

添加物配合飼料が骨粗鬆症モデルラットの大腿骨骨梁構造に与える影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

佐藤 佳奈美

(指導：河相 安彦)

## I. Abstract

## II. 緒言

### III. 研究Ⅰ：フラクトオリゴ糖，イソフラボンおよびクエン酸カルシウム混合飼料（AFD）による骨粗鬆症ラットの大腿骨骨質への効果

#### 1. 材料および方法

##### 1) 飼料の製作

##### 2) 実験動物

##### 3) 測定方法

###### (1) 血液生化学検査

###### (2) BMD および BMC の測定

###### (3) 3D-map の観察

###### (4) 骨梁構造計測

###### (5) 非脱灰標本の観察

##### 4) 統計解析

#### 2. 結果

#### 3. 小活

### IV. 研究Ⅱ：添加物配合飼料（AFD）が卵巣摘出ラット（OVX）の大腿骨骨の構造におよぼす効果

#### 1. 材料および方法

##### 1) 飼料の製作

##### 2) 実験動物

##### 3) 測定方法

###### (1) BMD および BMC の測定

###### (2) 3D-map の観察

###### (3) 骨梁構造計測

(4) 非脱灰標本の觀察

4) 統計解析

2. 結果

3. 小活

V. 考察

VI. 結論

VII. 参考文献

## **I . Abstract**

### **Background**

Osteoporosis increases the risk of bone fractures in the elderly, and in consequence leads to the need of nursing care. The fear of slip/falling limits the activities of the elderly decrease their exercise. The decreased exercise leads to sarcopenia. This creates a vicious circle of reduced motor function and further decline of muscle strength. Additive formula diet (AFD) contains fructo-oligosaccharide (FOS), isoflavone (ISO) and 1 % Ca as a supplement for patients with osteoporosis to supply sufficient calcium intake and absorption.

### **Objectives**

This study aimed to develop and test the effect of AFD to low mineral diet fed and ovariectomized (OVX) osteoporosis rats. The bone volume and bone quality was assessed as the outcome of the study.

### **Material and Methods**

#### Research1

Ten rats were randomly assigned into 2 groups (n=5). The 2 groups were fed a low-mineral diet (LMD; Oriental Koubo Industry Co., Tokyo, Japan) for 189 days. At 190 days, the rats were fed LMD+Normal mineral diet (NMD), and LMD+AFD for 84 days. The mice were euthanized with carbon dioxide after blood collection from the jugular vein. Under anesthesia, the femur was removed after 273 days of intervention.

#### Research2

Sixteen 20-week old ovariectomized rats were randomly distributed into 2 groups; one group was fed normal diet (n = 8) and the second group was fed AFD (n = 8). Both groups were fed for 24 weeks, and body weight was measured at 8 and 24 weeks. After measuring the weight at 24 weeks, rats were euthanized using carbon dioxide. Lateral

femur bone was extracted, and Bone Mineral Density (BMD) and Bone Mineral Content (BMC) were measured via micro computed tomography. Non-decalcified ground sections of the femur were examined via polarized-light microscopy.

### **Results**

AFD showed significant improvement of bone volume, BMD and BMC, and bone quality, bone structure; both with LMD and OVX rats compared to NMD fed rats. The supplement also showed no prominent side effect from the blood test and growth.

### **Conclusion**

Based on the results of Study I and Study II, AFD showed significant an effect of improving BMD, BMC and trabecular structure of osteoporosis rats with malnutrition and OVX. Therefore, it was suggested that AFD improves trabecular structure for osteoporosis.

## II. 緒言

世界の総人口は増加傾向にあり，総人口に占める 65 歳以上の人口比率は，1950 年の 5.1%から 2010 年の 7.7%へ上昇している。世界の高齢化は今後も急速に進展する<sup>1)</sup>と言われているなかで，日本は既に超高齢化社会を迎えている<sup>2)</sup>。急速な高齢化により高齢者の骨および関節に関連する疾病が増加し，その対応は重要な課題となっている。アジア圏では大腿骨頸部骨折がこの 20 年間で 3 倍に増加し，その 8 割が閉経女性で占められている<sup>3)</sup>。日本でも多くの骨粗鬆症患者が存在するとされているが，大多数は病識に乏しく，潜在化している状況である<sup>4)</sup>。骨密度（Bone mineral density 以下 BMD）の低下を主徴とする骨粗鬆症は，高齢者における骨折の増加，ひいては要介護者の増加へ結びつくと考えられている。ひとたび骨折を経験すると再転倒の回避から行動が制限され，運動量と筋力の減少を伴うサルコペニアが誘発され，身体機能の低下に伴う ADL（日常生活動作）の低下を引き起こす。施設入居者は転倒および骨折のハイリスク群<sup>5,6)</sup>であることが報告されているのは施設入居者にサルコペニアの状態を呈する者が多いことが関連していると考えられる。

歯科領域における骨粗鬆症に関する報告として，骨粗鬆症と臼歯の損失との間に有意な相関を認めたという報告<sup>7)</sup>，低 BMD の骨粗鬆症患者では咀嚼能率が有意に低下しているとの報告<sup>8)</sup>がある。また，骨粗鬆症に罹患していない無歯顎者は罹患している無歯顎者と比較して有意に咀嚼能率が高いとの報告<sup>9)</sup>もある。従って，骨粗鬆症の予防と改善は，全身および口腔領域における高齢者の自立と QOL の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

閉経や加齢変化に伴い高齢者の骨吸収量は骨の形成量を大きく上回るために，骨量および骨質の低下を招くとされている。閉経以降，海綿骨は 5 年間で年間約 3 % 減少するとされ，閉経後骨粗鬆症の大きな要因の一つとされている。また，高齢者は加齢に伴う生理機能の低下によりビタミン D の代謝が低下し，カルシウ

ムをはじめとするミネラル群の腸管における吸収率が低下するとされている<sup>10)</sup>。また、厚生労働省の平成 25 年国民健康栄養調査<sup>11)</sup>によると 50 歳以上の男女におけるカルシウムの摂取量は基準の推定平均必要量<sup>12)</sup>に達していないと報告されている。

骨密度の低下を予防し、骨折や転倒を防止し要介護高齢者の QOL 低下を防ぐためには、骨密度の低下予防にカルシウムの摂取が寄与したという複数の臨床試験の報告<sup>12-16)</sup>にあるように、カルシウムの積極的な摂取とカルシウムの体内吸収を改善することが求められている。

