

氏 名	中岡 加奈絵
学 位 の 種 類	博士（学術）
学位記の番号	甲第224号
学位授与年月日	2020（令和2）年3月20日
学位授与の要件	日本女子大学学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	骨粗鬆症予防に関する研究—食事性因子が体組成や骨強度、アルカリホスファターゼに及ぼす影響—
論文審査委員	主査 五関 正江 （人間発達学専攻 教授） 副査 佐藤 和人 （人間発達学専攻 教授） 太田 正人 （人間発達学専攻 准教授） 折茂 英生 （日本医科大学 名誉教授）

論文の内容の要旨

日本は世界で最も高い高齢化率を示し、平成28年の時点で男性の平均寿命は80.98歳、女性においては87.14歳となっている。一方で、健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間を示す健康寿命は、男性で72.14歳、女性で74.79歳であることが報告されており、平均寿命と健康寿命の差を縮小することが課題となっている（令和元年版高齢社会白書）。高齢者が要支援・要介護になる原因の約5分の1が転倒・骨折や関節疾患などの運動器障害によるものであり、運動器の維持のための対策が望まれる。骨粗鬆症は、「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」と定義されている。骨の健康はQOL（quality of life）維持に重要な役割を果たすことから、骨粗鬆症の発症を予防するために、成長期に高い最大骨量（peak bone mass）を獲得し、加齢などに伴う骨密度低下を抑制することが重要である。特に女性では、閉経後のエストロゲン分泌の低下により骨密度が急激に低下することが報告されている。

骨代謝に関連のある酵素として、アルカリホスファターゼ（ALP; alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1）があげられる。ALPはアルカリ性（pH 8-10）に至適pHを有し、リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒する酵素である。ヒトのALPは、骨や肝臓、腎臓などに存在する組織非特異型ALP（TNSALP; tissue-nonspecific ALP）、小腸に存在する小腸型ALP（IAP; intestinal ALP）、胎盤型ALP、生殖細胞型ALPの少なくとも4種類のアイソザイムに分類されている。いずれのアイソザイムにおいても、リン酸化合物を加水分解して無機リン酸を提供することでリン酸代謝に関わっており、共通の生理的機能を有することが推察されている¹⁾。TNSALP遺伝子の欠損により引き起こされる低ホスファターゼ症（HPP; hypophosphatasia）の研究から、TNSALPは骨組織の石灰化に深く関与していることが示されており²⁾、「骨芽細胞分化マーカー」として知られている。小腸に存在するIAPについては、ラットを用いた研究において、食事性因子や脂質代謝との関連が深いこ

とが示されており^{2,3)}、「腸上皮細胞分化マーカー」として知られている。また、IAPには粘膜防御因子としての作用があり、腸内細菌由来のリポ多糖（LPS ; lipopolysaccharide）などを脱リン酸化して解毒することで、消化管由来の全身性炎症を予防する重要な役割を担っている可能性が示されている³⁾。さらに、IAPノックアウトマウスでは、顕著な体重増加や血中脂質パラメーターの異常などの表現型が報告されており、IAPが生活習慣病予防に重要な役割を果たす可能性が示唆されている⁴⁾。このように近年、ALPの生理機能の解明が進められているが、不明な点も多く残されている。食事性因子がALPに及ぼす作用について検討することは、ALPの機能解明だけでなく、食事性因子によるリン代謝や腸管におけるホメオスタシス維持などの生体内での役割についても新たな証拠が得られることが期待され、骨粗鬆症予防や、生活習慣病予防の観点からも重要であると考えられる。

本研究では、骨粗鬆症の予防において食習慣が重要な位置づけであることを踏まえ、食事性因子が体組成や骨強度、アルカリホスファターゼに及ぼす影響について、骨粗鬆症予防、生活習慣病予防の観点から、骨組織のALPだけでなく、小腸におけるALPについても検討することを目的とした。

研究結果については、以下の2章から構成される論文にまとめた。

第1章 食事性因子が体組成や骨強度に及ぼす影響

<研究1>

雄性ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限が体組成や骨強度に及ぼす影響

<研究2>

卵巣摘出ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限が体組成や骨強度に及ぼす影響

<研究3>

週齢の異なる雄性ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限が体組成や骨強度に及ぼす影響

<研究4>

卵巣摘出ラットにおける高脂肪食摂取時の葉酸制限が体組成や骨強度に及ぼす影響

第2章 食事性因子がアルカリホスファターゼに及ぼす影響

<研究5>

雄性ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限がアルカリホスファターゼに及ぼす影響

<研究6>

卵巣摘出ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限がアルカリホスファターゼに及ぼす影響

<研究7>

週齢の異なる雄性ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限がアルカリホスファターゼに及ぼす影響

まず、第1章（研究1～4）では、現在の食生活上の課題が骨強度に及ぼす影響につい

て明らかにするために、食事性因子として高脂肪食摂取時の「ビタミンD」や「葉酸」の不足を取り上げて検討を行った。また、骨粗鬆症においては転倒による骨折予防も重要であることから、これらの食事性因子が骨代謝だけでなく、筋代謝に及ぼす影響についても検討した。第2章（研究5～7）では、高脂肪食摂取時の「ビタミンD」の不足が、骨組織や小腸などの各組織におけるアルカリホスファターゼ活性や小腸型アルカリホスファターゼの遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。

