

去勢雌ラット骨密度に与えるフェルラ酸の影響

左雨秀治¹, 鈴木敏恵², 工藤秀機², 坂本 忍²

¹ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

² 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

要旨

フェルラ酸は、石炭酸化合物で、植物に多く含まれ抗酸化作用を有し、神経細胞や脳細胞に於ける酸化的ストレスや神経毒性を防ぐことが知られている。私共は、小麦胚抽出物質がハト素囊腺テスト陽性であるところから、この抽出物質にはプロラクチン関連物質の含まれること、更にフェルラ酸の含まれることを報告した。雄ラットにフェルラ酸を投与したところ、血中黄体化ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、プロラクチンの増加が認められた。閉経後婦人の骨密度減少と同様に、去勢後の雌ラット骨密度減少が知られているところから、フェルラ酸を去勢雌ラットに長期投与して、血中ホルモンおよび骨代謝に与える影響について検討した。両側卵巣摘除にもかかわらず、フェルラ酸投与により血中エストラジオール濃度のわずかな増加、アルカリフォスファターゼ活性の上昇と脛骨骨密度の増加が認められた。フェルラ酸は直接的または間接的にステロイド代謝の芳香化を刺激してエストロゲン産生を促し、骨密度増加をもたらすことが推測された。

キーワード

フェルラ酸, 去勢雌ラット, 骨密度

1. 緒言

フェルラ酸 (FA) (ferulic acid: 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) は石炭酸化合物で、植物に多く含まれ抗酸化作用を有すると報告され¹⁻⁴⁾、神経細胞や脳細胞に於ける酸化的ストレスや神経毒性を防御する作用が知られている⁵⁻⁸⁾。FA はアルツハイマー病の β アミロイド線維形成を抑制すること^{9, 10)}、マウスに FA を長期投与すると amyloid β -peptide 誘発の学習障害を防御するとの報告もある¹¹⁻¹³⁾。胚芽米には FA や更年期障害に用いられる γ オリザノールが含まれ、 γ オリザノールは肝臓で FA に代謝される¹⁴⁾。

1974 年、岡本らは、小麦胚抽出物質がハト素囊腺テスト陽性であるところから、この抽出物質にはプロラクチン様物質の含まれる可能性を報告した¹⁵⁾。更に小麦胚の抽出精製を進めたところ、抽出物質には FA の含まれること

を突き止めた。そこで、エストラジオール (E_2) およびプロゲステロン (P_4) で前処理し、下垂体中の性腺刺激ホルモン分泌抑制下の雄ラットに FA 1mg を静注したところ、血中 LH およびプロラクチンを漸増させた。このことがハト素囊腺テスト陽性を引き起こしたと理解できた¹⁶⁾。さらに、去勢処理した雄ラットに FA 1 μ g を静注したところ、血中 FSH の上昇が認められた¹⁷⁾。

閉経後婦人の骨密度減少と同様に、去勢後の雌ラット骨密度減少が知られている¹⁸⁻²⁰⁾。そこで今回、両側卵巣摘除後、長期間経過観察した雌ラットに、FA 1 μ g を長期間投与し、血中エストラジオール (E_2) 濃度、カルシウム濃度、アルカリフォスファターゼ活性および脛骨骨密度に与える影響を検討した。

材料および方法

実験には Sprague-Dawley 雌ラット (三協ラボサービス, 東京) を用い, 8 匹ずつの 2 群に分けた. 東京医科歯科大学実験動物施設内において飼育し, 実験期間中は採光, 温度, 湿度は一定に保たれ, カルシウム 1.18%, リン 1.03% を含む実験動物用普通飼料 (CE-2, クレア, 東京) および水道水は自由摂取とした. 実験計画および動物取扱いは, 東京医科歯科大学実験動物取り扱い基準および指針に従った.