このような背景の中、カルシウム摂取の向上を目的に高齢者が長期にわたり安全に使用できるサプリメントの開発と体内吸収を改善するために吸収効率を向上させる配合の検討が行われてきた。先行研究ではカルシウムの摂取および吸収の効率を目的に、カルシウムを代表とするミネラル成分の吸収促進および腸内細菌叢を変換するフラクトオリゴ糖（以下 FOS）<sup>17)</sup>、腸内細菌によってエクオールに変換されることで強いエストロゲン作用を有するイソフラボン（以下 ISO）<sup>18,19)</sup>に関する研究が行われてきた。しかし、これらの検討は FOS または ISO の単独成分を摂取させた研究であり、カルシウム摂取量は改善されなかった。そこで Nakada ら<sup>20, 21)</sup>はカルシウムを摂取しやすく、体内のカルシウム吸収効率を考慮した FOS、ISO およびリン酸カルシウム（3.0% カルシウム含有）の 3 種混合サプリメントを開発し、ラットに飼料として摂取させた結果、骨粗鬆症の予防および大腿骨骨幹部の破断強度の向上による骨質の改善に有効であるとの報告をした。しかし、含有されている 3.0%カルシウム濃度は生体にとって必要摂取量を超えており、栄養の均衡を崩す可能性があるとも報告している<sup>20)</sup>。そこで本研究は Nakada らの 3 種混合サプリメント飼料におけるカルシウム濃度を一般で市販されている飼料と同程度の 1.0%カルシウム濃度に調整し、リン酸カルシウムとクエン酸カルシウムの配合比率を変更し、ISO および FOS の濃度は過去の報告に基づ

き同じ濃度とした<sup>22, 23)</sup>新たな3種混合飼料 (Additive Formula Diet, 以下 AFD) を製作した。本研究は, 骨粗鬆症モデルラットにおける AFD の摂取が, 骨梁構造に与える影響を明らかにすることを目的に, 低栄養骨粗鬆症モデルラットと卵巢摘出骨粗鬆症ラット (以下 OVX) に AFD を経口摂取させ, 大腿骨骨幹端における骨形成および骨梁構造の改善と有効性を検討した。まず研究 I として 1) AFD の安全性の検討を血液生化学検査にて行い, 2) 低栄養骨粗鬆症ラットの大腿骨骨質に及ぼす効果を骨量および骨梁構造, 3) 偏光顕微鏡を用いて視覚的に骨梁の変化および偏光特性を検討した。続いて研究 II として AFD が卵巢摘出ラットの大腿骨骨構造におよぼす効果を 1) 骨量および骨梁構造, 2) 偏光顕微鏡を用いた骨梁の変化および偏光特性を観察し検討を行った。

III. 研究 I : フラクトオリゴ糖, イソフラボンおよびクエン酸カルシウム混合飼料 (AFD) による骨粗鬆症ラットの大腿骨骨質への効果 (日本大学松戸歯学部動物実験委員会承認 (AP13MD008))

#### 1. 材料および方法

##### 1) 飼料の製作

飼料は AFD, 低栄養食および普通食を製作した。AFD (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本) は標準飼料である AIN-93M (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本) に FOS, ISO, クエン酸カルシウムおよびリン酸カルシウムを配合し, カルシウム濃度を 1.0% に調整したものとした。低栄養食 (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本, Low Mineral Diet, 以下 LMD) は AIN-93M のカルシウム, リンをそれぞれ 0.1% およびフッ素 0.001% 以下にしたものとし, 普通食 (オリエンタル酵母 (株), 東京, 日本, Normal Mineral Diet, 以下 NMD) は AIN-93M のカルシウム濃度を炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウムによって 1.0% としたものとした。AFD, LMD および NMD の組成の詳細を Table 1 に示す。



## 2) 実験動物(Fig.1)

実験動物は 19 週齢 Wistar 雌性ラット ((株) 三協ラボサービス, 日本) 20 頭とし, 室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  湿度および  $50 \pm 1\%$  で, 飼料および水を自由に摂取できるよう飼育した。1 週間の予備飼育を行い環境変化に順応させた後, 20 週齢時に無作為に 2 群 (LMD+NMD および LMD+AFD) に割り付けた。各群は 20 週齢時から 189 日間 LMD を摂取し, 骨粗鬆症モデルラット<sup>24)</sup> とした後, 190 日目から 83 日間 AFD または NMD を摂取させた。各群は, 介入 273 日後に炭酸ガスにて安楽死させ, 大腿骨の摘出を行い, 以下の方法により測定を行った。なお, ラットの健康状態および成長を確認する目的で, 20 週齢, 介入 189 日後および介入 273 日後の体重を測定した。

## 3) 測定方法

### (1) 血液生化学検査

安楽死の前に頸静脈より採血を行い, 遠心分離器で 3000 回転/分, 5 分間遠心分離を行った後, 血液生化学検査を依頼 ((株) モノリス, 日本) した。

### (2) BMD および BMC の測定

摘出した大腿骨を Nakada ら<sup>21)</sup>の方法に従い, Micro Computer Tomography (R<sub>m</sub>CT 2<sup>®</sup>, (株) リガク, 日本, 以下 CT) を用いて撮像を行った。CT の撮像条件は, 管電流  $160 \mu\text{A}$ , 管電圧 90 kV, FOV10 mm, 撮影時間 26 秒, ボクセルサイズ  $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  とした。撮像範囲は大腿骨遠位骨幹端 ( $6.0\text{mm} \times 5.0\text{mm} \times 3.0\text{mm}$ ) とし, BMD および BMC の測定を行った(Fig.2)。骨塩定量ファントム (hydroxyapatite 含有量:  $200\text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $300\text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $400\text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $500 \text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $600\text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $700\text{mg}/\text{cm}^3$ ,  $800\text{mg}/\text{cm}^3$ , および  $1,550\text{mg}/\text{cm}^3$ ) を CT 撮像し, TRI/3D-BON BMD ((株) Ratoc System Engineering, 日本, 以下 TRI/3D-BON) にてファントムの CT 値を校正および検量線を作成した。BMD および BMC は

撮像した海綿骨の CT 値から TRI/3D-BON にて作成した検量線より算出した。

### (3) 3D-map による BMD の観察

撮像したデータを TRI/3D-BON にて 3Dimensional- map (以下 3D-map) にてカラーマッピングを行い、大腿骨遠位骨幹端断面の BMD の観察を行った。

### (4) 骨梁構造計測

CT より得られた海綿骨の断層画像を用いて、TRI/3D-BON にて骨梁構造計測を行った。計測項目は Trabecular Thickness (骨梁幅, 以下 Tb.Th), Trabecular Number (骨梁数, 以下 Tb.N), Trabecular Separation (骨梁間距離, 以下 Tb.Sp), Trabecular Spacing (骨梁中心間距離, 以下 Tb.Spac), Trabecular Bone Pattern factor (骨梁の連結性, 以下 TBPf), Structure Model Index (骨梁の形態, 以下 SMI) とした。なお, TBPf は骨梁に凹面構造の多い場合は負の値となり骨梁の連結は良好で, 凸面構造の多い場合は正の値となり骨梁の連結は不良となる。SMI は, 0-4 に算出され示される。骨梁の形態が球状の場合は「4」, 棒状の場合は「3」, 板状の場合は「0」, となり骨梁が混合状態のときは各値の中間値となる。

