

加齢ラットの骨代謝に対する大豆イソフラボン混合物投与の影響

海老沢秀道・腰原康子*

東京都老人総合研究所栄養学部門

Effects of Dietary Isoflavone-extract from Soybean Hypocotyl on Bone Metabolism in Ovariectomized Young and Old Female Rats

Hidemichi EBISAWA and Yasuko KOSHIHARA

Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015

Abstract

Isoflavones, such as genistein and daidzein were accepted as phytoestrogen that has similar structure to estrogen and functions with little effects on reproductive organs. Isoflavone extracted from soybean hypocotyl (IF) that contains daidzein and genistein in abundance is expected as dietary modulator for bone metabolism without side-effects. But, there are very few investigations that relate to dietary isoflavone and bone metabolism, especially in old animals. The purpose of this study was to elucidate the effects of dietary isoflavone on bone metabolism. Female Wistar rats aged 2 and 24 months old were received ovariectomy, and then the rats fed 0.5% IF (OVX-IFL) or 2.5% IF (OVX-IFH) isoflavone supplemented diet. In young rats, OVX IFH group showed significantly higher bone mineral density (BMD) and trabeculae in femur than that of control group, although no changes were observed in uterine weight in both groups. In old rats, IF did not increase bone mineral density and trabeculae in femur, although relatively lower bone resorption and relatively higher bone formation were observed in biochemical markers. These results suggest that dietary isoflavone has beneficial effects on bone metabolism in ovariectomized young rats, but not in old rat. Further experiments, with longer experimental period and increased number of rats were required in old rat. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 87-94, 2000.

Key words : isoflavone, bone metabolism, BMD, old rat, OVX

ゲニステインやダイゼイン等のエストロゲン様構造を持つイソフラボン¹⁾は生殖器に対する影響が少ない

ため、副作用の少ない骨代謝修飾因子として報告されている^{2,3)}。これらのイソフラボンを多量に含有する大豆イソフラボン混合物は食事性の骨粗鬆症抑制因子としての期待が高まっている。しかし、骨代謝と食事性

*〒 173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

の大豆イソフラボンとの関係は十分明らかにされていない。さらに数少ない報告は、そのほとんどが卵巣摘除した若齢期動物を用いた高骨代謝回転期モデルでの観察である^{2,3)}。本研究は、若齢ラットだけでなく高齢期ラットに大豆イソフラボンを投与して骨代謝マーカー、骨密度、骨構造などを測定し、加齢ラットの骨代謝に対する大豆イソフラボンの影響を観察した。

方 法

実験動物は、卵巣摘除した2カ月齢あるいは24カ月齢のウィスター系雌ラットを用いた。実験群として、OVX-CA群（20%カゼインたん白質食（20CA）投与）、OVX-IFL群（20CA+0.5%ソヤフラボンE（不二製油（株））添加食投与）、OVX-IFH群（20CA+2.5%ソヤフラボンE添加食投与）およびOVX-E2群（20CA食投与+17 β -estradiol皮下投与（10 μ g/day））を設けた。この他に擬手術を施したSham群（20CA食投与）を設けた。実験食期間は、若齢ラット12週間、高齢ラット8

週間とした。実験食組成はTable 1に示した。OVX-IFH群の飼料中イソフラボン含有量は、ダイゼイン類、ゲニステイン類およびグリシテイン類合計で1 mg/gと計算された。実験食期間終了時に、血液分析、子宮重量、骨代謝関連物質を測定した。また、DEXA法により左大腿骨の骨密度を測定した。大腿骨骨密度は、Fig. 1の様に部位別の測定を行った。さらに、エックス線 μ CTスキャンによる大腿骨の構造解析を行った。実験データは、一元配置分散分析を行った後、Bonferroniのmultiple range testにより各群間の有意差検定を行った。

結果と考察

体重変化

実験食期間中の体重変化をFig. 2に示した。若齢ラットは、いずれの群も、実験食期間を通して体重は増加した。しかし、OVX-IFH群はOVX-CA群に比べてやや低い体重を示し、エストロゲン欠乏による肥満傾向

