

## 卵巣摘出ラットの骨に対するキノコ摂取の効果

長谷川 幸 雄

Effect of Fungi on Preventing Bone Loss in Ovariectomized Rats

Yukio Hasegawa

### 緒 言

私達の骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が行われ、成長後も骨形成と骨吸収が平衡状態である<sup>1)</sup>。骨代謝は、副甲状腺ホルモン (PTH) や1,25水酸化ビタミンDなどのカルシウム調節ホルモンを中心とした全身的なカルシウム代謝調節機構の制御下に置かれている。このうち、血液中のカルシウム濃度の維持に中心的な役割を演じているのが副甲状腺ホルモンであり、ビタミンDは主にカルシウム・リンの腸管吸収の促進などを介して、骨へのそれらの蓄積およびカルシウム代謝平衡の維持に携わっている。また、さらに、カルシウム調節ホルモンに加えて、エストロゲンに代表される性ホルモン、副腎皮質ホルモンなども骨代謝に大きな影響を及ぼしている<sup>2)</sup>。

その平衡状態から何らかの原因で崩れることにより、骨吸収が骨形成を上回る状態が持続した場合に骨粗鬆症という症状は起こる<sup>3)</sup>。骨粗鬆症は骨吸収が進行する為、破骨細胞が骨の柱である骨梁に穴をあけることにより、骨梁に断続する海綿骨の構造が連続性に低下し<sup>4)</sup>、骨強度が低下した状態・症状が見られる<sup>5)</sup>。この骨粗鬆症は女性の閉経後骨粗鬆症と老人性骨粗鬆症に大別でき、中でも老年期の女性の患者数が大半を占める閉経後骨粗鬆症は、閉経に伴う女性ホルモンであるエストロゲンの分泌低下がその発生原因の大きな要因である事が考えられている<sup>6)</sup>。

近年、寿命が長くなるにつれて、閉経期後女性の閉経後骨粗鬆症が問題となり、その予防・治療法が検討されつつある。

著者は日常の身近な食材の摂取による閉経後骨粗鬆症予防についての研究を進めているが、今回はきのこ類に注目した。

きのこ類は、エルゴステロールを約0.2% (乾物) 含んでいる。このエルゴステロールは紫外線的作用でビタミンD<sub>2</sub>に変化する<sup>7)</sup>。ビタミンD<sub>2</sub>は腸管からのカルシウム・リンの吸収を促進することで血中のカルシウムイオン・リン積を増加し、骨の石灰化に必要な環境を形成

する<sup>8)</sup>。(骨形成)しかし、最も強力な作用は骨吸収促進作用である。ビタミンD受容体も副甲状腺ホルモン受容体と同様に成熟した破骨細胞には存在せず、骨芽細胞、破骨細胞の前駆細胞に存在する。従って、活性型ビタミンDの骨吸収作用も副甲状腺ホルモンと同様、破骨細胞への直接作用ではないといえる。

最近では、卵巣摘出マウスに易消化性糖質のトレハロースを経口投与し、骨重量および骨梁の減少が抑制されたという報告<sup>9)</sup>がある。一方トレハロースはカルシウムの吸収には影響を与えないという報告<sup>10)</sup>もある。

きのこには、このトレハロースが約10~15%含まれている<sup>11)</sup>。トレハロースは、グルコースが $\alpha$ 1.1結合した二糖類の一種であり、自然界に、藻類、菌類、昆虫、無脊椎動物などにおいて広く分布されており、微生物においてはエネルギー貯蔵物質、昆虫においては、血糖あるいは不凍剤としての生理作用を持つ。ヒトにおいてはラクトースに続く摂取量で、食品としては発酵食品、キノコ類には比較的多く含まれている。このトレハロースを分解する酵素であるトレハラーゼは多くの生物及び臓器に分布しているが、他の二糖類分解酵素とは分布、膜への結合様式、食組織に対する応答性などが異なっていることもあり、まだ不明確な事も多く、生理的意味の解明が期待されているというもの<sup>12)</sup>である。

そこで今回は、このトレハロースおよびビタミンDを多く含むしいたけときくらげの2種類を使用し、卵巣摘出ラットの骨に対するキノコ摂取の効果を検討した。

## 実験方法

### 1. ラットの飼育

ラットはKud: wistar 系統、5週令の雌ラット(九動株式会社)を使用した。

飼育は個別ケージを用い、4匹を1群とし、4群に分け、I群を正常群(卵巣非摘出ラット)II群を対照群(卵巣摘出ラット)、III群をしいたけ摂取群(卵巣摘出ラット)IV群をときくらげ摂取群(卵巣摘出ラット)とし、〈表2〉の各飼料で29日間飼育した。