### (5) 非脱灰研磨標本の観察

摘出した大腿骨骨幹端部の非脱灰研磨標本を作製し、海綿骨骨梁構造の観察を行った。標本の作製は、大腿骨をアルコールに浸漬固定後、脱水を行い、キシレンを用いて脱脂を行った。その後、Methyl Methacrylate 樹脂 (オステオレジン TM 包埋キット (株) 和光純薬工業, 日本) を使用し、通法にしたがい樹脂包埋を行った。包埋された骨は自動精密切断機 (ISOMET, BUEHLER, USA) にて大腿骨の長軸に対して矢状方向に薄切、および研磨を行い、厚さ 100 $\mu$ m とした。作製した標本は偏光顕微鏡 (LEICA M60, Leica Microsystems GmbH, Germany) を用いて検板法にて骨梁構造および偏光特性の観察を行った。

## 4) 統計

2 群間の体重，血液生化学検査結果，BMD，BMC および骨梁構造計測の比較を Mann-Whitney U 検定を行った（有意確率 5 %）。

## 2. 結果

### 1) 体重測定

NMD 群は AFD 群と比較して介入 189 目および介入 273 日後において有意に高い値を示した (Table 2)。

### 2) 血液生化学検査

LMD+AFD の中性脂肪は LMD+NMD と比較して有意に低い値を示した (Table (p<0.05))。

### 3) BMD および BMC

BMD および BMC とともに LMD + AFD が LMD + NMD と比較して有意に高い値を示した (p<0.05) (Table 4)。

### 4) 3D-map による BMD の観察

カラースケールは，赤色が高い BMD を示し，青色に移行するに従い低い BMD を示す。LMD+AFD の海綿骨は LMD+NMD と比較し BMD が高いことが観察された (Fig.3)。

### 5) 骨梁構造計測

骨梁構造計測の結果を Table 5 に示す。骨梁構造計測により海綿骨骨梁の密度や連結の状態の評価。

#### (1) Tb.Th

骨梁幅を示す Tb.Th は，LMD+AFD が LMD+NMD と比較して有意に高い値を示し (p<0.05) AFD 摂取群が NMD 摂取群と比較して太い骨梁幅であること

が示された。

#### (2) Tb.N

骨梁数を示す Tb.N は、LMD+AFD が LMD+NMD と比較して有意に高い値を示し ( $p<0.05$ ) AFD 摂取群が NMD 摂取群と比較して骨梁の緻密性が示唆された。

#### (3) Tb.Sp

骨梁間距離を示す Tb.Sp は、LMD+AFD が LMD+NMD と比較して有意に低い値を認め ( $p<0.05$ ) AFD 摂取群が NMD 摂取群と比較して骨間距離が短く骨梁間の近接に伴い骨密度の増加が示唆された。

#### (4) Tb.Spac

骨梁中心間距離を示す Tb.Spac は、LMD+AFD が LMD+NMD と比較して有意にの差を認めた。 ( $p<0.05$ )。これより、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して骨梁間の近接を認め骨密度の増加が示唆された。

#### (5) TBPf

骨梁の連結性を示す TBPf は、正の値を示し、両群ともに凸面の多い骨梁であることが示された。

#### (6) SMI

骨梁の形態を示す SMI は、両群ともに混合状態を呈していることが示された。

### 6) 非脱灰研磨標本の観察

LMD+AFD の海綿骨は LMD+NMD と比較して海綿骨骨梁同士の連結が多く、骨梁幅が大きい。したがって AFD 摂取群は海綿骨骨梁の密度が高いことが観察された(Fig.4)。さらに AFD 摂取群からは強い偏光特性が観察されたことから NMD 摂取群とコラーゲン線維の走行が違うことが示唆された。

### 3. 小括

以上の結果から以下のことが小括された。

- 1) 低栄養骨粗鬆症状態ラットに AFD を摂取させた場合 NMD を摂取させたラットと比較して有意に高い骨密度および骨塩量が得られた。
- 2) 低栄養骨粗鬆症状態ラットに AFD を摂取させた場合、NMD 摂取させたラットと比較して有意に密度の高い海綿骨骨梁構造が得られた。

以上より、AFD を摂取させた低栄養骨粗鬆症状態ラットは NMD を摂取したラットと比較して骨量および骨質の改善に有意であることが示唆された。

#### IV. 研究 II: 添加物配合飼料 (AFD) が卵巣摘出ラット (OVX) の大腿骨骨の構造におよぼす効果 (日本大学松戸歯学部動物実験委員会承認 (AP13MD013))

##### 1. 材料および方法

###### 1) 飼料の製作

飼料は研究 I で用いた AFD および NMD を使用した (Table 1)。

###### 2) 実験動物

実験動物は両側卵巣摘出手術を行った 19 週齢の骨粗鬆症モデル (Ovariectomized rat, 以下 OVX) Wistar 雌性ラット ((株) 三協ラボサービス, 日本) 16 頭とした。ラットの飼育は室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  および湿度  $50\pm 1\%$  とし, 餌および水は自由に摂取できるものとした。1 週間の予備飼育を行い環境変化に順応させた後, 20 週齢時に無作為に 2 群 (OVX+NMD および OVX+AFD) に割付け介入を開始した。各群は, 介入 24 週後に炭酸ガスにて安楽死させ, 大腿骨の摘出を行った (Fig.5)。なお, ラットの健康状態および成長を確認するため, 介入 8 週後, 24 週後に体重を測定した。

### 3) 測定方法

#### (1) BMD および BMC の測定

摘出した大腿骨を Nakada ら<sup>21)</sup>の方法に従い CT 撮像を行った。CT の撮像条件は、研究 I と同様である(Fig.2)。研究 I と同様に骨塩定量ファントムを CT で撮像し、TRI/3D-BON にてファントムの CT 値を校正し、検量線を作成した。BMD および BMC は撮像した海綿骨の CT 値から作成した検量線を用いて算出した。

#### (2) 3D-map の観察

研究 I と同様に撮像したデータを TRI/3D-BON にて 3Dimensional-map (以下 3D-map) にてカラーマッピングを行い、大腿骨遠位骨幹端断面の BMD を観察した。

#### (3) 骨梁構造計測

研究 I と同様に CT より得られた海綿骨の断層画像を用いて、TRI/3D-BON にて骨梁構造計測を行った。

#### (4) 非脱灰研磨標本の観察

研究 I と同様に大腿骨骨幹端部の非脱灰研磨標本を作製し、海綿骨骨梁構造の観察を行った。標本は偏光顕微鏡を用いて検板法にて骨梁構造および偏光特性の観察を行った。

### 4) 統計解析

体重、BMD、BMC および骨梁構造計測の 2 群間の比較は Student's t-test にて行った (有意確率 5%)。

## 2. 結果

### 1) 体重

NMD 群は AFD 群と比較して介入 8 週後および 24 週後において NMD 群が有

意に高い値を示した (Table 6)。

## 2) BMD および BMC

BMD および BMC とともに OVX+AFD が OVX+NMD と比較して有意に高い値を示した ( $p<0.05$ ) (Table 7)。

## 3) 3D-map の観察

研究 1 同様のカラスケールで観察した結果 OVX+AFD の海綿骨は OVX+NMD と比較し BMD が高いことが観察された (Fig.6)。

## 4) 骨梁構造計測

骨梁構造計測の結果を Table 8 に示す。骨梁構造計測により海綿骨骨梁の密度や連結の状態が観察された。

### (1) Tb.Th

骨梁幅を示す Tb.Th は、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して有意に高い値を示した ( $p<0.05$ )。これより、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して骨梁数は有意多いことが示された。

