動相はアセトニトリル:0.1 Mリン酸バッファー(pH 3.5, 0.1% SDSと0.0025% EDTA含有)=2:7を用い、5C18-AR-IIカラム(4.6×250 mm, ナカライテスク)、蛍光検出器(295 nmで励起, 395 nmで検出)を使用した。分析サンプル注入量は50 μL, 流速1.0 mL/minの条件下で分析した。標準物質のDPDは和光純薬工業株式会社より購入した。

5. 骨密度の測定

CT断層画像撮影はラシータ(ALOKA)を使用した。マウスから大腿骨を摘出し、液体窒素で凍結後、凍結乾燥したものをサンプルとした。0.2 mmスライスで大腿骨の断層撮影を行い、その断層写真を解析した。

結果

1. 体重と子宮重量

本研究では、OVXマウスにPVEEを20 mg/kg/dayの用量で2週間経口投与した。投与期間中の体重測定は、実験が適正に行われているかを確認するために実施した。PVEE投与期間中のマウスの体重変移をFig. 1Aに示した。OVX-control群は、Sham群と比較して有意な体重増加がみられた。これに対し、PVEEを投与した群では、体重の増加が有意に抑制された。PVEEを投与することで脂肪重量が減少していたことから(data not shown)、脂質代謝に対しても好ましい作用をすることが示唆された。

子宮重量は、PVEEのエストロゲン様作用を評価する試験として用いた。OVXマウスの子宮重量は、Shamマウスと比較して卵巣摘出が誘発する子宮萎縮により有意に減少した(Fig. 1B)。しかし、PVEEの投与は、OVXマウスの子宮重量を回復させなかった。

ウスと比較して卵巣摘出が誘発する子宮萎縮により有意に減少した(Fig. 1B)。しかし、PVEEの投与は、OVXマウスの子宮重量を回復させなかった。

2. 卵巣摘出マウスの骨吸収マーカーに及ぼすクズ蔓抽出物の作用

クズ多年生蔓抽出物を投与した時の尿中の骨吸収マーカーであるDPDの影響をFig. 2に示した。13週齢で手術

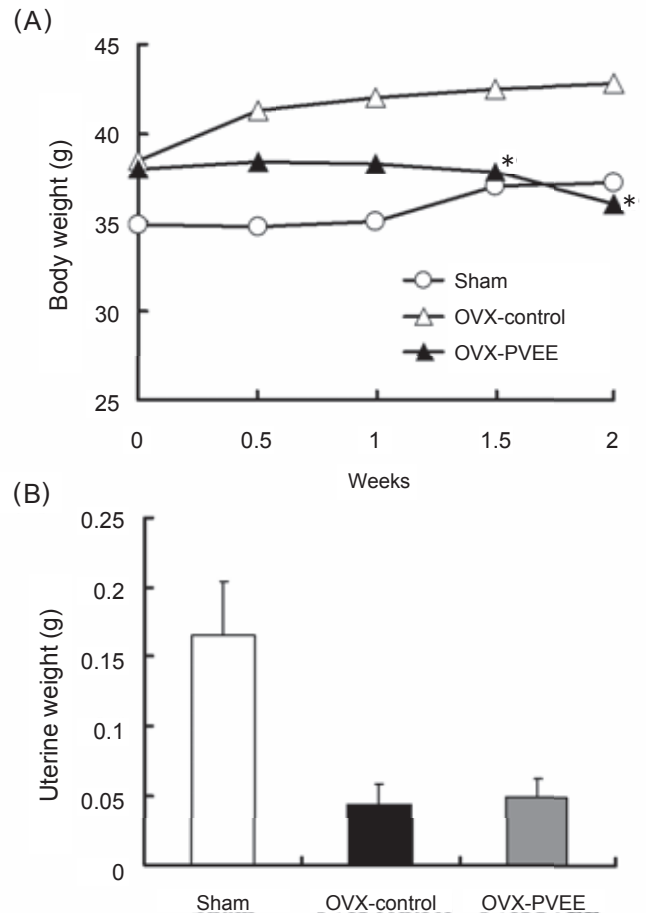


Fig. 1 Effect of PVEE on body weight and uterine weight in ovariectomized mice. Data were expressed as mean ± SD. **p* < 0.05 vs. OVX group, significant difference.

