

# 大豆に含まれる骨粗鬆症の予防に有効な成分についての研究

松崎 茂\*・佐賀 烈・市村 薫

獨協医科大学医学部

## Anti-osteoporotic Factors Found in the Soybean

Shigeru MATSUZAKI, Takeshi SAGA and Kaoru ICHIMURA

Dokkyo University School of Medicine, Tochigi 321-0293

### ABSTRACT

Epidemiological studies have shown that incidence of osteoporosis in Japan is much lower than in European and North American countries and that signs of this disease here are not so severe as in these countries. It has been suggested that the Japanese diet rich in products of soybean is beneficial for the prevention of osteoporosis. In the present study, isoflavones such as genistein and daidzein and an extract of soybeans were tested for their preventive effects on bone metabolism in ovariectomized rats. Both genistein and daidzein were effective in lowering urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline, markers of bone resorption. An extract of soybeans which contained neither genistein nor daidzein also suppressed bone resorption. This extract, unlike the two isoflavones, increased the uterine weight of ovariectomized rats. These results show that soybeans contain estrogenic factor(s) other than genistein and daidzein which suppress bone resorption in ovariectomized rats. Identification of the anti-osteoporotic factor(s) in soybeans is now under way. *Soy Protein Research, Japan* 2, 83-87, 1999.

Key words : genistein, daidzein, soybean, ovariectomized rat, osteoporosis

疫学的調査によると、豆類を常時摂取している東洋人は欧米人と比べて、骨粗鬆症の頻度が低く、しかもそれによる骨折が少ないことが指摘されている<sup>1)</sup>。その原因の一つに豆類に含まれるイソフラボンがあげられている。事実、イソフラボンの尿中排泄量は日本人は欧米人と比べ明らかに高値を示す<sup>2)</sup>。これは豆類に豊富に含まれるイソフラボンが骨粗鬆症の予防に有効であることを示唆するものである。しかし、豆類やイ

ソフラボンが本当に骨粗鬆症を予防するかどうかについての実験的な証拠は多くはない。また、豆類が有効なのは、イソフラボンのみによるのかどうかも不明である<sup>3,4)</sup>。

そこで我々は閉経後骨粗鬆症のモデルとして卵巣摘除ラットを作製して実験に供した。イソフラボンのうちで大豆中にかなり高濃度に存在するダイゼインとゲニステインと、これらのイソフラボンを含まない大豆抽出画分を経口投与して、骨代謝に及ぼす効果を調べた。

\*〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

## 方 法

### 動物

10週齢の雌 Wistar ST ラットをネンブータル麻酔下に卵巣摘除して、実験に供した。

### 試薬および大豆抽出物

17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール、ダイゼイン、ゲニステインはシグマ社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。大豆抽出物としては無農薬栽培された国産大豆を出発材料として、イソフラボンおよびビタミンKを含まないと考えられる画分を得た。まず、大豆を細かく砕いた後、アセトン (1.5 L/kg) で抽出し減圧蒸発した後、それをシリカゲル・カラム (300 mm x 55 mm) に吸着させた。次のような溶媒、1) ヘキサン、2) ヘキサン：酢酸エチル (10:1, V/V)、3) ヘキサン：酢酸エチル (5:1, V/V)、4) 酢酸エチルおよび5) アセトンを用いて順次溶出した。酢酸エチルで溶出される画分がイソフラボンおよびビタミンKを含まない画分と予想されたので、それを大豆抽出物として用いた。その画分を減圧乾固し、オレイン酸に溶解し実験に用いた。

### 実験方法

卵巣摘除ラットにダイゼイン、ゲニステインを5 mg ずつおよび大豆抽出物を毎日1回、3週間に亘り胃ゾンデで経口投与した。エストロゲンの効果は17 $\alpha$ -エチニルエストラジオールを毎日0.1 mg/kg ずつ3週間に亘り経口投与することにより観察した。効果判定は血中の骨代謝マーカーを測定して行った。