### (2) Tb.N

骨梁数を示す Tb.N は、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して有意に高い値を示した ( $p<0.05$ )。

### (3) Tb.Sp

骨梁間距離を示す Tb.Sp は、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して有意に低い値を示したことから ( $p<0.05$ )、AFD は骨梁同士の距離が短いまたは骨梁幅の増加が示された。

### (4) Tb.Spac

骨梁中心間距離を示す Tb.Spac は、AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して有

意に低い値を示したことから ( $p<0.05$ ), AFD は骨梁同士の距離が短いことが示された。

#### (5) TBPf

骨梁の連結性を示す TBPf は, AFD 摂取群および NMD 摂取群は正の値を示したことから両群ともに骨梁同士の空間が多く, 連結性が不良であることが示された。

#### (6) SMI

骨梁の形態を示す SMI は, AFD 群が 3.0, NMD 摂取群が 3.1 であった。

### 5) 非脱灰研磨標本の観察

大腿骨遠位骨幹端において, AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して密な骨梁の網目状構造が観察され, AFD 群に強い偏光特性が観察された (Fig.7)。

## 3. 小括

1) 卵巣摘出骨粗鬆症ラットに AFD を摂取させた場合 NMD を摂取させたラットと比較して有意に高い骨密度および骨塩量が得られた。

2) 卵巣摘出骨粗鬆症ラットに AFD を摂取させた場合, NMD 摂取させたラットと比較して有意に密度の高い海綿骨骨梁構造が得られた。

以上より, AFD を摂取させた卵巣摘出骨粗鬆症状態ラットは NMD を摂取したラットと比較して骨量

および骨質の改善が有意であることが示唆された。

## V. 考察

低栄養骨粗鬆症および卵巣摘出骨粗鬆症ラットに AFD を経口摂取させ, 大腿骨骨幹端における骨形成および骨構造の改善と有効性を検討することを目的に 2 つの研究を行った結果, AFD の安全性と両モデルラットにおいて NMD を摂取した場合と比較して有意に高い骨密度および骨塩量と密度の高い海綿骨骨梁構造が得



られた。すなわち、研究 I では血液生化学検査において AFD 摂取群の中性脂肪が低値を示した。これは ISO の肥満抑制効果<sup>25)</sup>により中性脂肪の低下が観察されるという報告による変化が生じたものと考えられる。一方、体重測定において急激な体重減少を認めなかったことから飼料の安全性が確認されたと考えられる。BMD および BMC は AFD 摂取群において有意に高い値を認め、3D-map の観察においても同様の結果が観察された。さらに、骨質の評価に用いた骨梁構造計測において AFD 群は NMD 群と比較して複数の項目から有意な骨質の値が得られ、さらに偏光顕微鏡観察から、AFD 群は密度の高い海綿骨骨梁構造と強い偏光特性が観察された。NMD と AFD が同じカルシウム濃度でありながら AFD が有意に低栄養状態から高い骨量と骨質の改善に効果を示したのは AFD の ISO、FOS およびクエン酸カルシウムの効果によるところが少なくないと考えられる。研究 II でも BMD および BMC は AFD 群は NMD 群よりも有意に高い値を示し、さらに 3D-map において AFD 群は NMD 群と比較して高い BMD が観察できた。骨梁構造計測は、AFD 群と NMD 群に有意な差を認め、海綿骨骨梁の密度が高いことが観察され、偏光顕微鏡観察では AFD 摂取群は NMD 摂取群と比較して海綿骨の量が多く観察された。OVX における海綿骨の減少を ISO のエストロゲン様作用によって補填し、AFD において海綿骨が有意に高い BMD として観察されたものと考えられる。以上、2つの研究で観察された BMD、BMC、および骨梁構造計測における骨の回復は NMD と比較して AFD に配合されている成分の相違が影響していると考えられた。AFD は、FOS<sup>17)</sup>、ISO<sup>18,19)</sup>、リン酸カルシウムおよびクエン酸カルシウムが配合されているほかに AFD は Nakada ら<sup>20,21)</sup>の研究で使用された飼料を改良し、リン酸カルシウムからクエン酸カルシウムに変更し、カルシウムの配合比率も合わせて変更した。クエン酸カルシウムは、市販サプリメントにおいて利用されている炭酸カルシウムと比較して、吸収される際に必要な酸とキレート作用により結合し、カルシウム成分として生体に吸収されやすい<sup>26,27)</sup>ためではないかと推察

される。さらに、FOSによるカルシウム吸収促進作用により血中カルシウム濃度が保たれ、骨吸収の抑制に働いたと推測される。また、FOSの作用である腸内細菌叢の変換作用によって、摂取したISOがエクオールとなり強いエストロゲン作用が発揮され、骨吸収の抑制に働いたものと考えられる。今後はAFDの代謝経路、カルシウム濃度のさらなる調整と至適な摂取期間について検討がなされる必要がある。AFDの評価にあたり海綿骨以外にも着目が必要であると考えられるが、AFDは低栄養骨粗鬆症および卵巣摘出骨粗鬆症ラットにおいてカルシウムの吸収促進そして骨形成の促進に効果によって、減少した骨量の回復と骨質の改善効果を示したと考えられる。

## VI. 結論

研究Iおよび研究IIの結果より、AFDは低栄養状態およびOVXのBMD、BMCおよび骨梁構造を有意に改善させる効果が示された。よって、AFDは骨粗鬆症に対し骨梁構造を改善することが示唆された。

## VII. 参考文献

- 1) Cabinet office, Government of Japan; [http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2014/zenbun/s1\\_1\\_5.html](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2014/zenbun/s1_1_5.html)
- 2) Cabinet office, Government of Japan; [http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2015/html/gaiyou/s1\\_1.html](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2015/html/gaiyou/s1_1.html)
- 3) Orino H, Yaegashi Y, Onda T, Fukushima Y, Hoshino T, Sakata K : Hip fracture incidence in Japan: estimates of new patients in 2007 and 20-year trend, **Arch Osteoporos, 4: 71-77, 2009.**
- 4) 神田省吾, 江原雄二, 大西吉之, 高石佳知, 安光秀人, 桑原明彦, 江原大輔, 山上哲賢: 歯槽骨骨密度評価装置の臨床的評価, **日顎咬合会誌, 32: 65-70, 2012.**
- 5) Itamar L, Steven P, Gustavo D: Sarcopenia and Osteoporosis Fracture, **Clinic Rev Bone Mineral Metab, 14: 38-44, 2016.**
- 6) Verschueren S, Gielen E, O'Neill TW, Pye SR, Adams JE, Ward KA, Wu FC, Szulc P, Laurent M, Claessens F, Vanderschueren D, Boonen S: Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men, **Osteoporos Int, 24: 87-98, 2013.**
- 7) Darcey J, Horner K, Walsh T et al: Tooth loss and osteoporosis: to assess the association between osteoporosis status and tooth number, **Br Dent J, 214, E10, 2013.**
- 8) Tamut T, Pooran C, Pratap SB, Arvind T, Jitendra R, Dayal SR: Effect of bone mineral density on masticatory performance and efficiency, **Gerodontology, 29: e83-e87, 2012.**
- 9) Singhal S, Chand P, Singh BP, Singh SV, Rao J, Shankar R, Kumar S: The effect of osteoporosis on residual ridge resorption and masticatory performance in denture

wearers, **Gerodontology**, **29**: e1059-e1066, 2012.