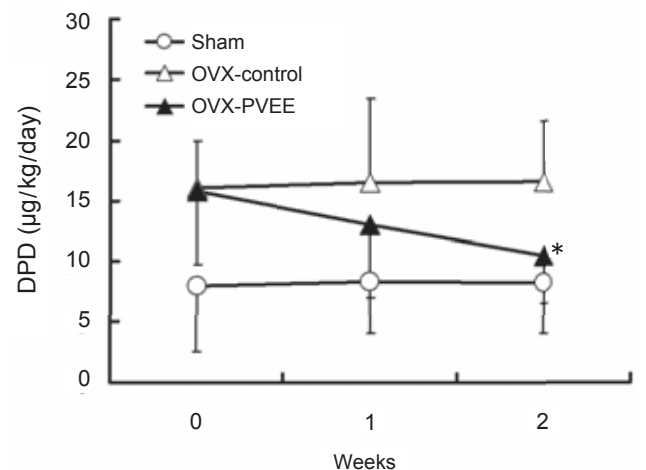


Fig. 2 Effects of the PVEE on urinary deoxypyridinoline (DPD) in ovariectomized mice. Data were expressed as mean ± SD. **p* < 0.05 vs. OVX group, significant difference.

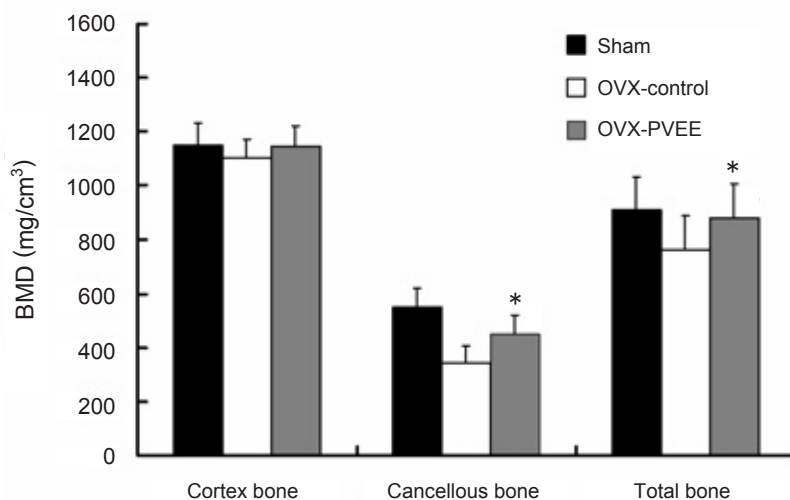


Fig. 3 Effect of PVEE on femoral bone mineral density in ovariectomized mice. Data were expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. OVX group, significant difference.

を行った OVX マウスと Sham マウスを 2 週間飼育した後、採尿を行った結果、OVX マウスの尿中 DPD が高レベルに達したことが確認された。卵巣摘出マウスにクズ蔓エタノール抽出物 (20 mg/kg) を 1 日 1 回、2 週間連続して経口投与を行った。OVX-control 群において、尿中 DPD レベルは常に高値を維持した。クズ多年生蔓抽出物を投与すると、1 週間後には投与群では減少傾向がみられ、2 週間後には有意な減少がみられた。このことから、クズ蔓抽出物の経口投与は OVX マウスの骨吸収を抑制することが示された。

3. 卵巣摘出マウスの骨密度に及ぼすクズ蔓抽出物の作用

クズ蔓抽出物 2 週間投与後の摘出大腿骨における骨密度の結果を Fig. 3 に示した。皮質骨密度では、どの群においても有意な差はみられなかった。海綿骨密度においては、OVX-control 群の骨密度は Sham 群に比べ有意に低値を示した。また、OVX-PVEE 群では骨密度の低下が有意に抑制されていることがわかった。全骨密度においては、OVX-PVEE 群の骨密度は Sham マウス群と同等レベルを維持した。このことからクズ蔓抽出物を投与することにより卵巣摘出マウスの骨密度の低下が抑制されることが認められた。

考 察

骨粗鬆症は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが崩れ、骨吸収が骨形成を上回る結果発症する疾患である。主な原因として閉経や加齢以外にも、食習慣やアルコール摂取などの生活習慣関連因子も挙げられる。また、男性ホルモンであるアンドロゲンよりも女性ホルモンであるエストロゲンの方が骨に対する影響が大きい。そのため、骨粗鬆症に発症しやすいと言われている²⁾。骨粗鬆症治療薬として開発されたものの多くは、治療に時間がか