試料は、しいたけ(乾):中葉・国産原木使用、およびときくらげ(乾):台湾産を粉砕機(マイクロミールクラッシャー)で粉末にして使用した。

給餌は、調製した粉末飼料を給餌器に入れ、給水は給餌と同時に、イオン交換水を給水ビンに入れ、自由摂餌(水)とした。

体重の計測は、飼育初日に計測した後、定期的(週1回)にラット用体重計を用いて0.5gの単位まで計測した。

### 2. 卵巣摘出手術

①注射筒にペントバビタル液を入れ、ラットの腹腔内に注射した。

②麻酔が良く効いているかどうか確認し、解剖用ハサミで下腹部を開いた。なお、I群の4匹はそのままにし、II群~IV群の3群の12匹は次の操作に移った。

〈表 2：各群の飼料組成 (%)〉

群 飼 料	I群：正常群 (卵巣非摘出)	II群：対照群 (卵巣摘出)	III群：しいたけ 摂取群 (卵巣摘出)	IV群：きくらげ 摂取群 (卵巣摘出)
ガゼイン	7	7	7	7
大豆油	10	10	10	10
ミネラルmix*1	6	6	6	6
ビタミンmix*2	2	2	2	2
コーンスターチ	15	15	15	15
グルコース	50	50	50	50
セルロール粉末	10	10	5	5
試 料	—	—	5 *3	5 *4

\*1. ハーパー配合

\*2. ハーパー配合

\*3. 乾燥しいたけ粉末

\*4. 乾燥きくらげ粉末

③開腹部から卵巣を取り出し、切除した。

④この時にペニシリンを化膿止めとして腹部に投与した。

⑤開いた部位を縫い針で止め、傷口に化膿止めとしてヨードチンキを塗布した。

### 3. 採血・採骨

ペントバビタール (0.5ml/100g) をラットの腹腔内に注射し、麻酔屠殺した後、血液は、真空採血管を用いて心臓尖針により採血した。

採血後、遠心分離 (3000rpm, 10min) し、血清を分取して、冷凍保存した。

骨は、左右の大腿骨を採取し、精秤したのち、一方 (左) をデシケーター内で1週間保存し、乾燥機 (70℃) で2時間乾燥したのち、乾燥重量を測定した。

他方 (右) を生理食塩水につけて冷凍保存し、骨強度の測定に用いた。

### 4. 血清アルカリ性ホスファターゼの測定

血清アルカリ性ホスファターゼは、測定用キット (アルカリ性ホスファ B テストワコー) を用いて p-ニトロフェニルリン酸基法により測定した。

### 5. 血清・骨中カルシウムの測定

血清および骨中カルシウムは、カルシウム測定用キット (カルシウム C テストワコー) を用いて O C P C 法により測定した。

### 6. 血清・骨中リン濃度の測定

血清および骨中リン濃度は、リン測定用キット (ホスファ C テストワコー) を用いて p-メ

チルアミノフェノール還元法により測定した。

## 7. 骨強度の測定

骨の強度は、骨強度試験機（BONE STRENGTH TESTER MODEL TK-252C: mur-omachi）を用いて、破断重力（N：ニュートン）を測定した。