## 結果と考察

骨吸収のマーカーである尿中ピリジノリン (Fig. 1) およびデオキシピリジノリン (Fig. 2) 排泄は、正常対照群では加齢と共に減少したが、卵巣摘除群では減少せずむしろ増加傾向がみられた。これは、エストロゲンの欠乏で骨吸収が抑制されなくなったためと考えられる。卵巣摘除ラットに17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール (0.1 mg/kg 体重) を3週間に亘り連続投与したところ、尿中ピリジノリンおよびデオキシピリジノリン値とも正常群とほぼ同程度に回復した。一方、大豆抽出物投与群では尿中ピリジノリン、デオキシピリジノリン値とも3週間後に卵巣摘除群と比べ有意の低値が認められた (Figs. 1, 2)。つまり、大豆抽出物がエストロゲンとほぼ同程度に骨吸収を抑制したものと考えられる。

一方、骨形成のマーカーである血清オステオカルシン値はどの実験群においても、有意に変動を示さなかった (Table 1)。これは、エストロゲンの有無によっても、骨形成はあまり影響を受けないことを示すのであろう。また、無機リン値もいずれの実験群においても有意の変動を示さなかった。

エストロゲンを投与すると、卵巣重量をほぼ正常化した。総コレステロールだけは正常値以下に低下させた (Table 1)。一方、大豆抽出物は子宮重量を多少増加させたが、対照値までには回復させなかった。これは大豆抽出物には、ごく弱いエストロゲン作用物質を含むに過ぎないことを示すものである。なお、この画分はエストロゲンとは異なり血中コレステロールは低下させなかった (Table 1)。

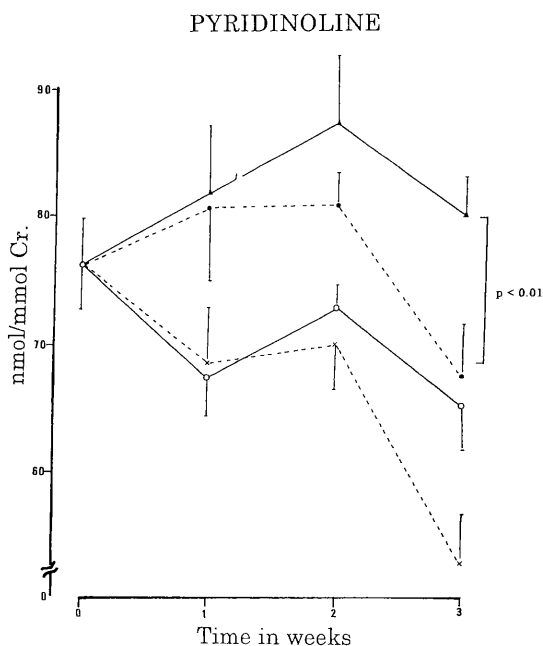


Fig. 1. Effects of estrogen and the soybean extract on the urinary excretion of pyridinoline in ovariectomized rats. Rats were ovariectomized at the age of 10 weeks old. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (0.1 mg/100 g body weight) and the soybean extract were given orally once a day for 3 weeks. Urinary concentrations of pyridinoline were expressed as pmol/ $\mu$ mol creatinine. Data are shown as means  $\pm$  SD. Each group consisted of 5 rats except the soybean extract treated group which consisted of 4 rats. ○—○, control rats; ▲—▲, ovariectomized rats; x---x, estrogen treated rats and ●---●, soybean extract treated rats.

大豆抽出物はイソフラボンと同様な効果を示すかどうかを知るために、次にイソフラボンの純品を投与してその効果を調べた。卵巣摘除ラットにゲニステインやダイゼインを3週間連続投与すると、ピリジノリンの尿中排泄は明らかに抑えられた (Fig. 3)。また、デオキシピリジノリンの尿中排泄も同様にゲニステイン