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	Control	IFL	IFH	E2	Sham
	g	g	g	g	g
Isoflavone extract ¹	0.0	5.0	25.0	0.0	0.0
Casein	229.9	229.9	229.9	229.9	229.9
α -Corn starch	400.6	396.7	383.4	400.6	400.6
Sucrose	200.1	198.4	191.7	200.1	200.1
Cellulose powder	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Vitamin mixture	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Total amounts	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0
Isoflavone contents (mg/g diet)	0	0.2	1.0	0	0
Soyaflavone-E		Isoflavone components in Soyaflavone-E			
	g/100 g		g/100 g		g/100 g
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

¹ Soyaflavone-E, gifted from Fuji Oil Co., Osaka.

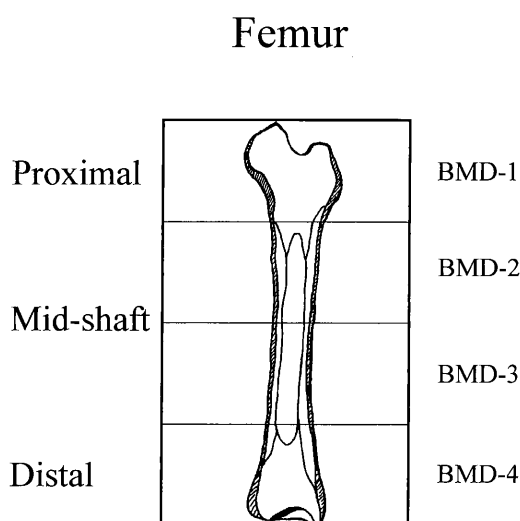


Fig. 1. Image of femur obtained by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). The field of femur was divided into four parts with equal length in computer image, then bone mineral density of the divided area was measured individually.

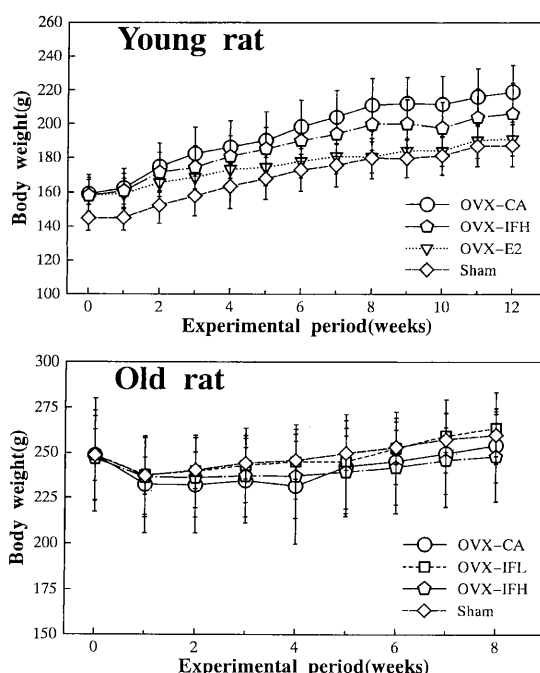


Fig. 2. Changes in body weight in young and old rats. Each value represents mean $\pm$ SD.

は大豆イソフラボン混合物投与によって抑制された。一方高齢ラットにおいては、卵巣摘除および大豆イソフラボン混合物投与による、明らかな体重の違いは観察されなかった。

摂食量、血清アルブミンおよび血清カルシウム濃度

平均摂食量、血清アルブミンおよびカルシウム濃度の結果を Table 2 に示した。若齢ラットでは飼料を食べ残したが、OVX-CA 群と OVX-IFH 群の摂食量に有意差はなかった。高齢ラットは与えた飼料の全てを摂取した。その結果、OVX-IFH 群の平均イソフラボン摂取量は、