## 実験結果

### 1. 卵巣摘出ラットの血清におよぼすきのこ摂取の影響

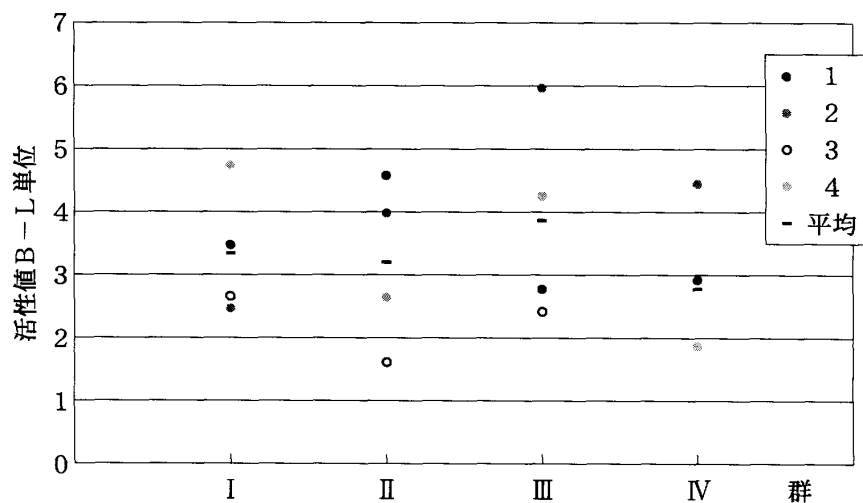
#### 1) アルカリ性ホスファターゼの測定の結果

ラット血清中のアルカリ性ホスファターゼを測定することにより、ラットの骨代謝状態をみた。その結果を〈図1〉に示す。

血清アルカリ性ホスファターゼの値（B-L単位）は、正常（I）群は $3.32 \pm 1.04$ 、対照（II）群は $3.18 \pm 1.34$ 、しいたけ摂取（III）群は $3.83 \pm 1.63$ 、きくらげ摂取（IV）群は $2.75 \pm 1.22$ という結果になった。

それぞれの群間には有意の差は認められず、各群とも正常であり、骨疾患の可能性は低かったと思われる。

〈図1：血清中アルカリ性ホスファターゼ〉



#### 2) 血清中カルシウムの測定の結果

ラットの血清中カルシウムの測定をし、血中のカルシウム代謝をみた。その結果を〈図2〉に示す。

血清カルシウム濃度の値は、正常（I）群は $8.85 \pm 0.20 \text{mg/dl}$ 、対照（II）群は $8.25 \pm 0.34 \text{mg/dl}$ 、しいたけ摂取（III）群は $8.73 \pm 0.35 \text{mg/dl}$ 、きくらげ摂取（IV）群は $7.62 \pm 0.18 \text{mg/dl}$ という結果になった。

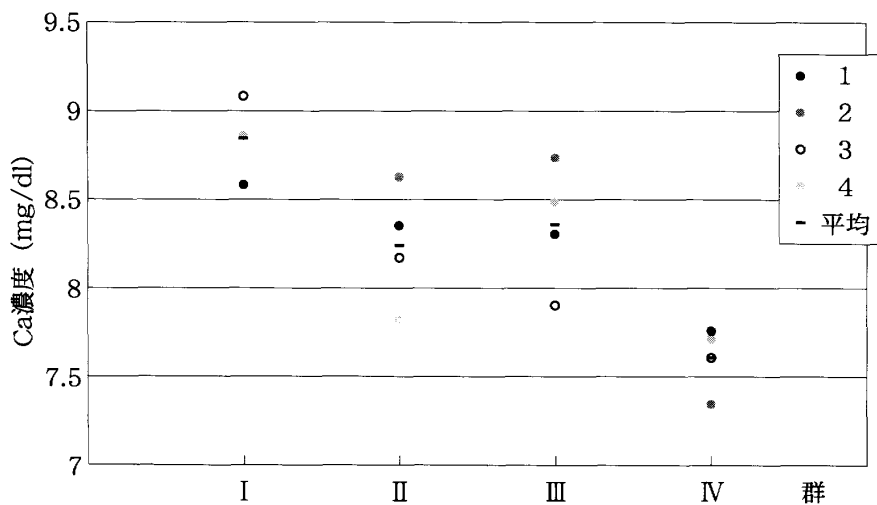
まず、正常群と対照群を比べた場合は、対照群の方が有意（ $P < 0.05$ ）に低値であった。

また、しいたけ摂取群は、正常群・対照群に対して有意差が認められず、きくらげ摂取群と比べると、有意 ( $P < 0.01$ ) に高値であった。

次に、きくらげ摂取群は、他の3群に対して有意 ( $P < 0.05 \sim 0.001$ ) に低値であった。

以上のことにより、血清カルシウム濃度は、しいたけ摂取群は正常群と同レベルであったが、きくらげ摂取群は最もその値が低かったので、血清中のカルシウムになんらかの影響があったのではないかと考えられる。

〈図2：ラットの血清Ca濃度〉



### 3) 血清中リン濃度の測定の結果

ラットの血清中リンの測定をし、血清中カルシウムと共に、血中のリン代謝をみた。その結果を〈図3〉に示す。

血清中のリン濃度の値は正常 (I) 群は $8.83 \pm 0.85 \text{mg/dl}$ 、対照群 (II) は $10.32 \pm 0.53 \text{mg/dl}$ 、しいたけ摂取 (III) 群は $10.26 \pm 0.39 \text{mg/dl}$ 、きくらげ摂取 (IV) 群は $9.77 \pm 0.52 \text{mg/dl}$ という結果になった。

