

# 研究報告書

## 「うららCa. 福井梅」の 骨粗鬆症予防効果に関する基礎的研究 (骨粗鬆症モデルマウスによる検討)

(株) 骨構造解析研究所



〒238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町82  
神奈川歯科大学放射線学分野内

代表: 若尾 博美

TEL: 046-822-8851

URL: <http://www.kotsuken.com>

## 目的

骨粗鬆症は、骨密度と骨質の低下により骨が脆くなり、些細なことで骨折しやすくなる疾患である。現在、日本では60歳以上の女性の約半数、75歳以上の男性の約20%が骨粗鬆症に罹るといわれている。高齢の骨粗鬆症患者は、転倒などにより大腿骨頸部の骨折をきたしやすい。その場合、多くは寝たきりになってしまい、後期高齢者においては大腿骨頸部骨折の受傷1年後の生存率は70%ともいわれている。このように、骨粗鬆症は高齢者の生命にも関わる重大な疾患であり、QOLを著しく低下させるのみならず、近年の医療費の増大を招く要因ともなっている。このことから、骨粗鬆症を事前に予防することの重要性に注目が集まっている。

そこで、本実験では、福井県産梅である「紅映」を使用し、カルシウムを効率的に摂取するために開発された栄養機能食品「うららCa. 福井梅」の骨粗鬆症予防効果を検討した。

## 材料と方法

### ①実験動物

実験には、雌性ICR系マウス60匹を使用する。60匹のマウスは擬手術 (Sham) 群、卵巣摘出コントロール (OVX-control) 群、卵巣摘出+「うららCa. 福井梅」低濃度摂取 (うらら低摂取) 群および卵巣摘出+「うららCa. 福井梅」高濃度摂取 (うらら高摂取) 群の4群に分ける。

実験に用いるマウスに対しては、4週齢時に擬手術および卵巣摘出術を施行する。1週間の予備飼育の後、5週齢にて実験に供する。実験動物飼育は照明設備および換気施設を有する専用の動物飼育施設で行う。照明は12時間明暗循環、飼料および飲水は自由摂取とする。

本実験は「神奈川県歯科大学動物実験指針」に則って行う。

### ②実験期間および特殊飼料

実験期間 (3ヶ月) の間に上記4群に対して、それぞれ通常飼料および特殊飼料を摂取させる。通常飼料には1.12%のカルシウムが含有されており、Sham群およびOVX-control群の飼育に用いる。特殊飼料には1.12%カルシウム含有のベース飼料に「うららCa. 福井梅」を0.6%または2.4%添加した、濃度の異なる2種類の飼料を作成し、それぞれをうらら低摂取群とうらら高摂取群の飼育に用いる。「うららCa. 福井梅」添加量はヒト摂取量 (3g/day) に対して、体重換算で10倍 (0.6%)、40倍 (2.4%) の摂取量となるように算出した。

3ヶ月間の飼育の後、実験動物を屠殺して大腿骨を摘出した。また、実験開始時および実験終了時に全マウスの体重を測定した。

【図1】に実験プロトコルを示す。

### ③骨密度測定

摘出した大腿骨を対象に末梢骨用定量的CT法 (pQCT: XCT Research SA+: Stratec社) にて骨密度測定を行った。測定部位は大腿骨遠位骨端部の成長板軟骨から近位方向へ1.4mmの部位 (骨端部) と、さらに近位方向へ10mmの部位 (骨幹部) とした。撮像条件は、管電圧: 50kV、管電流: 550  $\mu$ A、ボクセルサイズ80 $\times$ 80 $\times$ 46  $\mu$ mとした。骨密度測定によって、全骨塩量、全骨密度、海面骨密度、皮質骨密度、皮質骨断面積、皮質骨厚、骨膜周囲長、骨内膜周囲長、骨強度指数を測定した。

### ④3次元的骨梁構造解析

摘出した大腿骨を対象にマイクロCT (MCT-CB130F: 日立) にて3次元的骨梁構造解析を行った。測定部位は大腿骨遠位骨端部の成長板軟骨から近位方向へ1.4mmから3.25mmの範囲とした。撮像条件は、管電圧: 60kV、管電流7  $\mu$ A、ボクセルサイズ: 17.8 $\times$ 17.8 $\times$ 17.8  $\mu$ mとした。上記撮影条件にて200スライスの断層画像を取得し、解析範囲の100スライスについて骨梁構造解析ソフトウェア (TRI-3D BON: ラトックシステムエンジニアリング) にて骨梁構造解析を行った。取得した解析パラメータを以下に示す。

