

棘梨熱水抽出物給与がラットのカルシウム吸収・骨代謝に及ぼす影響

平 林 美 穂, 平 原 さつき, 松 井 徹, 植 木 規*, 矢 野 秀 雄
(京都大学農学部, *エーザイ株)

Effect of Cili Extract on Calcium Absorption and Bone Metabolism in Rats.

Miho Hirabayashi, Satsuki Hirabara, Tohru Matsui, Hitoshi Ueki* and Hideo Yano

(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto university, *Animate Division, Eisai Co. Ltd.)

To investigate whether cili extract affects calcium absorption, 3-week old male Wistar rats were fed a diet containing 4.5% cili extract or a control diet. At 23days after the initiation of feeding trial, the animals were subjected to 5-days balance study. At 28days, plasma, small intestine and femur were collected. Transepithelial calcium transport of rats fed cili extract was examined using the everted gut sac procedure. Cili extract was considered to promote calcium transport in the upper small intestine and to affect the saturable pathway. Longitudinal growth of femur was significantly ($P < 0.01$) suppressed by cili extract, while specific gravity, density and calcium content were significantly ($P < 0.05$) increased. On the other hand, plasma calcitonin, bone turnover indices ie. tartrate-resistant acid phosphatase and alkaline phosphatase in femur were not changed by cili extract. These actions of cili extract were similar to those of phytoestrogen.

刺梨 (Cili: *Rosa roxburghii*) は中国西南地域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目的とした漢方薬や健康飲料として用いられている。一方棘梨熱水抽出物は産卵鶏のカルシウム吸収を促進し, 卵殻強度を高めることが示唆されているが (池谷守司, personal communication), 棘梨熱水抽出物がカルシウム吸収を促進する作用機構は明らかではない。そこで本試験では, デキストリン製剤に加工した刺梨熱水抽出物をラットに給与し出納試験および *in vitro* 吸収試験を行うことにより, 刺梨熱水抽出物がカルシウム吸収に及ぼす影響を検討した。あわせて, 血液分析, 骨の物理形態測定を行うことによりカルシウム代謝および骨代謝への影響を調べた。

実 験 方 法

3 週齢ウィスター系雄ラット24頭を12頭ずつ2区に分け, 棘梨デキストリン製剤を含む試験食 (棘梨熱水抽出物として4.5%含有), あるいは等量のデキストリンを含む対照食を4週間給与した。給与開始

後23日目から27日目の5日間出納試験を行い、糞および尿を採取した。27日目は給餌を行わず28日目に小腸、血液および大腿骨を採取した。小腸は胃の幽門部から10cmを小腸上部、回盲接合部から10cmを小腸下部として、それぞれ長さ約5cmの反転腸サックを作成し、in vitro カルシウム吸収能測定試験に供した。各試験食区の反転腸サックは0.5mMあるいは12.5mMのカルシウムを添加した、10g/Lのポリエチレングリコール（PEG）を含むModified-Rock buffer中で培養した。漿膜側にはカルシウムは無添加で、10g/LのPEGを含むModified-Rock bufferを注入した。95% O₂/5% CO₂のガスを連続通気した37℃の環境下で90分間培養した後、切開して漿膜側溶液を採取した。漿膜側溶液と粘膜側溶液のカルシウム濃度を測定し、粘膜側溶液から漿膜側溶液のカルシウム吸収能を下式を用いて求めた。なお反転腸サック内に水が流入することによって漿膜側溶液のカルシウム濃度が低下するため、あらかじめ培養液中に添加しておいたPEG濃度を測定し、このPEGの濃度変化を基に水の流入の補正を行った。

$$\text{カルシウム吸収能} = (\text{漿膜側カルシウム濃度} / \text{粘膜側カルシウム濃度}) \times (\text{培養後 PEG 濃度} / \text{培養前 PEG 濃度})$$

左大腿骨は骨端と骨髓を取り除きホモジェナイズした後、p-ニトロフェニルリン酸法により酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）活性およびアルカリ性フォスファターゼ（ALP）活性を測定した。右大腿骨は軟組織を取り除き物理形態を測定した後、乾式灰化を行った。飼料、糞および尿は湿式灰化後、血漿はトリニトロ酢酸による除タンパク後に原子吸光法によりカルシウム含量を測定した。血漿中カルシトニン濃度はカルシトニンキット（三菱油化）を用いて測定した。

結 果 と 考 察

棘梨区と対照区の採食量に差はなく、増体量にも差は認められなかった。両区間のカルシウム摂取量にも差はなかったが（Table 1）、棘梨区の見かけのカルシウム吸収率は対照区に比べて高い傾向（ $P = 0.095$ ）を示した。また棘梨区の尿中カルシウム排泄量も対照区に比べて増加する傾向（ $P = 0.068$ ）を示し、棘梨区のカルシウム保有率は上昇する傾向（ $P = 0.101$ ）が認められた。これらの結果から、棘梨熱水抽出物給与はラットのカルシウム吸収を促進することが示唆された。