まず、正常群と対照群を比べた場合は、対照群の方が有意 ( $P < 0.05$ ) に高値であった。

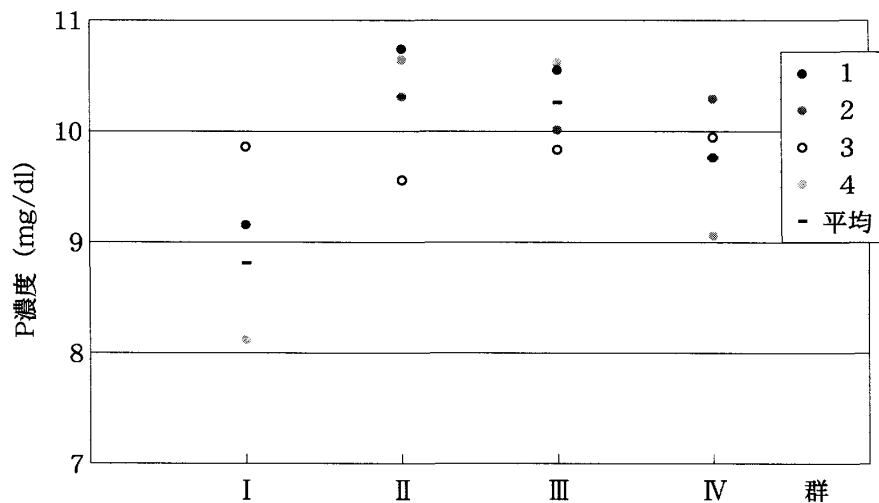
また、しいたけ摂取群は、正常群に対して有意に ( $P < 0.05$ ) 高値であったが、他の2群に対して有意差は認められなかった。