#### 〈3次元的骨梁構造パラメータ〉

##### ●bone morphometric indices解析

BS/BV [1/mm]: 骨梁表面積/骨体積

BV/TV [%]: 骨梁密度

Tb. Th [mcm]: 骨梁厚

Tb. N [1/mm]: 骨梁数

Tb. Sp [mcm]: 骨梁間隙

Tb. Spac [mcm]: 骨梁中心間距離

FD: フラクタル次元 (骨梁の複雑性)

TBPf: 骨パターンファクター (骨梁の凹凸性)

SMI: ストラクチャーモデルインデックス (骨梁の形態)

##### ●star volume 解析

V\*m. space: 骨髄腔スター体積 (骨髄腔の連続性)

V\*tr: 骨梁腔スター体積 (骨梁の連続性)

##### ●node-strut 解析

N. Nd/TV [1/mm<sup>3</sup>]: 骨梁間結節数

N. Tm/TV [1/mm<sup>3</sup>]: 端点数

N. Ct/TV [1/mm<sup>3</sup>]: 骨梁皮質骨間結節数

N. NdNd: 結節間骨格線数

TSL/TV [1/mm<sup>2</sup>]: 総骨格線長

NdNd/TV [1/mm<sup>2</sup>]: 結節間骨格線長

CtCt/TV [1/mm<sup>2</sup>]: 皮質骨間骨格線長

### ⑤骨強度試験

摘出した大腿骨を対象に骨強度試験機 (MZ-500:株式会社マルトー) にて力学的特性を測定した。大腿骨の midpoint に対して10mm/minのスピードで3点曲げ試験を行った。測定パラメータとして最大荷重、スティッフネスおよび曲げ弾性を算出した。

### ⑥統計処理

各実験群の平均値の差を検定するため、OVX control群と比較した2群間において、Student's T-testを用いた。

## 結果

【表1】に実験期間中の各群の体重変化を示す。OVX control群に比較して、Sham群は有意に体重が低値を示した。これは、卵巣摘出による標準的な変化である。一方、通常飼料を摂取したOVX control群に比較して、うらら0.6%群およびうらら2.4%群の体重には有意な差は認められなかった。このことは各特殊飼料に摂取障害などがなく、適切に摂取されたことを示唆している。

【表2】にpQCTによる摘出大腿骨の骨密度測定の結果を示す。Sham群に比較してOVX control群では、骨端部のほぼ全てのパラメータおよび骨幹部の全骨塩量、皮質骨骨塩量、皮質骨断面積、骨強度指数が有意な低値を示した。この結果は、卵巣摘出術によって明らかな骨粗鬆症状態が惹起されたことを示している。一方、OVX control群と比較して、うらら0.6%群およびうらら2.4%群では有意な変化は認められなかった。

【表3】に $\mu$ CTによる摘出大腿骨の骨梁構造解析 (bone morphometric indices) の結果を示す。骨密度の結果と同様に、Sham群に比較してOVX control群ではほぼ全てのパラメータで骨梁構造の有意な劣化を認めた。一方、うらら0.6%群およびうらら2.4%群ではOVX control群と比較して有意な変化は認められなかった。しかしながら、うらら2.4%群ではTb. N (P=0.084)、Tb. Sp (P=0.054)、Tb. Spec (P=0.055)、FD (P=0.060) に一定の骨梁構造劣化抑制の傾向が認められた。

【表4】には $\mu$ CTによる摘出大腿骨の骨梁構造解析 (star volume 解析) の結果を示す。Sham群に比較してOVX control群ではV\*m. space は有意な低値を、V\*tr は有意な高値を示した。一方、OVX control群と比較してうらら0.6%群およびうらら2.4%群ではV\*m. space が有意に低値を示した。このことは、骨粗鬆症による骨梁の連続性の劣化がうららCaの摂取によって抑制されたことを示している。

---

【表5】には $\mu$ CTによる摘出大腿骨の骨梁構造解析 (node-strut 解析) の結果を示す。Sham群に比較してOVX control群ではほぼ全てのパラメータで骨梁連結性の有意な劣化を認めた。一方、OVX control群と比較して、うらら0.6%投与群では、N. Ct/TV が有意な高値を示した。骨梁の連結性 (N. Ct/TV) の劣化がうらら0.6%摂取によって抑制されていることを示唆している。また、OVX control群と比較して、うらら2.4%摂取群では N. Nd/TV、N. Tm/TV、TSL/TV で有意な改善を認めた。N. Nd/TV およびN. Tm/TV は骨梁の連結性、TSL/TV は骨梁 (骨格線) の長さの指標であり、うらら2.4%摂取によってこれらの劣化が抑制されたことを示唆している。