- 10) 竹内敦子, 岡野登志夫, 関本裕子, 増田園子, 宮田学, 玉井浩, 美濃 真, 小林 正: 高齢者血漿中のビタミン D 代謝物濃度と総合ビタミン剤単回投与の影響, **ビタミン**, **67**: 599-608, 1993.
- 11) 厚生労働省: 平成 25 年国民健康・栄養調査 2013, <http://www.mhlw.go.jp/>
- 12) 厚生労働省. 平成 25 日本人の食事摂取基準, 2013, <http://www.mhlw.go.jp/>
- 13) Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ: Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: A randomized controlled trial, **Am J Med**, **98**: 331-335, 1995.
- 14) Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ: Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women, **N Engl J Med**, **328**: 460-464, 1993.
- 15) Reid IR, Mason B, Horne A, Ames R, Reid HE, Bava U, Bolland MJ, Gamble GD: Randomized controlled trial of calcium in healthy older women, **Am J Med**, **119**: 777-785, 2006.
- 16) 久保田恵: カルシウム摂取による骨折・骨粗鬆症予防のエビデンス, **日本衛生学雑誌**, **58**: 317-327, 2003.
- 17) 諸橋富夫: フラクトオリゴ糖摂取により促進された腸管からのミネラル吸収が骨に及ぼす影響, **腸内細菌学雑誌**, **16**: 21-26, 2002.
- 18) Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S: Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice, **Biochem Biophys Res Commun**, **11**: 697-701, 2000.
- 19) 石見佳子, 東泉裕子: 腸内細菌が作り出す大豆イソフラボン代謝産物の有用性と安全性: エクオールの可能性, **化学と生物**, **51**: 74-77, 2013.
- 20) Nakada H, Sakae T, Watanabe T, Takahashi T, Fujita K, Tanimoto Y, Teranishi M,

- Kato T, Kawai Y: A new osteoporosis prevention supplements-diet improve bone mineral density in ovariectomized rats on micro-CT, **J Hard Tissue Biol**, **23: 1-8, 2014.**
- 21) Nakada H, Sakae T, Watanabe T, Takahashi T, Fujita K, Tanimoto Y, Okada H, Kaneda T, Kato T, Kawai Y: Structure model index changes in the femoral epiphyseal region on micro-computed tomography caused by a supplement diet in ovariectomized rats, **J Hard Tissue Biol**, **23: 169-176, 2014.**
- 22) 不破眞佐子,白石貴子,海老沢秀道: 大豆イソフラボン抽出物が骨代謝調整に及ぼす影響: ラット大腿骨遠位端における破骨細胞分化関連遺伝子の発現, **学苑・生活科学紀要**, **760: 27-32: 2006.**
- 23) 佐久間慶子: フラクトオリゴ糖によるカルシウム吸収促進の分子生物学的メカニズム, **腸内細菌学**, **16: 11-19: 2002.**
- 24) Kenney MA, McCoy H: Adding zinc reduces bone strength of rats fed a low-calcium diet, **Biol Trace Elem Res**, **58: 35-41, 1997.**
- 25) 青木直人, 荒川恵梨菜, 伊藤美幸: 大豆イソフラボンの抗酸化作用と植物エストロゲン作用による抗肥満効果の検討, **大豆たん白研究**, **9: 96-101, 2006.**
- 26) Nicar MJ, Pak CYC: Calcium bioavailability from calcium carbonate and calcium citrate, **J Clin Endocrinol Metab**, **61: 391-393, 1985.**
- 27) Harvey JA, Zobitz MM, Pak CY: Dose dependency of calcium absorption : a comparison of calcium carbonate and calcium citrate, **J Bone Miner Res**, **3: 253-258, 1988.**

Table 1. Composition of LMD, NMD, and AFD

Composition	AFD	LMD	NMD(%)
$\alpha$ -Comstarch	31.37	3.97	42.87
$\beta$ -Comstarch	15.50	11.60	15.50
Casein	14.00		14.00
Vitamin free Caseinn		14.00	
L-Cystine	0.18	0.18	18.00
Dextrin		15.50	
Sucrose	10.00	10.00	10.00
Soybean Oil	4.00	4.00	4.00
Cellulose Powder	5.00	5.00	5.00
Mineral Mixture	3.50	3.50	3.50
Vitamin Mixture	1.00	1.00	1.00
Choline Bitartrate	0.25	0.25	0.25
Tert-Butylhydroquinone	0.00	0.00	0.00
Additives			
CaCO <sub>3</sub>			0.90
<b>Fructooligosaccharides</b>	<b><u>10.00</u></b>		
<b>Isoflavone</b>	<b><u>0.50</u></b>		
<b>Calcium citrate tetrahydrate</b>	<b><u>3.00</u></b>		
Calcium phosphate, Dibasic	1.70		2.80
Total %			
<b>Ca</b>	<b><u>1.03</u></b>	<b><u>0.10</u></b>	<b><u>1.01</u></b>
<b>P</b>	<b><u>0.61</u></b>	<b><u>0.10</u></b>	<b><u>0.60</u></b>

We adjusted 1.0% and 0.1% of phosphorus and fluorine to 0.001% at a calcium level of AIN-93M with LMD. NMD which coordinated calcium of AIN-93M in 1.0%. AFD adjusted the calcium of AIN-93M to 1.0%, and combined FOS, ISO, calcium citrate.