棘梨食あるいは対照食を給与したラットの反転腸サックを用いたin vitro カルシウム吸収能測定試験において、0.5mM カルシウム培養液中では小腸上部のカルシウム吸収能は棘梨区の方が対照区より高い傾向（ $P = 0.272$ ）が認められた（Table 2）。一方、小腸下部のカルシウム吸収能に両区間の差は認められなかった。12.5mM カルシウム培養液中では、小腸上部・下部ともに両試験食間のカルシウム吸収能に有意な差は認められなかった。反転腸サック試験での能動的カルシウム輸送のKm値は約0.35mMであることから¹⁾、本試験で用いた0.5mM カルシウム培養系におけるカルシウム吸収能は能動的カルシウム輸送、12.5mM カルシウム培養系におけるカルシウム吸収能は受動的カルシウム輸送を表していると考えられる。以上の結果より、棘梨熱水抽出物は小腸上部の能動的カルシウム輸送を促進することによって、カルシウム吸収を促進する可能性が示唆された。

Table 1. Effect of Cili extract on calcium balance

	Control	Cili	Probability
Intake (mg)	79.3 ± 2.3	79.2 ± 3.0	0.980
Fecal excretion (mg)	22.2 ± 1.4	19.3 ± 1.5	0.180
Apparent absorption (%)	72.2 ± 1.2	75.7 ± 1.6	0.095
Urinary excretion (mg)	0.24 ± 0.02	0.33 ± 0.04	0.068
Retention (%)	71.9 ± 1.2	75.3 ± 1.5	0.101

Table 2. Effect of Cili extract on transepithelial calcium transport in the everted small intestinal segments¹

	Control	Cili	Probability
0.5mM Calcium			
upper segment	0.98 ± 0.18	1.24 ± 0.14	0.272
lower segment	1.41 ± 0.10	1.40 ± 0.26	0.987
12.5mM Calcium			
upper segment	0.53 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.283
lower segment	0.70 ± 0.15	0.76 ± 0.06	0.609

¹Calcium transport = (calcium concentration in serosal side/calcium concentration in mucosal side) × (PEG concentration of post-incubation/PEG concentration of pre-incubation).

刺梨食摂取ラットの骨長は対照区と比較して短く有意な差 ($P=0.007$) が認められた (Table 3)。一方、骨幅と湿重量には両区間で差は生じなかったが、棘梨区の体積は対照区に比べ減少する傾向 ($P=0.158$) を示し、結果として棘梨区の大腿骨比重 ($P=0.014$) および骨塩密度 ($P=0.010$) は有意に高値を示した。乾重量あたり的大腿骨中カルシウム含量も、棘梨区の方が対照区に比べ有意に ($P=0.028$) 高値を示した。棘梨区では骨塩密度が増加したが、骨代謝回転の指標となる TRAP 活性および ALP 活性は棘梨区と対照区の間に差は認められなかった。また血漿中カルシトニンおよびカルシウム濃度においても棘梨区と対照区の間に差は認められなかった。刺梨熱水抽出物給与により長骨の長軸方向への成長抑制、骨密度の増加および小腸上部における能動的カルシウム吸収の増加傾向が観察された。性ホルモンであるエストロゲン投与により骨伸長の抑制²⁾、骨塩密度の増加³⁾ および腸管カルシウム吸収の促進⁴⁾ が報告されているが、棘梨熱水抽出物の作用はエストロゲンの作用に類似している。多くの植物にはエストロゲン活性を有する多種のイソフラボン、いわゆる植物エストロゲンが含まれることが知られている。イソフラボンの誘導体であるイプリフラボンは骨吸収を抑制し^{5,6)}、骨形成を促進する⁷⁾ ことが報告されている。しかしながらイプリフラボンを雄ラットに給与すると、骨密度と骨強度は増加したが骨代謝回転の指標となる骨中 ALP 活性や血中カルシトニン濃度は変わらなかったことが報告されている^{8,9)}。大豆などの植物には植物エストロゲンであるゲニステインやダイゼインがグリコシドの形で存在しており、卵巣摘出ラットにこれらグリコシドを含む大豆タンパク質を給与すると骨密度が増加するが、卵巣摘出による TRAP と ALP 活性亢進を抑制しなかったことが報告されている¹⁰⁾。そこで棘梨熱水抽出物にもこれら植物エストロゲンが含まれている可能性がある。植物エ