次に、きくらげ摂取群は他の3群に対して有意差が認められなかった。

以上のことより、しいたけ摂取群は、正常群に対して有意に高値だったので、しいたけには血中リン濃度に対して、何らかの影響があったのではないかと考えられる。

また、血清のCa/Pの値は、正常群は0.97、対照群は0.86、しいたけ摂取群は0.82、きくらげ摂取群は0.86という結果になった。

〈図3：ラットの血清P濃度〉



## 2. 卵巣摘出ラットの骨におよぼすきのこ摂取の影響

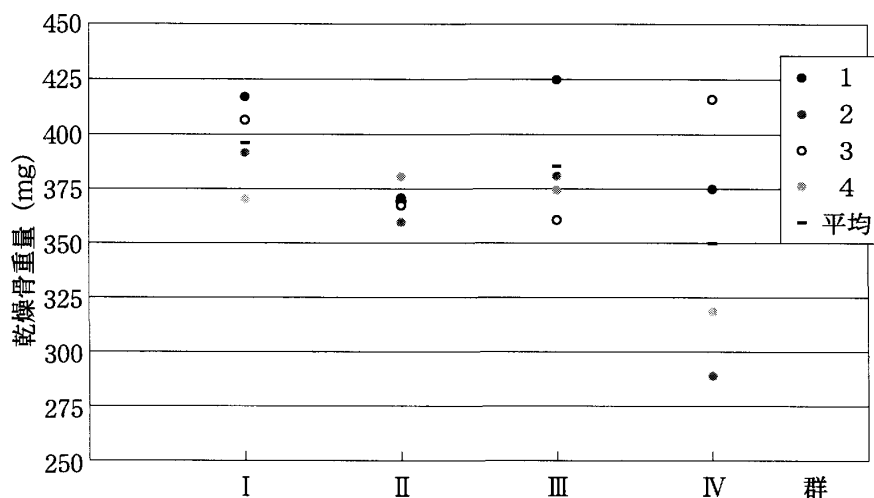
### 1) 骨湿重量・乾重量の測定の結果

ラットの左大腿骨湿重量および乾燥重量を測ることにより、ラットの骨の発育をみた。その結果を骨湿重量は、〈図4〉に、乾燥重量は〈図5〉に示す。

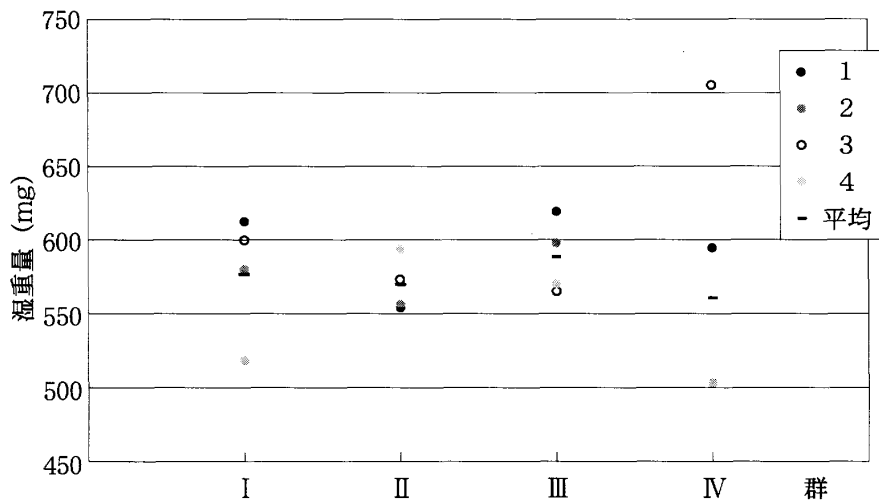
骨湿重量の値は、正常（I）群は $578.6 \pm 41.54$ mg, 対照（II）群は $569.4 \pm 19.2$ mg, しいたけ摂取（III）群は $388.7 \pm 25.23$ mg, きくらげ摂取（IV）群は $561.0 \pm 115.86$ mgという結果になったが、各群間に有意差は認められなかった。

骨乾重量の値は、正常（I）群は $397.1 \pm 20.4$ mg, 対照（II）群は $370.4 \pm 9.01$ mg, しいたけ摂取（III）群は $385.8 \pm 27.77$ mg, きくらげ摂取（IV）群は $350.1 \pm 56.89$ mgという結果になった。

〈図4：ラット左大腿骨の乾燥重量〉



〈図 5 : ラット左大腿骨の湿重量〉



まず、正常群と対照群を比べると、対照群の方が有意 ( $P < 0.05$ ) に低値であった。

しかし、しいたけ摂取群は他の 3 群に対して有意差は認められず、きくらげ摂取群も同様であった。

### 2) 骨中カルシウム量の測定の結果

ラットの骨カルシウム代謝・発育を見るために、左大腿骨中カルシウムを測定した。その結果を〈図 6〉に示す。

骨中カルシウム重量の値は、正常 (I) 群は  $72.5 \pm 6.00\text{mg}$ 、対照 (II) 群は  $55.5 \pm 4.05\text{mg}$ 、しいたけ摂取 (III) 群は  $75.1 \pm 7.54\text{mg}$ 、きくらげ摂取 (IV) 群は  $72.9 \pm 8.23\text{mg}$  という結果になった。

まず、正常群と対照群を比べると、対照群の方が有意 ( $P < 0.005$ ) に低値であった。

しいたけ摂取群は正常群に対して有意差は認められず、対照群に対しては有意 ( $P < 0.005$ ) に高値であった。

また、きくらげ摂取群も同様に正常群に対して有意差は認められず、対照群に対しては有意 ( $P < 0.01$ ) に高値であった。

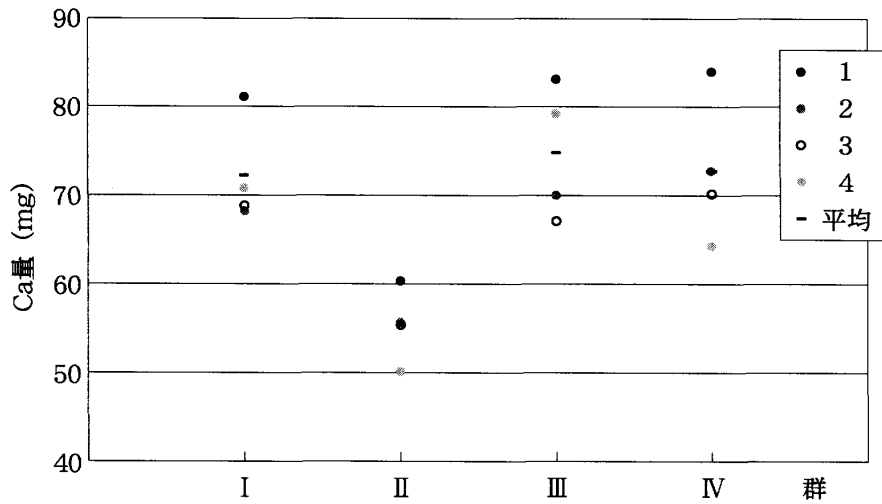
以上のことより、しいたけ・きくらげには骨中カルシウムの低下を抑制する働きがあったのではないかと考えられる。