Table 2. Effects of isoflavone extract on food intake, serum albumin and serum calcium concentration

	n	Food intake	Albumin	Calcium
		g/day	g/100 mL	mg/100 mL
Young rat				
OVX-CA	6	10.4 $\pm$ 1.2 ^a	3.4 $\pm$ 0.3 ^a	10.5 $\pm$ 0.5 ^a
OVX-IFH	6	10.5 $\pm$ 1.2 ^{ab}	3.5 $\pm$ 0.2 ^a	10.5 $\pm$ 0.3 ^a
OVX-E2	8	11.2 $\pm$ 0.6 ^b	4.5 $\pm$ 0.3 ^b	11.7 $\pm$ 0.4 ^b
Sham	6	10.2 $\pm$ 1.0 ^a	3.6 $\pm$ 0.2 ^a	10.6 $\pm$ 0.5 ^a
Old rat				
OVX-CA	4	13	4.0 $\pm$ 0.4 ^a	10.1 $\pm$ 0.4 ^a
OVX-IFL	3	13	3.6 $\pm$ 0.1 ^a	10.3 $\pm$ 0.1 ^a
OVX-IFH	3	13	4.0 $\pm$ 0.2 ^a	10.4 $\pm$ 0.6 ^a
Sham	3	13	3.7 $\pm$ 0.2 ^a	10.3 $\pm$ 0.7 ^a

Each value represents mean $\pm$ SD. Values with different superscript letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$.

若齢ラットおよび高齢ラットでそれぞれ 10.5 mg/日および 13 mg/日と計算された。若齢ラット血清アルブミンおよび血清カルシウム濃度は、若齢ラットおよび高齢ラットいずれも、OVX-CA 群と OVX-IFH 群間に有意差はみられなかった。

臓器重量

実験食期間終了時における子宮、肝および腎重量を測定した (Table 3)。石見ら⁴⁾は、5 mg/日のゲニステイン経口投与によって子宮重量の顕著な増加を認めている。若齢ラットの子宮重量は卵巣摘除によって有意に減少した。OVX-E2 群の子宮重量は Sham 群より有意に高い値を示した。しかし、平均イソフラボン摂取量が 10.5 mg/日だった OVX-IFH 群の子宮重量は OVX-CA 群と有意差はみられず、本研究で用いた大豆イソフラボン混合物は若齢ラットの子宮重量を増加させなかった。一方、高齢ラットにおいても卵巣摘除によって子宮重量は減少したが、OVX-CA 群に比べて OVX-IFH 群の子宮および腎臓重量は、僅かに高値傾向を示した。

骨形成マーカー

血清オステオカルシン濃度 (OC) およびアルカリフォスファターゼ活性 (ALP) を測定し、骨形成に対する大豆イソフラボン混合物の影響を観察した (Fig. 3)。若齢ラットにおける血清 OC および ALP は、卵巣摘除によって上昇傾向を示した。しかし、OVX-CA 群に比べて OVX-IFH 群は有意な低値を示し、卵巣摘除による骨形成関連物質の上昇は大豆イソフラボン混合物によって抑制された。

一方、高齢ラットの血清 OC および ALP は、Sham 群と OVX-CA 群間に有意差は認められなかった。しかし、OVX-CA 群に比べて OVX-IFH 群ではこれら骨形成関連物質は高値傾向を示し、高齢ラットの骨形成は大豆イソフラボン混合物によって高まることが推定された⁵⁾。

骨吸収マーカー

尿中デオキシピリジノリン排泄量 (DPN) および破骨細胞形成を促進する IL-6 の血清濃度を測定し、骨吸収に対する大豆イソフラボンの影響を観察した (Fig. 4)。若齢ラットにおける尿中 DPN および血清 IL-6 は、卵巣摘除によって上昇傾向を示した。しかし、大豆イソフラボン混合物によってこれらの指標はいずれも低下する傾向を示し、血清 IL-6 濃度は OVX-E2 群のレベルまで抑制された。以上のように、卵巣摘除による骨吸収の亢進は大豆イソフラボンによって抑制されることが示された⁶⁾。