トロジェンは熱水抽出によって容易に抽出されるが、棘梨熱水抽出物を分析した結果、ゲニステイン、ダイゼインや、これらのグリコシド化合物であるゲニスチンおよびダイジン検出できなかった。しかしながら棘梨と同じバラ科の植物の果実中に植物エストロジェンの一種であるプルネチンが存在するという報告があることから¹¹⁾、棘梨熱水抽出物にはプルネチンが含まれている可能性が考えられる。

Table 3. Effect of Cili extract on femoral characteristics

	Control	Cili	Probability
Length (mm)	30.7 ± 0.1	29.9 ± 0.2	0.007
Width (mm)	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.659
Wet weight (g)	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.453
Volume (cm ³)	0.48 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.158
Specific gravity (g/cm ³)	1.38 ± 0.01	1.41 ± 0.01	0.014
Density (g/cm ³)	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.010
Calcium content (μg/g)	207 ± 1	213 ± 1	0.028
TRAP ¹ (μmol/mg protein/30min)	4.11 ± 0.32	4.53 ± 0.34	0.377
ALP ² (μmol/mg protein/15min)	8.20 ± 0.55	8.26 ± 0.61	0.944

¹TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase. ²ALP, alkaline phosphatase.

Table 4. Effect of Cili extract on calcitonin and calcium concentration in plasma

	Control	Cili	Probability
Calcitonin (pg/ml)	28.3 ± 2.1	24.1 ± 3.2	0.276
Calcium (mg/l)	101 ± 0.01	101 ± 1.00	0.786

ヒト骨粗鬆症の治療薬としてエストロジェンが用いられる場合があるが、生殖器に対する作用および発ガン性などの副作用の問題がある¹²⁾。植物エストロジェンは、動物由来のエストロジェンに比べて生殖器に対する作用は弱く、骨に対しては同等の作用を有することから^{10,13)}、現在イプリフラボンが動物エストロジェンに代わる骨粗鬆症の治療薬として注目されている。本結果から、棘梨には大豆タンパク質に含まれる植物エストロジェンとは異なる種類の植物エストロジェンが存在する可能性が示唆された。今後、棘梨熱水抽出物の骨量増加作用を呈する物質の同定等のさらなる検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) Goda, T., Takase, S. and Hosoda, N. (1993) Maltitol-induced increase of transepithelial transport of calcium in rat small intestine. J.Nutr. Sci.Vitaminol. 38 : 589-595.
- 2) Hunziker, E. B. (1988) Growth plate structure and function. Pathol. 28 : 1143-1153.
- 3) Turner, R. T., Evans, G. L. and Wakley, G. K. (1994) Reduced chondroclast differentiation results in increased cancellous bone volume in estrogen-treated growing rats. Endocrinology 134 : 461-466.
- 4) Arjmandi, B. H., Salih, M. A., Herbert, D. C., Sims, S. H. and Kalu, D. N. (1993) Evidence for estrogen

receptor-linked calcium transport in the intestine. Bone and Mineral 21 : 63-74.

- 5) Albanese, C. V., Cudd, A., Argentino, L., Zambonin-Zallone, A. and Machintyre, I. (1994) Ipriflavone directly inhibits osteoclastic activity. B. B. R. C. 199 : 930-936.
- 6) Benvenuti, S., Petilli, M., Frediani, U., Tanini, A., Fiorelli, G., Bianchi, S., Bernabei, P. A., Albanese, C. and Brandi, M. L. (1994) Binding and bioeffects of ipriflavone on a human preosteoclastic cell line. B. B. R. C. 201 : 1084-1089.
- 7) Cheng, S. L., Zhang, S. F., Nelson, T. L., Warlow, P. M. and Civitelli, R. (1994) Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. Calcif. Tissue Int. 55 : 356-362.
- 8) Civitelli et al. (1995) Ipriflavone improves bone density and biomechanical properties of adult male rat bones. Calcif. Tissue Int. 56 : 215-219.
- 9) Watanabe, K., Takekoshi, S. and Kakudo, K. (1992) Effects of ipriflavone on calcitonin synthesis in C cells of the rat thyroid. Calcif. Tissue Int. 51 (supple. 1) : S27-S29.
- 10) Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stracewicz-sapuntzakis, M., Guo, P. and Kukreja, S. C. (1996) Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. J. Nutr. 126 : 161-167.
- 11) Bradbury, R. B. and White, D. E. (1954) Estrogens and related substances in plants. Vitam. Hormon. 12 : 207-233.
- 12) Genant, H. K., Baylink, D. J. and Gallagher, J. C. (1989) Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. Am. J. Obstet. Gynecol. 161 : 1842-1846.
- 13) Farmakalidis, E., Hathcock, J. N. and Murphy, B. (1985) Oestrogenic potency of genistein and daidzein in mice. Food Chem. Toxicol. 23 : 741-745.