【図2】には $\mu$ CTによる各群の代表的な3次元再構築画像を示す。OVX control群では骨梁構造が著明に劣化しているが、うららCa摂取によって骨梁構造が維持されている様子が肉眼的に確認できる。

【表6】には3点曲げ試験による骨力学特性の結果を示す。Sham群に比較してOVX control群では最大荷重が有意に低下しており、骨粗鬆症による骨強度の低下が確認できる。一方、うらら0.6%群およびうらら2.4%群では有意な変化は認められなかった。

## 考 察

カルシウムは骨に代表される硬組織の主成分であるが、脳の活動や筋肉の収縮に不可欠な元素でもあるため、血中濃度がホルモンやビタミンD3によって厳格に調整されている。血中カルシウム濃度が低下しそうになると、破骨細胞による骨破壊が亢進され、骨から血中へカルシウムが供給されることになる。したがって、骨粗鬆症の予防にはカルシウムが不足しないようにする必要がある。現在わが国におけるカルシウム摂取量は541mg/日(欧米では1000mg/日以上)であり、所要量の700mg/日を下回っている。このことから、サプリメントによってカルシウム摂取を補助することは骨粗鬆症の予防に重要であると考えられる。

一方、カルシウムを十分に摂取しても、カルシウムの腸管内での吸収効率は決して高いものではないため、大部分は体内に吸収されることなく排泄されることになる。第6次改訂日本人の栄養所要量「食事摂取基準」では、カルシウム吸収率は男女とも思春期で45%、成人で30~35%、老齢期で30%とされている。また、女性の場合、思春期で32%、成人では21%という報告もある。したがって、骨粗鬆症の予防のためにはカルシウムを摂取するのみならず、カルシウムを効率よく吸収するための環境を整える必要がある。カルシウムの吸収率を補助する栄養素として知られているのが、クエン酸とビタミンDである。クエン酸はキレート作用によってカルシウムが細胞膜を通り抜けやすくする効果があり、腸管におけるカルシウムの吸収を助けることが知られている。また、ビタミンDは小腸や腎臓でのカルシウム吸収を亢進し、骨粗鬆症の予防に重要な栄養素であるとされている。

「うららCa. 福井梅」には骨焼成カルシウム、梅果汁由来のクエン酸、ビタミンD、ブドウ種子エキスなどが含まれていることから、その摂取によって骨粗鬆症予防効果が期待できる。本実験では、卵巣摘出マウス(骨粗鬆症モデルマウス)を用いて、「うららCa. 福井梅」の骨粗鬆症予防効果を骨密度と骨構造の両面から検討した。

骨粗鬆症モデルマウスに「うららCa. 福井梅」を3ヶ月間摂取させたところ、骨密度には明らかな変化は認められなかった(表2)。骨密度の大部分は皮質骨が占めており、3ヶ月間の「うららCa. 福井梅」摂取では皮質骨への影響が認められなかったことを示唆している。このことは3点曲げ試験において、皮質骨のみである骨幹部の骨強度に変化が見られなかったことから裏付けられる(表6)。一方、骨梁構造の一部(骨梁の連続性、連結性、長さ)には有意な劣化抑制効果を認めた(表4、表5)。骨梁構造は骨質の重要なファクターであり、骨梁構造の一部に劣化抑制効果が認められたことは、「うららCa. 福井梅」に骨質改善作用の可能性を示唆している。

今回の実験では、骨梁構造に対して一定の効果が認められたにもかかわらず、骨密度には効果が認められなかった。このことは、海面骨と皮質骨における骨代謝回転の鋭敏さの違いによるものと考えられる。すなわち、ビスフォスフォネート製剤やビタミンK製剤などの骨粗鬆症治療薬の効果も、骨代謝が活発な骨梁(海面骨)に先に現れ、後に骨代謝が活発でない皮質骨へ認められることが知られており、今回の結果もそれと同様のメカニズムによるものではないかと推察される。よって、より長期間の摂取によって骨密度への影響を認める可能性も否定できない。

---

本実験の結果から、「うららCa. 福井梅」の3ヶ月間摂取では、骨密度には明らかな効果が認められなかったが、骨質の一部に対して劣化を抑制する効果のあることが示唆された。そもそも、骨粗鬆症とは骨強度が低下し、骨折しやすくなった病態のことである。NIH（アメリカ国立衛生研究所）のコンセンサス・デベロップメント・パネルでは、骨強度は「骨密度」と「骨質」の統合で表現されるとされており、骨質の一部に対して劣化抑制効果が認められた「うららCa. 福井梅」には骨粗鬆症予防効果の可能性が示唆された。