一方、高齢ラットでは、OVX-IFH 群の尿中 DPN は、OVX-CA 群の 65% の低値を示した。

以上、骨代謝関連物質の結果から、本研究で用いた大豆イソフラボン混合物は、若齢ラットに対しては卵巣摘除による骨代謝回転の亢進を抑制し、高齢ラットに対しては骨吸収を抑制する一方骨形成を促進するものと考えられた。

大腿骨骨密度

ラットの左大腿骨の骨密度 (BMD) を測定し、Fig. 5 に示した。若齢ラットにおける大腿骨全体の BMD は、卵巣摘除によって有意に低下した。しかし、OVX-CA

Table 3. Effects of isoflavone extract on organ weights

	n	Body weight	Uterus	Liver	Kidney
		g	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
Young rat					
OVX-CA	6	220.9 ± 15.4 ^a	0.74 ± 0.57 ^a	26.0 ± 3.3 ^a	5.08 ± 0.27 ^a
OVX-IFH	6	206.1 ± 18.9 ^a	0.63 ± 0.31 ^a	25.6 ± 3.5 ^a	4.97 ± 0.45 ^a
OVX-E2	8	187.5 ± 9.8 ^b	2.07 ± 0.59 ^b	31.5 ± 3.2 ^b	5.89 ± 0.32 ^b
Sham	6	185.5 ± 12.5 ^b	1.73 ± 0.49 ^b	21.7 ± 2.7 ^c	4.80 ± 0.46 ^a
Old rat					
OVX-CA	4	254.0 ± 20.6 ^a	1.67 ± 0.24 ^a	27.3 ± 3.1 ^a	5.66 ± 0.26 ^a
OVX-IFL	3	263.6 ± 19.9 ^a	2.19 ± 0.87 ^a	42.5 ± 25.1 ^a	6.18 ± 0.72 ^a
OVX-IFH	3	247.9 ± 25.1 ^a	2.14 ± 0.70 ^a	32.9 ± 7.2 ^a	6.50 ± 0.44 ^a
Sham	3	259.7 ± 11.6 ^a	4.07 ± 1.02 ^a	37.4 ± 12.4 ^a	6.09 ± 0.11 ^a

Each value represents mean ± SD. Values with different superscript letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$.