り莫大な医療費がかかるため、安価な予防食品素材の開発が期待されている。

われわれは、未利用植物であるクズ (*Pueraria lobata*) に着目した。クズ多年生蔓中には、他の植物に比べて、きわめて高い含有量のイソフラボノイドが存在する^{3,4)}。とくにクズ特有のイソフラボノイドであるプエラリン含有率が高く、プエラリンは抗酸化作用⁵⁾や血中グルコース濃度低下作用⁶⁾など、優れた作用を持つことが報告されている。そこで、本研究ではクズ蔓エタノール抽出物 (PVEE) の経口投与が骨粗鬆症モデルマウスに与える影響を検討した。

本研究において、骨粗鬆症モデルマウスとして卵巣摘出 (OVX) マウスを使用した。以前の研究と同様に卵巣摘出により骨吸収マーカーが増加し、骨密度が減少することが確認された⁷⁾。OVX マウスに PVEE を経口投与すると、卵巣摘出による尿中デオキシピリジノリンレベルの増加が抑制された。PVEE の投与は骨形成マーカーである血中骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性には影響を与えなかったことから (data not shown), PVEE は OVX マウスの骨吸収に対して特異的に作用している可能性が示唆される。

また、すべての OVX マウスには子宮萎縮が認められた。OVX-PVEE 群において子宮重量の回復が観察されなかったことから、PVEE はエストロゲン様活性がないか弱いことが示唆された。このことは、われわれの以前の研究で PVEE の主要イソフラボンであるプエラリンがエストロゲンレセプター (ER) に対する結合が非常に弱いという結果と一致した⁸⁾。Trisomboon らは、100 mg および 1,000 mg の *Pueraria mirifica* の 90 日間の経口投与は雌カニクイザルの尿中 FSH レベルを低下させることを報告した⁹⁾。この作用は *Pueraria mirifica* のエストロゲン様作用に起因するかもしれない。本研究との異なる結果は、*Pueraria mirifica* とのイソフラボン含量や組成の違い¹⁰⁾ および投与量の違いによるものと考えられる。さらに、体重、臓器重量およ

び解剖所見等では、PVEE 摂取による異常はとくにみられなかったことから (data not shown), PVEE 20 mg/kg の経口投与での安全性が示された。

以上のことから、われわれは PVEE が子宮重量を回復させることなく OVX マウスの骨吸収を抑制し、骨密度減少を改善することを実証した。したがって、PVEE は有望な骨粗鬆症予防食品素材となることが期待される。今後、特定保健用食品として適用できる投与量での動物実験および有効作用量の検証を行う必要がある。また、現在その詳細な作用機構について研究を進展させている。

謝 辞

本研究の一部は科学技術庁奈良県地域結集型研究開発プログラム (科学技術振興機構) において実施されたものである。

参考文献

- 1) Michihara S, Suzuki S, Tang H, Moriyama T, Kawamura Y (2008) Kudzu (*Pueraria lobata*) extracts depress bone absorption of ovariectomized mouse by downregulating NFATC1 of osteoclast. *J Clin Biochem Nutr* 43: suppl.1, 141-144.
- 2) Zerwekh JE, Oz OK (2006) Estrogen and androgen play distinct roles in bone turnover in male mice before and after reaching sexual maturity. *Bone* 40: 553.
- 3) Kaufman PB, Duke JA, Brielmann H, Boik J, Hoyt JE (1997) A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J Altern Complement Med* 3: 7-12.
- 4) Prasain JK, Jones K, Kirk M, Wilson L, Smith-Johnson M, Weaver C, Barnes S (2003) Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51: 4213-4218.
- 5) Hwang YP, Jeong HG (2008) Mechanism of phytoestrogen puerarin-mediated cytoprotection following oxidative injury: estrogen receptor-dependent up-regulation of PI3K/Akt and HO-1. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 371-381.
- 6) Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT (2003) Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 66: 788-792.
- 7) Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15: 175-191.
- 8) 道原成和, 鈴木佐和子, 森山達哉, 河村幸雄 (2008) プエラリンによる RAW264.7 細胞の分化抑制はエストロゲンレセプター依存的吗? 日本農芸化学会 (一般講演)
- 9) Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K (2007) Assessment of urinary gonadotropin and steroid hormone profiles of female cynomolgus monkeys after treatment with *Pueraria mirifica*. *J Reprod Dev* 53: 395-403.
- 10) Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W (2007) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J Pharm Biomed Anal* 43: 428-434.