9 週齢において, 16 匹の雌ラットに両側卵巣摘出手術 (OVX) を施行した. 35 週間後の 44 週齢から実験が開始された. 対照群として, 両側卵巣を摘出されたラット 8 匹 (OVX-control 群) に生理的食塩水 0.1 mL を連日 8 週間皮下注射した. 残り 8 匹にフェルラ酸 (FA: 1.0 μg /0.1 mL 生理的食塩水: 東京化成工業, 東京) を同じく連日 8 週間皮下注射しフェルラ酸投与群 (OVX-FA 群) とした.

実験開始 8 週間後の 52 週齢において, 全ての動物はウレタン (150 mg/100 g 体重: メルク, ドイツ) 麻酔下で心臓穿刺法により採血後, 頸椎脱臼により屠殺し, 両側脛骨を摘出して 99.5% エタノールにて固定保存した. 摘出臓器 (子宮, 副腎, 脾臓) 湿重量を測定し記録した. 摘出脛骨標本は, その後, dual energy absorptiometry (DXA) 法で骨密度を測定した. 尚, 骨密度測定には, 全脛骨と海

綿骨に恵まれ骨量の増減が明確に反映される脛骨近位骨幹端が用いられ, 左右の平均値を記録した.

血中 estradiol (E_2) 濃度測定には, DPC RIA キット (日本 DPC, 東京) が用いられ, calcium (Ca) 濃度および alkaline phosphatase (ALP) 活性測定には, それぞれ Calcium C-test および Alkaline phosphatase B-test (和光純薬, 東京) が用いられた.

統計処理には, one-way analysis of variance (ANOVA) および unpaired *t*-test が用いられ, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした.

結果

1) 体重, 臓器湿重量, 血中 estradiol (E_2), calcium (Ca) 濃度および alkaline phosphatase (ALP) 活性に与える FA の影響 (表 1).

体重および臓器湿重量では, FA 投与による影響は認められなかった.

血中 E_2 濃度は, FA 投与により, わずかな増加を示した ($p < 0.05$). 血中 Ca 濃度は, FA 投与による影響は認められなかった. ALP 活性は, FA 投与により 33.3% の増加を示した ($p < 0.01$).

2) 脛骨骨密度に与える FA の影響 (図 1).

脛骨骨密度は, FA 投与により全脛骨で 5.2%, 脛骨近

表 1 群間における体重変化, 臓器湿重量 (mg/100 g 体重) および血中エストロダイオール (E_2), カルシウム (Ca) 濃度, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

	OVX -control	OVX -FA
開始時体重	361 \pm 25	365 \pm 12
終了時体重	369 \pm 25	372 \pm 16
子宮	22.2 \pm 1.6	21.1 \pm 0.8
副腎	15.6 \pm 1.0	16.0 \pm 0.8
脾臓	158 \pm 14	156 \pm 12
E_2 (pg/mL)	3.31 \pm 0.31	5.41 \pm 0.81*
Ca (mg/dL)	10.3 \pm 0.2	10.3 \pm 0.3
ALP (IU/L)	114 \pm 12	152 \pm 13**

OVX-control: 卵巣摘除対照群, OVX-FA: (去勢済み) フェルラ酸投与群
Mean \pm SEM (n = 8)