Table 2 Body weight

	20 weeks old	After 189 days (47weeks old)	After 273 days (59 weeks old)
LMD+NMD	216.3 ± 5.8	266.4 ± 17.7*	268.9 ± 25.2*
LMD+AFD	216.2 ± 3.2	237.0 ± 16.4	226.2 ± 21.9 (g)

\*p<0.05

Table 3 Biochemical examination of blood

	LMD+NMD	LMD+AFD
AST ( IU/l )	192.8 ± 26.3	187.0 ± 79.3
ALT ( IU/l )	42.0 ± 6.2	37.7 ± 3.2
ALP ( IU/l )	247.3 ± 37.1	253.3 ± 44.8
Neutral fat ( mg/dl )	78.3 ± 28.4*	42.7 ± 25.8
Total protein( g/dl )	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.3
Albumin ( g/dl )	7.2 ± 0.4	7.0 ± 0.5
Blood glucose ( mg/dl )	107.6 ± 7.5	95.0 ± 10.0
Total bilirubin ( mg/dl )	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Urea nitrogen ( mg/dl )	12.0 ± 1.0	12.0 ± 1.7
Total cholesterol ( mg/dl )	134.0 ± 20	108.0 ± 13.1
Calcium ( mg/dl )	11.3 ± 0.1	11.3 ± 0.6
Phosphorus ( mg/dl )	5.8 ± 0.3	5.6 ± 0.2
Creatinine ( mg/dl )	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Sodium ( µEq/l )	144.7 ± 1.2	144.0 ± 1.0
Potassium ( µEq/l )	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2
Crawl ( µEq/l )	97.3 ± 2.1	97.3 ± 1.5

\*p<0.05



Table 4 BMD and BMC of the cancellous bone

### Trabecular Bone

	LMD+NMD	LMD+AFD	
BMD	754.3 ± 8.2	775.0 ± 4.8*	(mg / cm <sup>3</sup> )
BMC	0.70 ± 0.04	1.01 ± 0.03*	(mg )

\*p<0.05

Bone density of the cancellous bone in each group after 273 days (\*p<0.05)

Table 5 Trabecular structure measurement

		LMD+NMD	LMD+AFD
Tb.Th	( $\mu\text{m}$ )	$68.1 \pm 1.6$	$78.4 \pm 2.7^*$
Tb.N	(1/mm)	$0.5 \pm 0.04$	$0.7 \pm 0.031^*$
Tb.Sp	( $\mu\text{m}$ )	$218.2 \pm 8.0$	$87.5 \pm 6.2^*$
Tb.Spac	( $\mu\text{m}$ )	$289.4 \pm 7.1$	$257.2 \pm 4.8^*$
TBPf	(1/mm)	$26.0 \pm 2.1$	$21.4 \pm 2.7$
SMI		$3.1 \pm 0.07$	$2.8 \pm 0.05^*$

p<0.05

Three-dimensional structure analysis of the trabecula in each group after 273 days

(\*p<0.05)

Table 6 Body weight

	20weeks old	8weeks after	24weeks after
OVX+AFD	202.5±7.7	233.8±7.7	267.7±9.3
OVX+NMD	202.2±4.9	284.7±15.4*	341.5±16.7*

(g)

\* p<0.05

Table 7 BMD and BMC of the cancellous bone

Trabecular Bone			
	OVX+AFD	OVX+NMD	
BMD	768.1 ± 11.2*	735.2 ± 7.5	(mg)
BMC	0.67 ± 0.13*	0.17 ± 0.07	(mg / cm <sup>3</sup> )

\* p<0.05

Bone density of the cancellous bone in each group after 24weeks.

Table 8 Trabecular structure measurement

		OVX+AFD	OVX+NMD
Tb.Th	( $\mu\text{m}$ )	$76.5 \pm 2.0^*$	$69.4 \pm 4.0$
Tb.N	(1/mm)	$0.3 \pm 0.02^*$	$0.1 \pm 0.04$
Tb.Sp	( $\mu\text{m}$ )	$220.8 \pm 23.3^*$	$427.1 \pm 48.3$
Tb.Spac	( $\mu\text{m}$ )	$285.8 \pm 29.3^*$	$496.6 \pm 50.5$
TBPf	(1/mm)	$21.5 \pm 0.8$	$25.7 \pm 4.9$
SMI		$3.0 \pm 0.05^*$	$3.1 \pm 0.05$

\*  $p < 0.05$

Three-dimensional structure analysis of the trabecula in each group after 24 weeks.

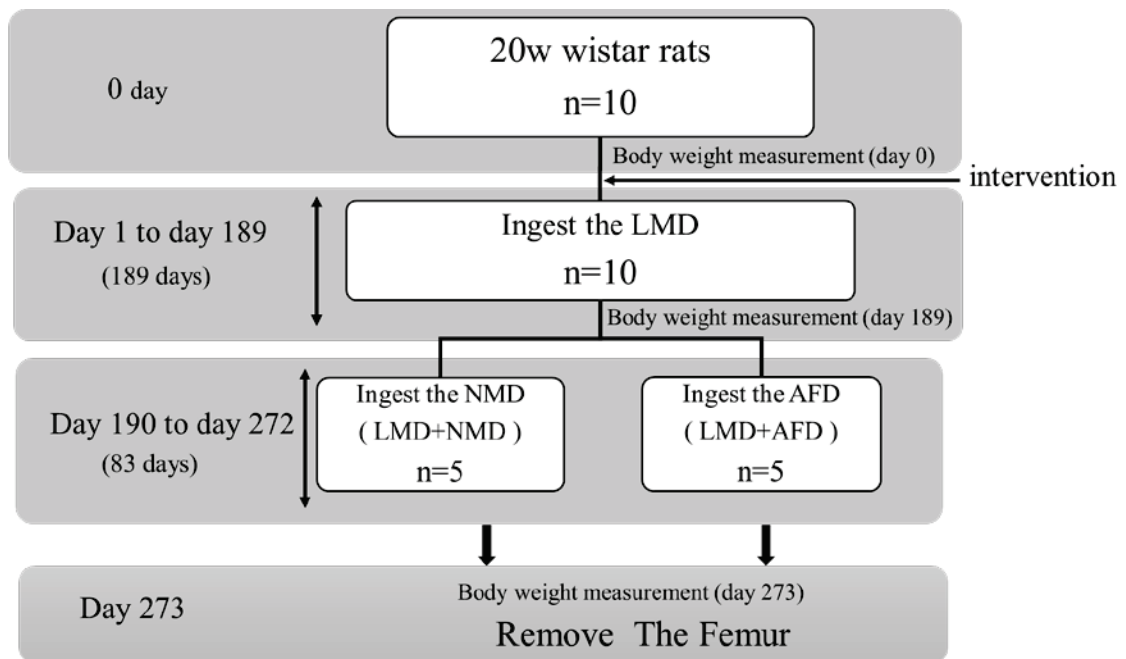


Fig.1 Time schedule for low mineral diet rats

Ten rats were assigned into to 2-groups (n=5). LMD was adopted for 189 days from 20 weeks after birth to produce low nutrient osteoporosis rat. They were fed NMD (LMD+NMD), and AFD (LMD+AFD) for 84 days from day 190, before euthanasia.