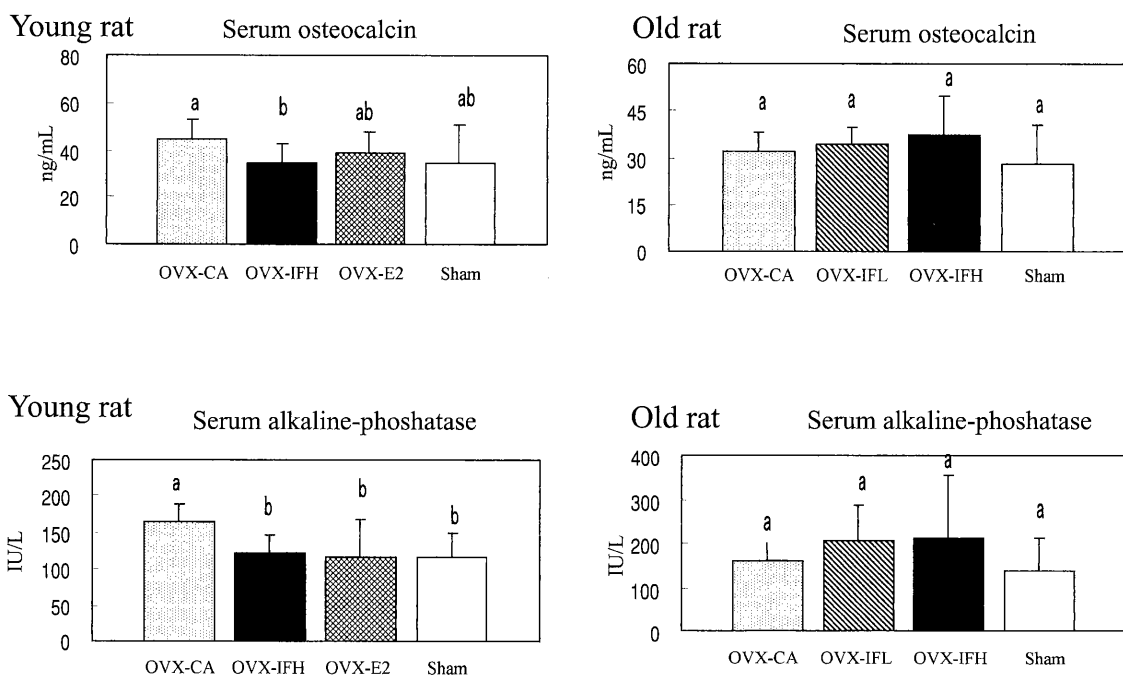


Fig. 3. Effect of isoflavone extract on serum osteocalcin concentration and alkaline phosphatase activity. Each value represents mean $\pm$ SD. Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

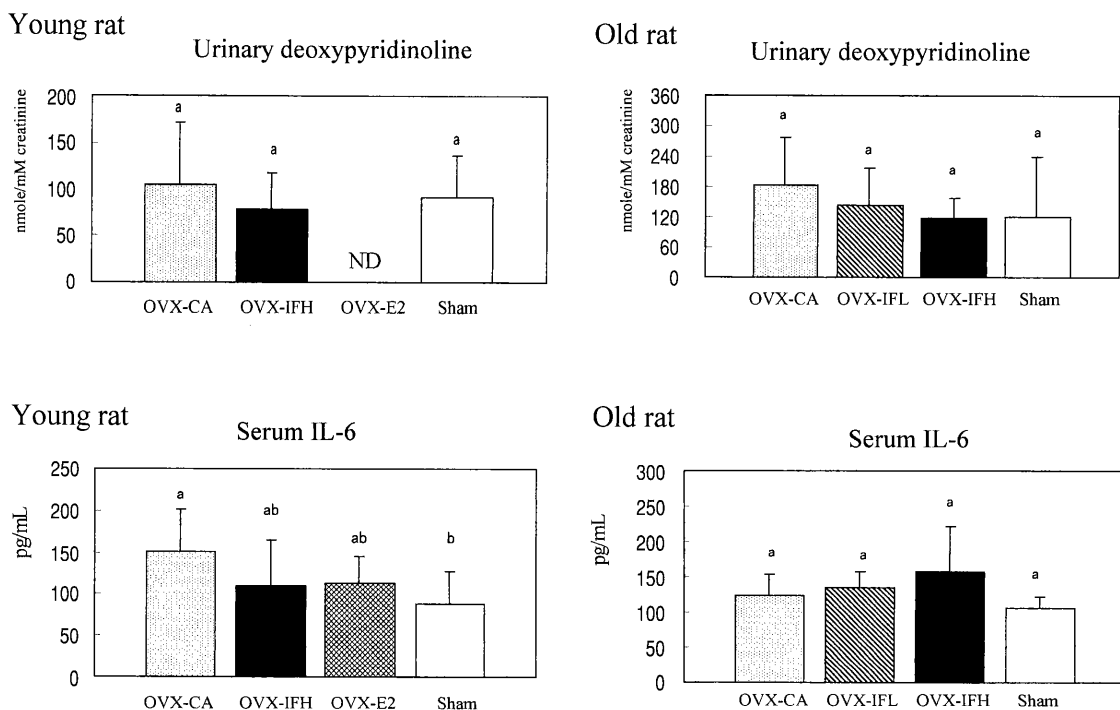


Fig. 4. Effect of isoflavone extract on urinary deoxypyridinoline and serum interleukin-6. Each value represents mean $\pm$ SD. Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