### 3) 骨中リン量の測定の結果

ラットの骨カルシウム代謝・発育を見るために、左大腿骨中リンを測定した。その結果を〈図 7〉に示す。

骨中リン重量の値は、正常 (I) 群は  $42.5 \pm 9.52\text{mg}$ 、対照 (II) 群は  $38.5 \pm 3.00\text{mg}$  となっ

〈図6：ラット左大腿骨中のCa量〉



ており、しいたけ摂取（III）群は $37.0 \pm 4.25\text{mg}$ 、きくらげ摂取（IV）群は $28.0 \pm 4.48\text{mg}$ という結果となった。

まず、正常群と対照群を比べたが、この間に有意差は認められなかった。

また、しいたけ摂取群は正常群・対照群に対して有意差が認められなかった。

しかし、きくらげ摂取群は他の3群に対して有意（ $P < 0.05 \sim 0.01$ ）に低値であった。

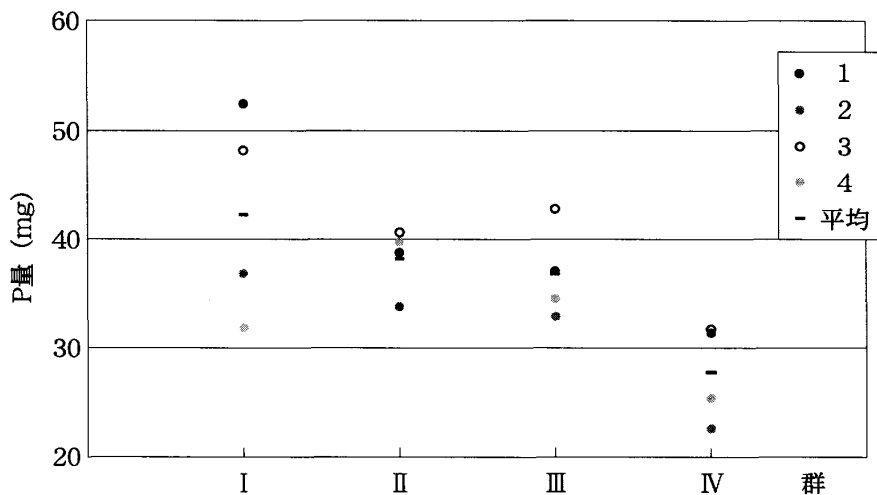
以上より、きくらげは骨中リン濃度に何らかの影響を与えたのではないのかと考える。

また、Ca/Pは、正常群は1.76、対照群は1.55、しいたけ摂取群は2.06、きくらげ摂取群は2.49という値になった。

#### 4) 骨強度の測定の結果

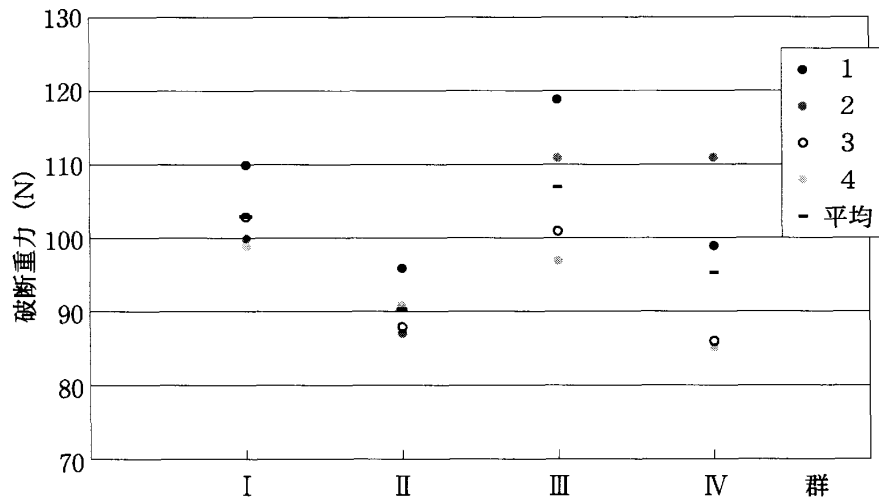
骨の強度を推測するために、ラット右大腿骨破断重力の測定を行った。その結果は〈図8〉