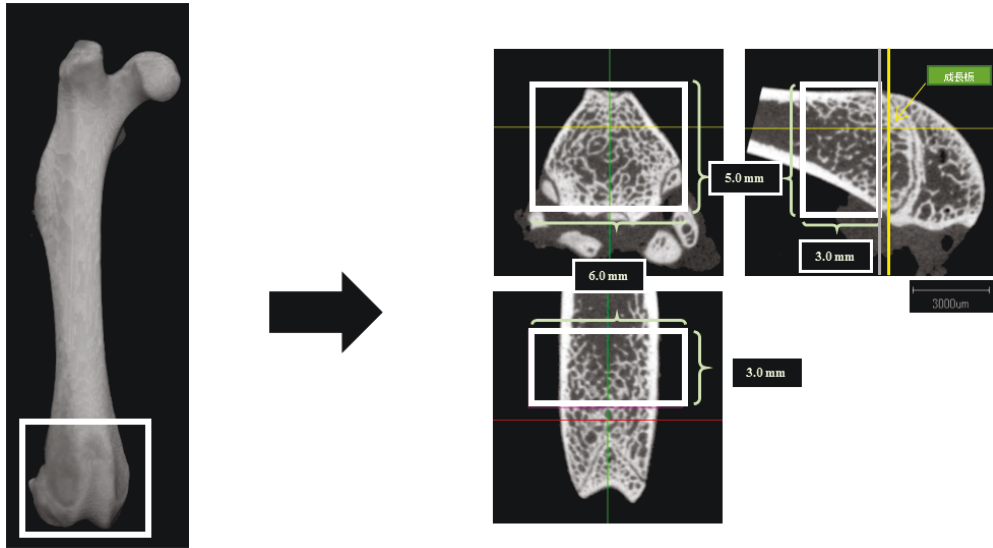


Fig.2 Observation site of the thigh bone

Observation site in micro-CT. The voxel size was  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  for 26 s for a tube electric current of  $160\ \mu\text{A}$ , tube voltage of  $90\ \mu\text{V}$ , FOV of 10 mm. The imaging range in the distal thigh bone metaphysic was  $6.0\ \text{mm} \times 5.0\ \text{mm} \times 3.0\ \text{mm}$ .

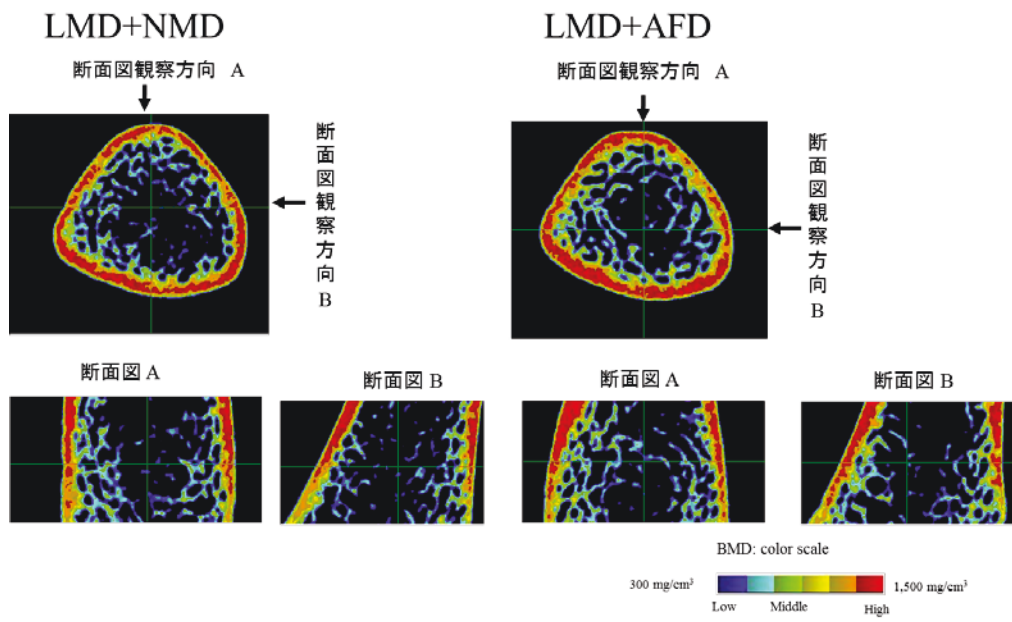
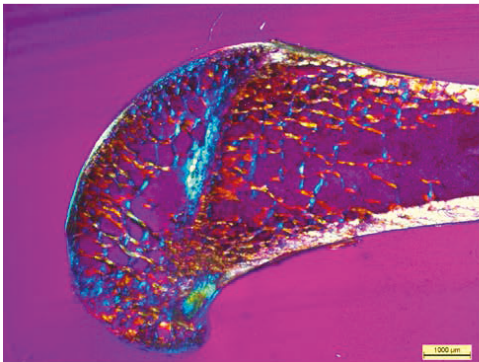


Fig.3 3D-map

BMD color mapping in each group after 273 days



LMD+NMD



LMD+AFD

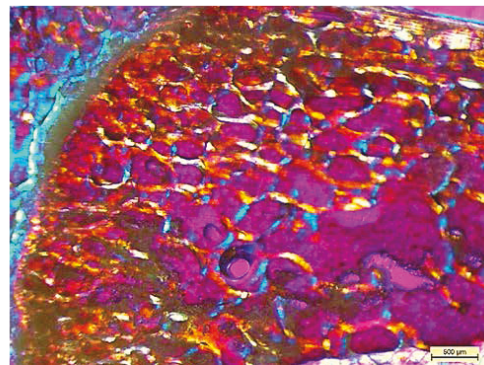
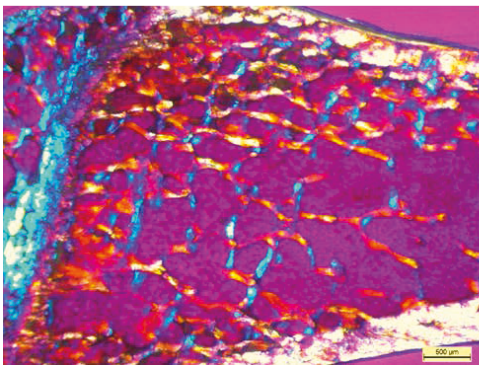
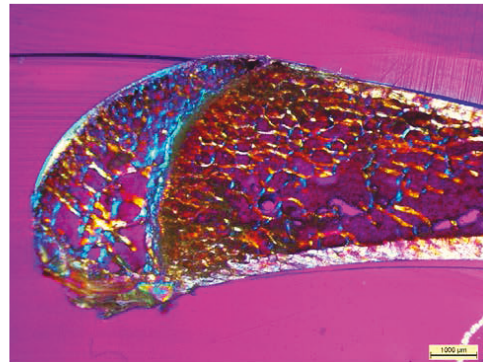


Fig.4 Observation of the polarization microscope image

The cancellous bone was observed under a polarization microscope using the inspection plate method