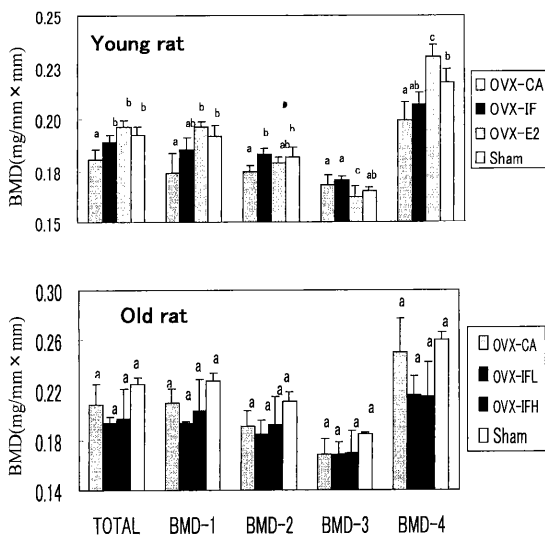


Fig. 5. Effect of isoflavone extract on bone mineral density in femur. Bone mineral density was measured in whole and divided areas. Each value represents mean $\pm$ SD. Bars with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

群に比べて OVX-IFH 群は大腿骨全体および部位別いずれにおいても明らかに高い BMD を示し、卵巣摘除による大腿骨 BMD の低下は大豆イソフラボン混合物によって抑制された。以上のように、本研究で用いた大豆イソフラボン混合物は、ゲンistein 単独投与実験の結果と同様に⁷⁾、若齢ラットの骨密度の維持に有効なことが示された。

一方、高齢ラットの BMD は例数が少ないことも反映して大きな個体差を示し、大腿骨全体および部位別いずれでも、大豆イソフラボン混合物による BMD の上昇は観察されなかった。

以上のように、若齢ラットと高齢ラットでは大豆イソフラボンに対する反応が異なっていた。ラットは高齢期まで骨密度が増加する⁸⁾ので、高齢ラットではより長期の観察が必要と考えられた。

大腿骨構造解析

X 線 μ CT スキャンによる大腿骨構造解析を行った。若齢ラットにおける μ CT 画像を Fig. 6 に、高齢ラットにおける近位端側 μ CT 画像は Fig. 7、遠位端側 μ CT 画像は Fig. 8 に示した。

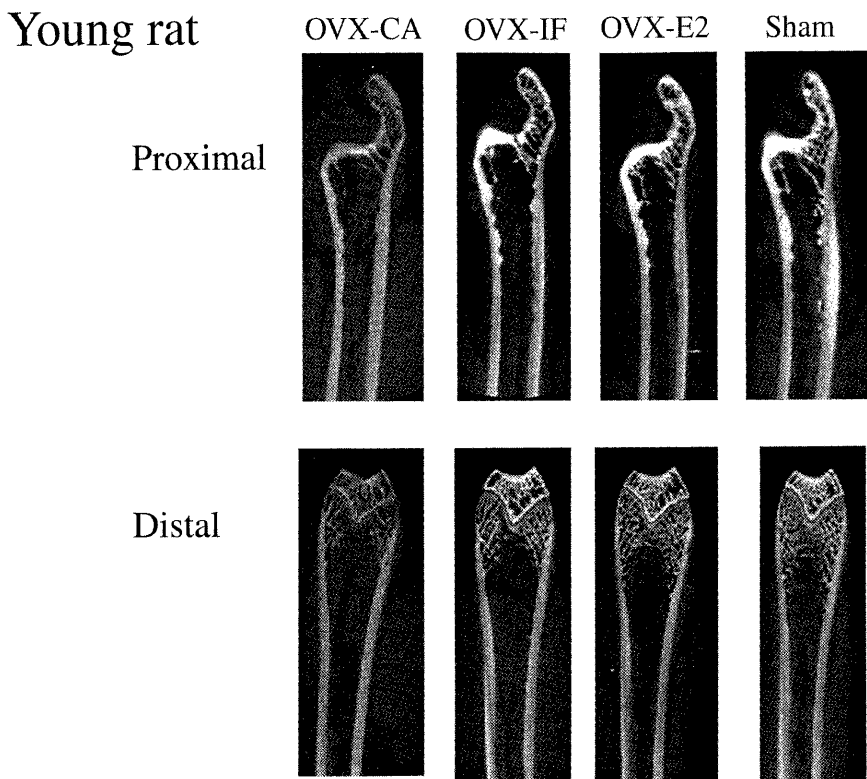


Fig. 6. Effect of isoflavone extract on two-dimension structure in femur in young rat by means of micro-CT image scanner. White part indicates high bone mineral density. A lot of trabeculas were seen in cancellous bone.