〈図7：ラット左大腿骨中のP量〉





〈図 8 : ラットの右大腿骨の骨強度〉



に示す。

骨強度の値は、正常 (I) 群は $103.0 \pm 5.0\text{N}$ 、対照 (II) 群は $90.5 \pm 4.0\text{N}$ 、しいたけ摂取 (III) 群は $107.0 \pm 9.9\text{N}$ 、きくらげ摂取 (IV) 群は $95.3 \pm 12.3\text{N}$ という結果となった。

まず、正常群と対照群を比べたところ、対照群の方が有意 ( $P < 0.01$ ) に低値であった。

また、しいたけ摂取群は正常群に対して有意差は認められなかったが、対照群に対して有意 ( $P < 0.005$ ) に高値であった。

次に、きくらげ摂取群は他の3群と比べて有意の差は認められなかった。

以上より、しいたけ摂取群は骨強度に何らかの影響があったのではないかと考える。

## 考 察

### 1. 正常群と対照群の比較

対照群は今回、卵巣摘出群であった。ここでは、卵巣摘出によるカルシウム代謝状態を正常群と比べて考察した。

血清中のカルシウムは、通常ほぼ一定の濃度に保たれており ( $9 \sim 11\text{mg}/100\text{ml}$ : ヒト)、血液の酸塩基平衡や浸透圧を保つのと同時に、血液凝固に必要な成分となっているところが知られている。

また、血清リン濃度も通常ほぼ一定濃度に保たれており ( $2 \sim 5\text{mg}/100\text{ml}$ : ヒト)、リン酸プールとして、硬組織中の無機リン酸化合物や細胞内の有機リン酸化合物への供給源として密接な関係を持つことが知られている。

今回実験の対照群のカルシウム濃度は、低い値となっており、卵巣摘出により、エストロゲンが欠乏し、血清中値が低下したことが考えられる。

対照群の血清リン濃度は正常群に比べ高い値になっていた。血清カルシウム濃度が低くな

り、反対に血清リン濃度が高くなる症状は、腎機能の低下、上皮小体機能低下症などが考えられるが、腎機能低下の場合は骨中のリン濃度は低下する。しかし、今回の結果では骨中リン濃度の低下は認められなかったため、腎機能低下ではないと考えられる。従って、対照群の血液中カルシウムの状態は、卵巣摘出によるエストロゲン欠如によって、カルシウム調節ホルモンのバランスが崩れ、その調節がうまくいかなかったと考えられる。

また、血清ALP濃度は、正常群・対照群間には差は認められなかった。

血清ALPは骨発達の盛んな乳児・小児では成人の数倍であり、骨芽細胞、小腸、肝臓、腎臓、胎盤などで生合成され肝汁に排泄されるものである。血中濃度の値の上昇は、骨疾患、肝・胆道疾患、妊娠などが原因で起こる<sup>13)</sup>と言われているが、今回の結果は、骨の弱体化が血清ALP濃度に影響をおよぼすほど進行していなかったことが考えられる。

次に、対照群の骨中のカルシウム状態は、骨重量および骨の主成分であるカルシウムは低下したが、リンには差が認められなかった。

右大腿骨の骨強度の実験では、対照群の値が低かった。したがって、対照群は骨粗鬆症の疾患症状が明確に現れるほどその症状は進行していないが、カルシウムの低下が骨強度に影響が現れるほどの骨の弱体化が進行していたのではないかと考えられる。

## 2. しいたけ摂取群について

卵巣摘出ラットに対するしいたけ摂取の効果はあったのかどうかを考察する。

血清カルシウムは、正常群と差が認められなかったため、その状態は正常群と同様であったことが考えられるが、血清リンの値が高くなっていた。しかし、Ca/Pは0.82で正常範囲と思われる。よって、正常群と比べると若干エストロゲン欠乏の影響が伺われるが、しいたけ摂取による改善効果はあったのではないかと思われる。

また、骨中のカルシウムの状態は、骨重量・カルシウム・リンおよび骨強度のいずれの値も正常群と差が認められなかったが、対照群よりもカルシウムおよび骨強度が高くなっていることから、しいたけ摂取による骨の改善効果が認められ、正常群と同様な状態にあるものと考えられる。

これより、骨カルシウム調節は、しいたけに含まれる成分によって、改善されていたのではないかと考える。

## 3. きくらげ摂取群について

きくらげ摂取群について、血清リン濃度は正常群との間に差は認められなかったが、血清カルシウム濃度は対照群比べ、低い値でCa/P比も0.45あったことから、対照群よりもカルシウム代謝状態が悪化していたのではないかと考えられる。