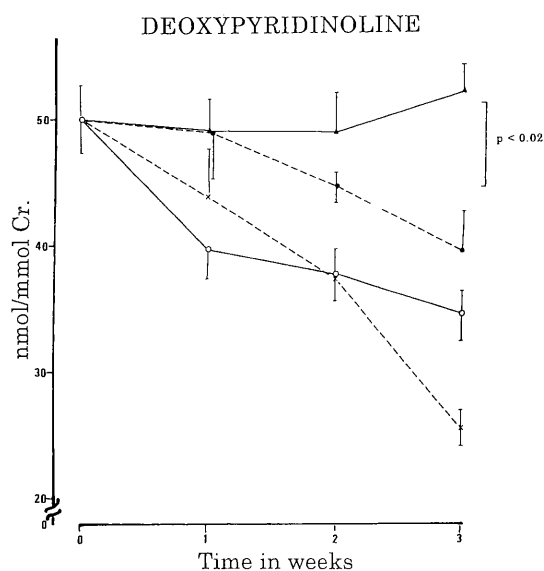


Fig. 2. Effects of estrogen and soybean extract on urinary deoxypyridinoline in ovariectomized rats. Urinary concentrations of deoxypyridinoline were expressed as pmol/ $\mu$ mol creatinine. Data are shown as means  $\pm$  SD. ○—○, control rats; ▲—▲, ovariectomized rats; x---x, estrogen-treated rats and ●---●, soybean extract treated rats.

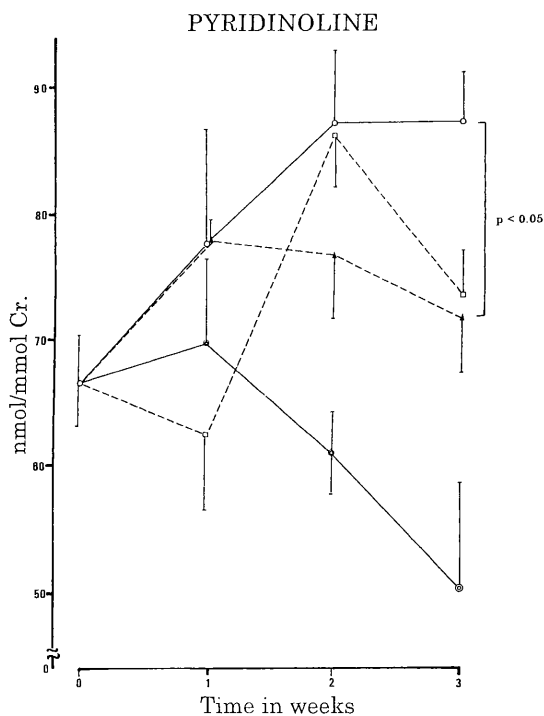


Fig. 3. Effects of genistein and daidzein on urinary pyridinoline in ovariectomized rats. Genistein and daidzein at the dose of 5 mg per rat were given orally for 3 weeks to ovariectomized rats. Each group consisted of 5 rats except the genistein-treated group which consisted of 4 rats. Data are shown as means  $\pm$  SD. ○—○, control rats; ○---○, ovariectomized rats; ▲---▲, genistein treated rats; and □---□, daidzein treated rats.

Table 1. Effect of estrogen and the soybean extract on biochemical parameters in ovariectomized rats

Animals	Osteocalcin (ng/mL)	Inorganic phosphate (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)
Control (5)	34.0 $\pm$ 1.1	8.0 $\pm$ 0.4	74.2 $\pm$ 3.2
Ovariectomized (Ox) (5)	42.4 $\pm$ 3.4	7.8 $\pm$ 0.4	89.4 $\pm$ 3.9
Ox + Estrogen (5)	30.4 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 0.3	39.0 $\pm$ 2.1
Ox + Soybean extract (4)	45.8 $\pm$ 3.8	7.8 $\pm$ 0.5	84.8 $\pm$ 3.4

Rats were ovariectomized at the age of 10 weeks old.  $17\alpha$ -Ethinylestradiol (estrogen) and the soybean extract were given orally once a day for 3 weeks to ovariectomized rats. Animals were killed at 3 weeks of the treatment and their sera were taken for biochemical analyses. Figures in parenthesis show the number of determinations.