## 結 論

骨粗鬆症モデルマウスに「うららCa. 福井梅」を摂取させた結果、骨密度には明らかな変化は認められなかったが、骨梁構造の一部（骨梁の連続性、連結性、長さ）には有意な劣化抑制効果を認めた。

**【表1】 実験開始時および実験終了時の体重**

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
体重 (g)				
実験開始時	21.73 ± 0.88	20.13 ± 0.52	20.93 ± 0.80	20.80 ± 0.86
実験終了時	41.40 ± 4.63	33.67 ± 4.25**	40.80 ± 6.43	41.53 ± 4.36

\*\*p>0.01 vs OVX control

**【表2】 pQCTによる骨密度測定の結果**

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
全骨密度 [mg/cm <sup>3</sup> ]	508.79 ± 30.27	637.82 ± 74.15**	508.04 ± 47.48	519.80 ± 50.55
海綿骨密度 [mg/cm <sup>3</sup> ]	197.38 ± 18.90	242.23 ± 41.24**	204.52 ± 25.75	205.98 ± 30.22
皮質骨密度 [mg/cm <sup>3</sup> ]	872.11 ± 29.00	927.89 ± 38.49**	861.65 ± 26.07	881.08 ± 27.66
骨端部				
皮質骨断面積 [mm <sup>2</sup> ]	1.68 ± 0.18	2.29 ± 0.49**	1.59 ± 0.31	1.67 ± 0.34
皮質骨厚 [mm]	0.23 ± 0.03	0.34 ± 0.08**	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.05
骨膜周囲長 [mm]	8.03 ± 0.25	7.87 ± 0.26	7.83 ± 0.29	7.89 ± 0.23
骨内膜周囲長 [mm]	6.58 ± 0.30	5.74 ± 0.50**	6.44 ± 0.30	6.42 ± 0.27
骨強度指標	1.27 ± 0.14	1.49 ± 0.26*	1.18 ± 0.20	1.23 ± 0.20
骨幹部				
全骨塩量 [mg/cm]	1.56 ± 0.13	17.5 ± 0.24*	1.50 ± 0.18	1.54 ± 0.15
全骨密度 [mg/cm <sup>3</sup> ]	794.42 ± 48.29	816.46 ± 57.84	810.45 ± 44.96	795.32 ± 39.53
皮質骨塩量 [mg/cm]	1.42 ± 0.11	1.58 ± 0.23*	1.37 ± 0.18	1.41 ± 0.15
皮質骨密度 [mg/cm <sup>3</sup> ]	1230.46 ± 21.46	1244.20 ± 34.65	1233.07 ± 34.09	1234.07 ± 23.92
皮質骨断面積 [mm <sup>2</sup> ]	1.15 ± 0.09	1.27 ± 0.16*	1.11 ± 0.12	1.14 ± 0.11
皮質骨厚 [mm]	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02
骨強度指標	0.60 ± 0.09	0.70 ± 0.13*	0.57 ± 0.09	0.60 ± 0.09

\*P<0.05 vs OVX control \*\*P<0.01 vs OVX control

**【表3】 3次元の骨梁構造解析 (bone morphometric indices) の結果**

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
BS/BV [1/mm]	57.55 ± 3.91	47.89 ± 4.02**	56.45 ± 3.68	56.16 ± 3.12
BV/TV [%]	6.16 ± 2.02	14.43 ± 4.67**	7.42 ± 2.03	7.78 ± 2.48
Tb. Th [mcm]	34.90 ± 2.33	42.04 ± 3.59**	35.56 ± 2.23	35.71 ± 1.96
Tb. N [1/mm]	1.75 ± 0.51	3.39 ± 0.92**	2.07 ± 0.50	2.16 ± 0.60
Tb. Sp [mcm]	574.30 ± 152.51	272.88 ± 84.23**	468.73 ± 103.39	457.85 ± 127.07
Tb. Spac [mcm]	609.19 ± 151.68	314.92 ± 81.81**	504.30 ± 102.35	493.57 ± 126.19
FD	1.91 ± 0.07	2.04 ± 0.07**	1.95 ± 0.05	1.96 ± 0.05
TBPf	15.88 ± 2.32	12.89 ± 2.54**	15.01 ± 2.52	15.29 ± 1.79
SMI	2.90 ± 0.26	2.89 ± 0.21	2.80 ± 0.13	2.72 ± 0.18