Old rat

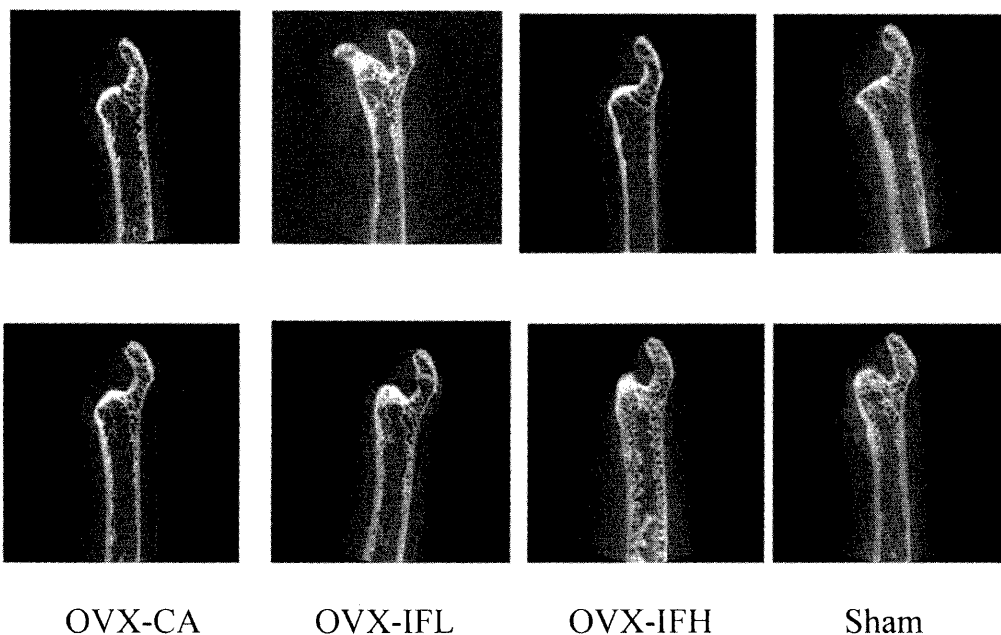


Fig. 7. Effects of isoflavone extract on two-dimension structure in proximal region of femur in old rat by means of micro-CT image scanner. White part indicates high bone mineral density. A lot of trabeculas were seen in cancellous bone.