** および *: OVX-control 群に対して $p < 0.01$ および 0.05 にて有意差あり.

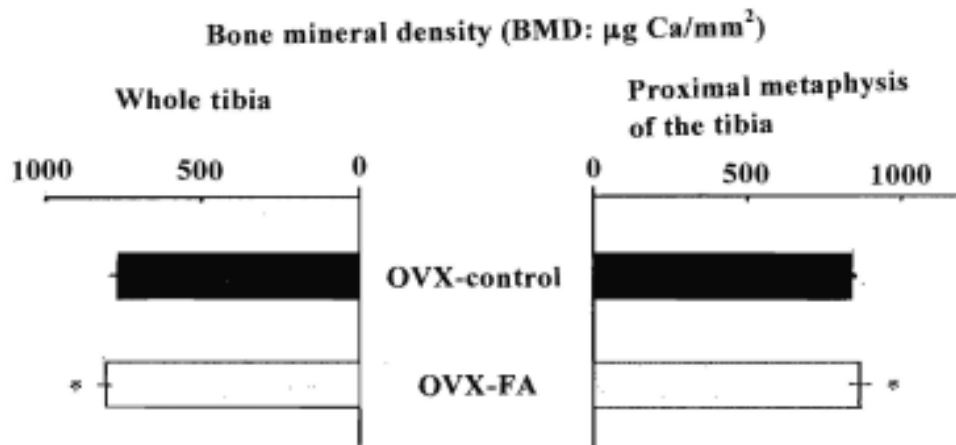


図1 群間における脛骨骨密度 (µg Ca/mm²)

Whole tibia: 全脛骨, Proximal metaphysis of the tibia: 脛骨近位骨幹端

OVX-control: 卵巣摘除対照群, OVX-FA: (去勢) フェルラ酸投与群

Mean ± SEM (n = 8)

* OVX-control 群に対して P < 0.05 で有意差あり.

位骨幹端において 4.2% の骨密度増加が認められた (p < 0.05).

考察

抗酸化作用を有し¹⁻⁴⁾, 果物や植物に含まれている FA は脳細胞においてロイコトリエン (leukotriene) 産生を抑制して酸化ストレスを軽減させる可能性が^{5, 6)}, また, 培養神経細胞において鉄誘発による酸化障害とアポトーシスを減弱させ⁷⁾, amyloid β-peptide 誘発による酸化ストレスや神経毒性を防ぐ事が報告されている⁸⁾. FA や肝臓で FA に代謝される γ-オリザノール¹⁴⁾ を含む胚芽米の長期投与により, マウスの amyloid β-peptide 誘発による学習障害や記憶障害を防ぐことができるという報告もある¹¹⁻¹³⁾.

私共も, かねてより FA に着目し研究を重ねてきた. 1974 年に岡本は小麦胚抽出物質がハト素囊腺テスト陽性を示し, プロラクチン関連物質を含む可能性を指摘した¹⁵⁾. 更に抽出精製を進めたところ抽出物質には FA の含まれること, 雄ラットに FA を投与したところ血中 LH, FSH, プロラクチンの増加が認められた^{16, 17)}. そこで今回, FA をラットに長期投与して血中ホルモンおよび骨代謝に与える影響について検討した.

子宮・副腎・脾臓湿重量に変化が認められなかった事は FA がホルモン作用および毒性を有していない事, また血中カルシウム濃度に影響を認めなかった事は FA がカルシ

ウム代謝に拘っていない事の可能性が示唆された.

両側卵巣摘除にもかかわらず, FA 投与により血中 E₂ 濃度のわずかな増加, ALP 活性の上昇と脛骨骨密度の増加が認められた. 以上より, FA が直接的または間接的にステロイド代謝の芳香化を刺激して E₂ 産生を促し, 骨密度増加をもたらすものと推測された. FA はアルツハイマー病や認知症などのような病変ばかりではなく, 下垂体などの脳内物質, 脳神経細胞やステロイド代謝などに影響を与えて, 更年期・老年期骨粗鬆症などの退行期病変の治療に有望である可能性が示唆された.

文献

- 1) Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radic Biol Med 1922; 13: 435-448.
- 2) Scott BC, Butler J, Halliwell B, et al. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. Free Radic Res Commun 1993; 19: 241-253.
- 3) Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, et al. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. J Nutr Biochem 2002; 13: 273-281.
- 4) Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. J Agric Food Chem 2002; 50: 2161-2168.