\*P<0.05 vs OVX control \*\*P<0.01 vs OVX control



【表4】 3次元の骨梁構造解析 (star volume) の結果

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
V*m.space	0.61 ± 0.11	0.32 ± 0.15**	0.51 ± 0.11*	0.48 ± 0.13*
V*tr	0.0065 ± 0.0020	0.0119 ± 0.0044**	0.0065 ± 0.0017	0.0067 ± 0.0019

\*P<0.05 vs OVX control \*\*P<0.01 vs OVX control

【表5】 3次元の骨梁構造解析 (node-strut解析) の結果

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
N. Nd/TV[1/mm3]	83.02 ± 37.82	104.97 ± 35.46	105.47 ± 31.85	115.09 ± 37.15*
N. Tm/TV[1/mm3]	56.42 ± 21.80	75.26 ± 18.91*	73.17 ± 23.07	82.24 ± 26.64*
N. Ct/TV[1/mm3]	32.56 ± 9.25	54.95 ± 13.77**	40.06 ± 7.91*	36.42 ± 7.72
N. NdNd	340.33 ± 179.35	402.67 ± 159.33	403.50 ± 123.76	469.42 ± 187.21
TSL/TV[1/mm2]	18.12 ± 7.65	31.22 ± 10.38*	22.61 ± 6.45	25.03 ± 8.51*
NdNd/TV[1/mm2]	10.41 ± 5.33	17.25 ± 7.04*	13.18 ± 4.10	15.05 ± 5.69
CtCt/TV[1/mm2]	0.40 ± 0.27	0.83 ± 0.27**	0.47 ± 0.29	0.38 ± 0.19

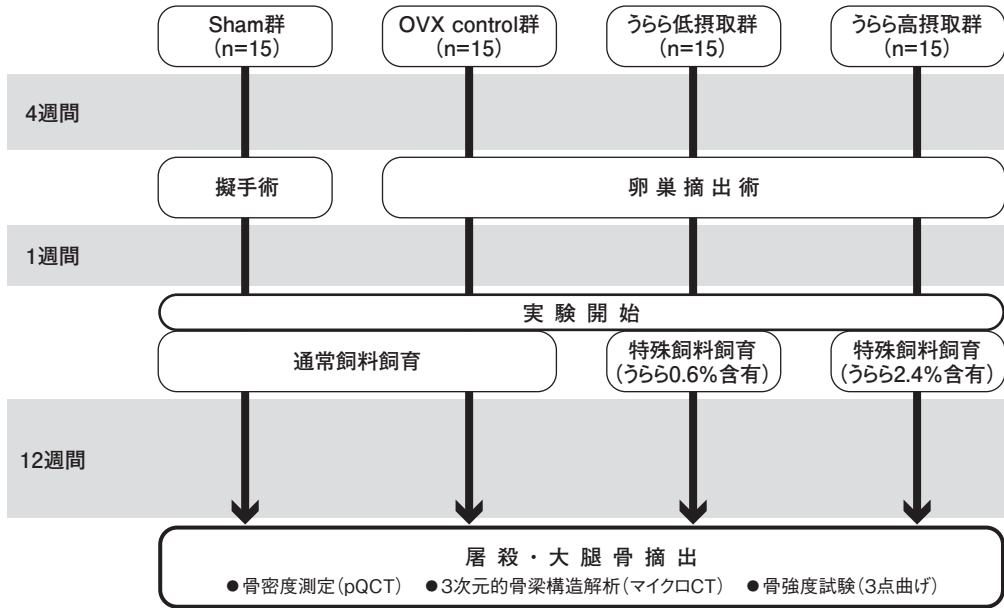
\*P<0.05 vs OVX control \*\*P<0.01 vs OVX control

【表6】 大腿骨骨幹部の骨強度試験 (3点曲げ) の結果

	OVX control	Sham	うらら0.6%	うらら2.4%
Maximum load (N) (最大荷重)	24.22 ± 4.23	30.27 ± 7.02**	24.93 ± 3.84	25.77 ± 4.27
Stiffness (N/mm)	56.95 ± 18.29	52.86 ± 25.77	58.37 ± 25.90	67.53 ± 19.14
Elastic (N/mm2) (曲げ弾性)	596.16 ± 268.20	430.43 ± 232.08	663.41 ± 335.71	659.34 ± 194.16

\*P<0.05 vs OVX control \*\*P<0.01 vs OVX control

【図1】 実験プロトコル



※ Sham群=擬手術群 OVX control群=卵巢摘出コントロール群

【図2】 各群の代表的な3次元再構築画像