およびダイゼインにより抑制された (Fig. 4)。しかしながら、子宮重量はいずれのイソフラボンによっても有意の変動を示さなかった。これらイソフラボンはフィトエストロゲンであると考えられているが、その子宮に対するエストロゲン作用はごく弱いことが示された。しかし、骨代謝に関しては明かな効果を示したので、骨組織にはかなり選択的に作用するものと推論される<sup>4)</sup>。

大豆に含まれるフィトエストロゲンとしては、ゲニステインとダイゼインが最も多いが<sup>5)</sup>、今回の実験ではそれ以外にも骨吸収をより強力に抑制する因子の存在が確認された。調べた大豆抽出物は弱いながらも子宮に対する作用があることから、フィトエストロゲンを含むと思われるが、イソフラボンにはないと推測される。クメスタンやリグナンもエストロゲン作用<sup>5)</sup>を有するので、その有効成分がそのいずれかに属する可能性がある。クメステロールが候補の一つとして挙げられるが、これは大豆にも含まれているクメスタンであり、その子宮に対する効果はイソフラボンの30倍ほどである<sup>5)</sup>。これはさらに卵巣摘除ラットにおいて骨吸収抑制作用を有することも報告されている<sup>6)</sup>。クメステロールは組織培養でも骨吸収阻止作用が証明されている<sup>7)</sup>。なお、この大豆抽出物に存在する有効物質の同定は現在進行中である。

## 要 約

大豆に含まれるどの成分が骨粗鬆症の予防に有効であるかを知るために、骨粗鬆症モデルである卵巣摘除ラットを用いて調べた。ゲニステインおよびダイゼインが骨吸収を抑制することを確認した。しかし、大豆画分の中にはこれらのイソフラボンとは異なる活性画分が認められた。この画分は子宮重量を僅かではあるが有意に増加させたので、フィトエストロゲンを含むと考えられる。しかし、それが既知の物質であるか、未知物質であるかは不明である。

## 文 献

- 1) 鈴木隆雄 (1996) : ライフスタイルと骨折予知. *Osteoporosis Japan*, **4**, 137-142.
- 2) Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T and Okada H (1991) : Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr*, **54**, 1093-1100.
- 3) 家森幸男, 寺本貴則, 福井 寛, 池田克己, 奈良安雄 (1998) : 大豆イソフラボンによる骨粗鬆症予防の可能性. *Bioindustry*, **15**, 5-19.
- 4) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S (1999) : Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.

## DEOXYPYRIDINOLINE

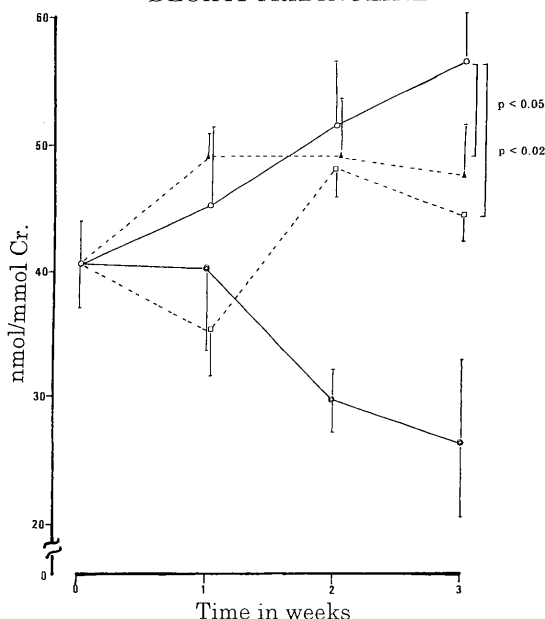


Fig. 4. Effects of genistein and daidzein on the urinary deoxypyridinoline in ovariectomized rats. Genistein and daidzein were given orally for 3 weeks at the dose of 5 mg per rat. Data are shown as means  $\pm$  SD. ○—○, control rats; ○---○, ovariectomized rats, ▲---▲, genistein treated rats, □---□, daidzein treated rats.

- 5) Kurzer MS and Xu X (1997): Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr*, **17**, 353-381.
- 6) Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB and Prince RL (1997): Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J Nutr*, **127**, 1795-1799.
- 7) Tsutsumi N (1995): Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. *Biol Pharm Bull*, **18**, 1012-1015.