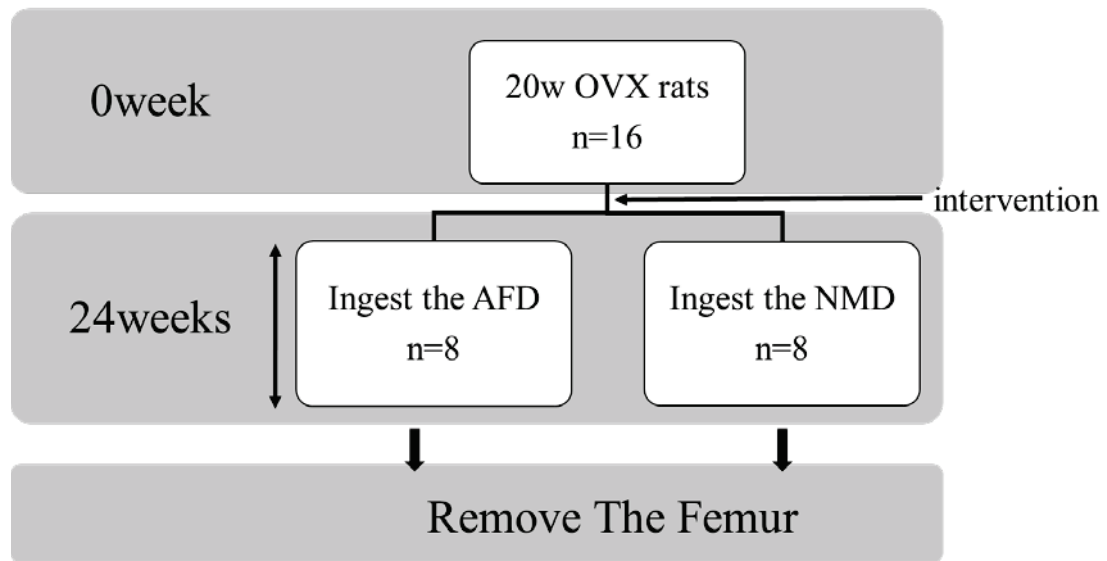


Fig.5: Time schedule of OVX rats model

Sixteen OVX rats were assigned into to 2-groups (, n=8, respectively). They were fed with AFD (OVX+AFD) or NMD (OVX+NMD) for 24weeks before euthanasia.

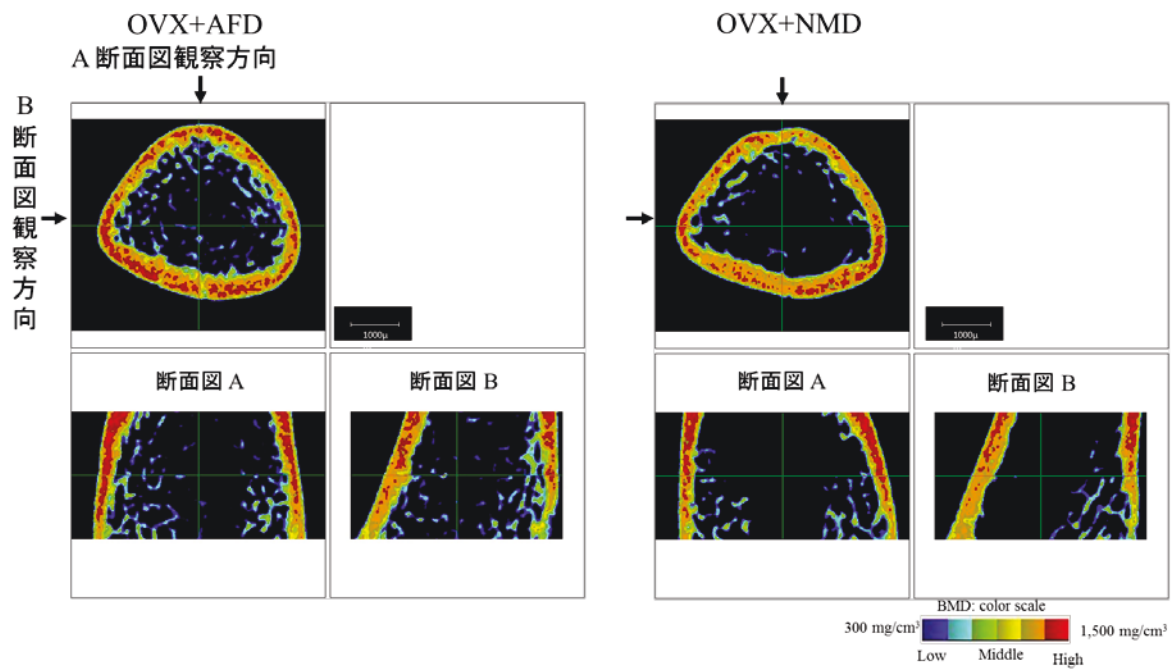
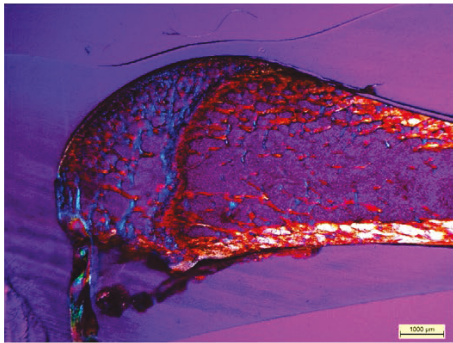


Fig.6 3D – map

BMD values were color coded in the range of  $300 \text{ mg} / \text{cm}^3 - 1500 \text{ mg} / \text{cm}^3$ .

Blue to light blue represent low BMD, yellow-green to yellow intermediate BMD, and orange to red high BMD.

OVX+AFD



OVX+NMD

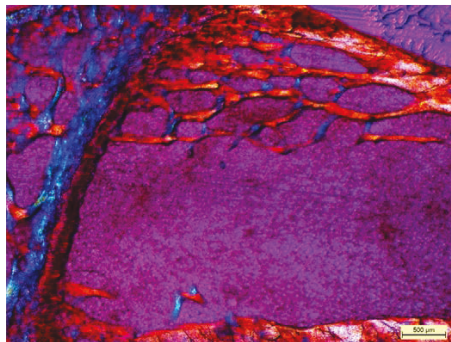
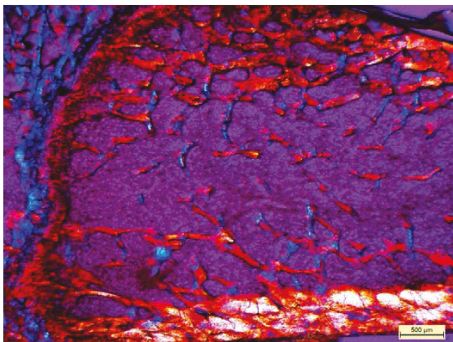
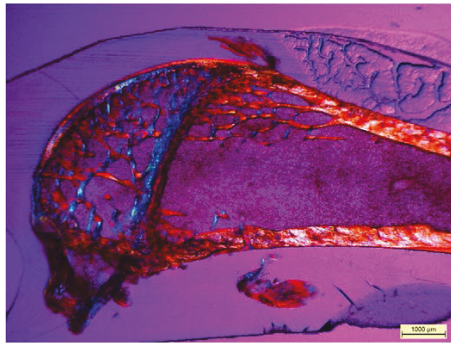


Fig.7 Polarized light micrograms