骨中のカルシウムの状態は、リンの値が対照群・正常群に比べ低い値となっていたが、骨

強度・骨重量・カルシウムの値が正常群と比べて、差が認められなかったが対照群に対してカルシウムが高かったことから、骨に対してはある程度効果があったのではないかと考える。

これは、骨カルシウム調節において、きくらげの組織が硬くカルシウムやリンの吸収を妨害し、血清中のカルシウムが低下したが、エルゴステロールより変化したビタミンD作用により、カルシウムの排泄抑制して、骨への沈着が促進されたのかもしれない。

または、カルシウムの骨への沈着を促進させる未知の成分が含まれているのかもしれない。

## ま と め

今回の実験では、きのこが骨粗鬆症予防に効果があるかどうかを実験したが、その効果は主に血中ではなく、骨中にあったとが考えられる。

きのこの成分は、今回注目したビタミンD・トレハロースの他にも、食物繊維（セルロース、グリシン、ペクチン様成分が多い）、グルタミン酸、アラニンなどのほか、トリコロミン酸やイボテン酸のような特殊なアミノ酸なども含まれており、本実験ではきのこなどの成分が骨に効果があったのかは明確ではない。今後の更なる研究が必要である。

また、今回は老年期の女性に多い閉経型骨粗鬆症を、骨粗鬆症としたが、これは閉経によるエストロゲン欠如原因である<sup>14)</sup>と言われている。

エストロゲンは、卵巣の内部にある卵巣細胞は増殖中に分泌するホルモンである。骨へのその働きは、骨からのカルシウム吸収を抑制して血中のカルシウム濃度を低下させ、その結果、血中の副甲状腺ホルモンの量が増加し、それによってビタミンDの生産が活性化されることにより、腸管からのカルシウムの吸収も促進される。エストロゲンは骨に直接作用して強力に骨吸収を抑制する。がしかし、受容体が確認されていないため、その効果は局所性の骨吸収因子の生産を抑制することによる間接的に骨吸収を抑制していると考えられている<sup>15)</sup>。

女性では卵巣機能の消失が老年期骨代謝異常の引き金になる。エストロゲン欠乏は骨吸収と形成の関連機能が傷害されるのである。つまり、破骨細胞の機能がいわば暴走的に増加する<sup>16)</sup>のだ。具体的には、骨強度の弱体化とそれによる骨量の減少、血清中カルシウム・リン濃度の低下、アルカリ性ホスファターゼ活性値の上昇など<sup>17)</sup>があげられる。

このように、エストロゲンは重要なカルシウム調節の働きを担っているが、間接的である為、欠如した場合の治療や、その予防などのメカニズムは明確ではない。これからの高齢社会に向かい、閉経型骨粗鬆症を中心としたエストロゲンのメカニズムの解明及びそれを予防するものが期待される。

## 参 考 文 献

- 1) 紫崎奉司, 他: 医学と生化学, 137, No. 3, P95~96 (1998)
- 2) 松本俊夫編集, 他: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P13 (1994) 羊土社

- 3) 紫崎奉司, 他: 医学と生化学, 137, No. 3, P91 (1998)
- 4) 紫崎奉司, 他: 医学と生化学, 137, No. 3, P95~96 (1998)
- 5) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P122~123 (1994) 羊土社
- 6) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P91 (1994) 羊土社
- 7) 加藤保子他編集: 食品学各論 改訂第2版, P88 (1996) 南江堂
- 8) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P15羊土社 (1994)
- 9) 紫崎奉司, 他: 医学と生化学, 137, No. 3, P95~96 (1998)
- 10) 内田三香子, 他: 武庫川女子大紀要, 44, P35 (1996)
- 11) 奥和之, 他: 日本食品科学工学会誌, 45, P381~384 (1998)
- 12) 山田和彦, 他: 臨床栄養, 86, No. 7, P777 (1995)
- 13) 椎名晋一他編集: 体内成分と病態のみかた, P55 (1997) 医歯薬出版
- 14) 紫崎奉司, 他: 医学と生化学, 137, No. 3, P95~96 (1998)
- 15) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P100~101 (1994) 羊土社
- 16) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P123 (1994) 羊土社
- 17) 松本俊夫他編集: 骨カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症, P140 (1994) 羊土社