- 5) Murakami A, Kadota M, Takahashi D, et al. Suppressive effects of novel ferulic acid derivatives on cellular responses induced by phorbol ester, and by combined lipopolysaccharide and interferon- γ . *Cancer Lett* 2000; 15: 77-85.
- 6) Hosoda A, Ozaki Y, Kashiwada A, et al. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 1189-1196.
- 7) Zhang Z, Wei T, Hou J, et al. Iron induced damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol* 2003; 467: 41-47.
- 8) Sultana R, Ravagna A, Mohmmad-Abdul H, et al. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β -peptide (1-42) - induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *J Neurochem* 2005; 92: 749-758.
- 9) Ono K, Hirohata M, Yamada M. Ferulic acid destabilizes preformed β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 444-449.
- 10) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, et al. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am J Pathol* 2009; 175: 2557-2565.
- 11) Yan JJ, Cho JY, Kim HS, et al. Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 89-96.
- 12) Kim HS, Cho JY, Kim DH, et al. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on microglial activation induced by intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide (1-42) in mice. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 120-121.
- 13) Mamiya T, Asanuma T, Kise M, et al. Effects of pre-germinated brown rice on β -amyloid protein-induced learning and memory deficits in mice. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1041-1045.
- 14) Umehara K, Shimokawa Y, Miyamoto G. Effects of γ -oryzanol on cytochrome P450 activities in human liver. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1151-1153.
- 15) Okamoto R, Takahashi M. Effects of extracts from corn germ on pigeon crop sack test. *Folia Endocrinol Japan* 1974; 50: 920.
- 16) Okamoto R, Sakamoto S, Noguchi K, et al. Effects of ferulic acid on FSH, LH and prolactin levels in serum and pituitary tissue of male rats. *Proc Japan Acad* 1976; 52: 264-267.
- 17) Sassa S, Sakamoto S, Kudo H, et al. Effects of castration and ferulic acid on serum FSH and LH levels in male rats. *Medicine Biol* 1982; 104: 159-161.
- 18) 左雨秀治, 加藤友康, 坂本 忍: 成熟去勢雄ラットのステロイドホルモンとカルシウム代謝に与える Glycyrrhizin の影響. *日本内分泌学会雑誌* 1997; 73(4): 521-528.
- 19) 左雨秀治, 坂本 忍, 三田村匡・他. 骨粗鬆症モデルラット骨量に対する生薬升麻を含む漢方製剤の効果. *和漢医薬学雑誌* 2001; 18: 127-132.
- 20) Sassa S, Nemoto N, Okabe H, et al. Effects of Chinese herbal medicines on bone loss in castrated female rats. In: Govil JN, Singh VK editors. *Recent Progress in Medicinal Plants*. Vol.29, Drug Plants III, Studium Press LLC, U.S.A.; 2010, p. 31-40.

Effects of Ferulic Acid on Bone Mineral Density in Castrated Female Rats

Shuji Sassa¹, Satoe Suzuki², Hideki Kudo², Shinobu Sakamoto²

¹ Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University;

² Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology,
Bunkyo Gakuin University

Abstract

Ferulic acid, a phenolic compound and a major constituent of plants, is well known as an antioxidant. It has been reported that long-term administration of ferulic acid can protect mice from amyloid β -peptide induced learning and memory deficit. As previously reported, extracts from corn germ induced a positive response in the pigeon crop sack test, which was used for the detection of prolactin-related substances. A substance of the extracts was ferulic acid, which slightly influenced gonadotropin levels in male rats. In the present study, we investigated the effects of ferulic acid on plasma levels of ovarian hormones and bone mineral density in ovariectomized rats. At 9 weeks of age, Sprague-Dawley female rats were divided into 2 groups of 8 rats each, and all the animals underwent ovariectomy. Beginning at 44 weeks of age, the rats in each group were given subcutaneous injections of 0.9 % NaCl solution and ferulic acid 1.0 μg once a day for 8 weeks, respectively. Long-term administration of ferulic acid slightly enhanced the levels of plasma estradiol and alkaline phosphatase activity, and slightly elevated bone mineral density of tibia in ovariectomized animals.

Key words —— Ferulic acid, ovariectomized rats, bone mineral density

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.6: 13-17