Old rat

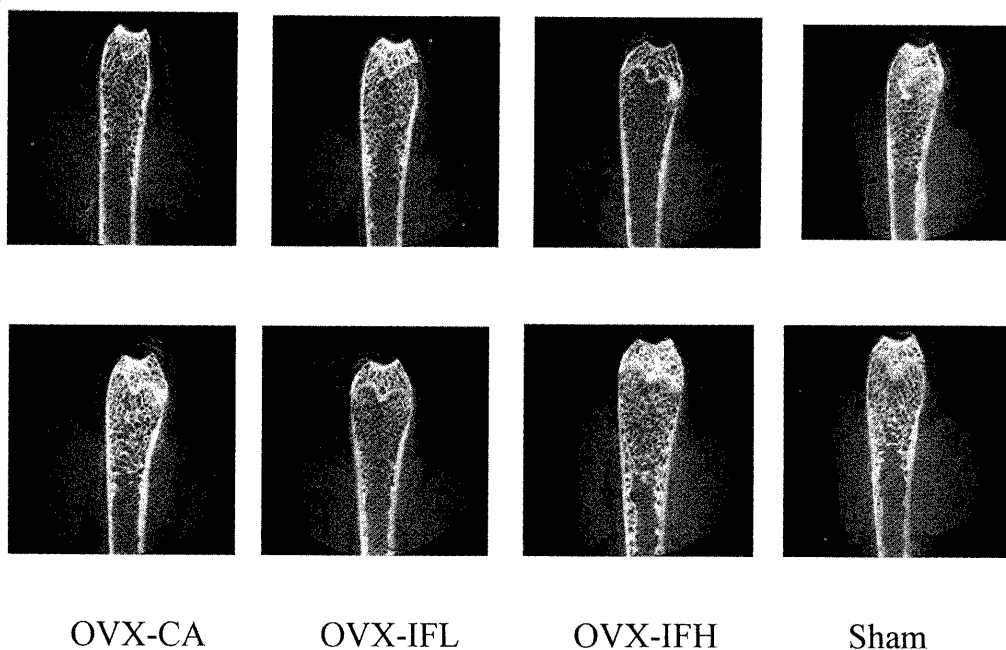


Fig. 8. Effect of isoflavone extract on two-dimension structure in distal region of femur in old rat by means of micro-CT image scanner. White part indicates high bone mineral density. A lots of trabeculas were seen in cancellous bone.

若齢ラットおよび高齢ラットいずれも、卵巣摘除による骨梁構造の減少が近位端および遠位で観察された。若齢ラットの大腿骨は、イソフラボン混合物投与によって、遠位端における骨梁構造が増加し、また近位端における皮質骨の骨密度が強調された。以上のように、若齢ラット大腿骨の骨の構造は、BMDの結果と一

致して、大豆イソフラボン混合物投与によって改善された。

一方、高齢ラットは極めて大きな個体差を示し、大豆イソフラボン混合物摂取による大腿骨構造の一定した変化傾向は観察されなかった。

要 約

卵巣摘除雌ラットに2.5%大豆イソフラボン混合物添加食を投与した。その結果、1) 若齢ラットの子宮重量は影響を受けなかったが、高齢ラットの子宮および腎重量は僅かに増加傾向を示した。2) 骨代謝関連マーカーの測定結果から、若齢ラットでは卵巣摘除による骨代謝回転の亢進が抑制され、高齢ラットでは骨吸収の抑制と同時に骨形成の促進が推定された。3) 若齢ラットの大腿骨骨密度は上昇したが、高齢ラットでは大腿骨骨密度の上昇は本研究では確認できなかった。4) 若齢ラットの遠位端における骨梁構造および近位端における皮質骨量の増加が推定されたが、高齢ラットの骨の構造は一定の変化を示さなかった。以上から、大豆イソフラボン混合物は、卵巣摘除若齢ラットの亢進した骨代謝回転を正常化して、骨密度減少を抑制する事が推定された。一方、高齢ラットについては、多数例での追加実験あるいは大豆イソフラボン混合物の投与期間について、更に検討する必要があるものと考えた。

文 献

- 1) Miksicek JF (1995): Estrogenic flavonoids : Structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, **208**, 44-50.
- 2) Fanti P (1998): The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int*, **8**, 274-281.
- 3) Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K and Tsuji K (1998): 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.
- 4) 石見佳子, 荒井直子, 梅垣敬三, 王 新祥, 呉 堅, 宮浦千里, 武田明治, 池上幸江 (2000): 卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物における大豆イソフラボン大量投与の生体影響について。第54回日本栄養・食糧学会大会要旨集 p. 186.
- 5) Gao YH and Yamaguchi M (1999): Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture : Comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem*, **194**, 93-97.
- 6) Yamaguchi M (1998): Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol*, **55**, 71-76.
- 7) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato Y, 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.
- 8) Umemura Y, Ishiko T, Tsujimoto H, Miura H, Mokushi N and Suzuki H (1995): Effects of jump training on bone hypertrophy in young and old rats. *Int J Sports Med*, **16**, 364-376.