第1章 食事性因子が体組成や骨強度に及ぼす影響

世界中の多くの国で高脂肪食の摂取やビタミンD不足が重要な課題となっている。平成29年国民健康・栄養調査結果によると、日本において脂肪エネルギー比率が30%以上の者の割合は、20歳以上の男性では30.8%であり、20歳以上の女性では39.8%であることが報告されている。ビタミンDは、骨代謝に深く関わる栄養素の1つであり、主に腸管からのカルシウムやリンの吸収促進に関与している。ビタミンDの作用不足は、骨石灰化障害や骨密度の低下を招くことで骨折リスクの上昇をきたすだけでなく、骨格筋の萎縮や筋力の低下にも関与している⁵⁾。これまでの日本人の成人男女を対象とした先行研究において、ビタミンDが充足している者の割合は9.1%であり⁶⁾、ビタミンD不足やビタミンD欠乏に該当する者の割合は、それぞれ81.3%、1.2%であることが示されている⁷⁾。葉酸は、水溶性ビタミンの一種であり、葉酸の不足により血中ホモシステイン濃度が上昇することが知られている。高ホモシステイン血症は、動脈硬化と関連し、骨折リスクを高めることが報告されている⁸⁾。以前の研究において、ホモシステイン代謝で重要な役割を果たすメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素をコードする遺伝子の一塩基多型が報告されており、点変異によって酵素活性が低下し、血清葉酸レベルを維持するのにより多くの葉酸摂取が必要になることが示されている⁹⁾。

これまでにビタミンD欠乏や葉酸欠乏が骨強度に及ぼす影響に関する研究は行われているが、高脂肪食摂取時におけるビタミンD不足や葉酸不足が骨強度に及ぼす影響については検討されていない。そこで今回、＜研究1＞では雄性ラット、＜研究2＞では卵巣摘出ラット、＜研究3＞では異なる週齢の雄性ラットを用い、高脂肪食摂取時におけるビタミンD制限が体組成や骨強度に及ぼす影響について検討を行った。＜研究4＞では、卵巣摘出ラットを用い、高脂肪食摂取時の葉酸制限が体組成や骨強度に及ぼす影響について検討を行った。

＜研究1＞では、11週齢Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを「コントロール食群」、「ビタミンD制限食群」、脂肪エネルギー比率を約40%に調製した「高脂肪食群」、高脂肪食のビタミンDを制限した食餌を与えた「高脂肪ビタミンD制限食群」の計4群に分けた。実験食開始後28日目の内臓脂肪量において、「高脂肪食群」は「コントロール食群」と比べて有意に高値を示し、筋肉量については、「ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」と比べて低値傾向を示した。大腿骨のカルシウム含有量において、「ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」と比べて有意に低値を示した。また、大腿骨の全骨密度、皮質骨密度、海綿骨密度については、いずれにおいても「高脂肪ビタミンD制限食群」が「高脂肪食群」に比べて有意に低値を示した。これらの結果より、高脂肪食摂取時のビタミンD制限によって、大腿骨の骨密度が低下することが明らかになった。

＜研究2＞では、ヒト閉経後骨粗鬆症モデルである卵巢摘出ラットを用いた検討を行った。12週齢SD系雌性ラットを偽手術群と卵巢摘出群に分け、卵巢摘出群を14週齢時に＜研究1＞と同様に「コントロール食群」、「ビタミンD制限食群」、「高脂肪食群」、「高脂肪ビタミンD制限食群」の4つの実験食群に分け、28日間飼育した。大腿骨の骨梁骨密度ならびに皮質骨厚において、「卵巢摘出・ビタミンD制限食群」ならびに「卵巢摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巢摘出・コントロール食群」と比較し、それぞれ有意に低値となった。また、「卵巢摘出・ビタミンD制限食群」ならびに「卵巢摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巢摘出・コントロール食群」と比べて、ヒラメ筋および腓腹筋重量において有意に低値となった。そこで、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 分析により、筋形成調節因子である*myogenin*遺伝子のmRNA発現量について比較したところ、「卵巢摘出・ビタミンD制限食群」ならびに「卵巢摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巢摘出・コントロール食群」と比較し、それぞれ有意に低値となった。これらの結果より、「卵巢摘出・ビタミンD制限食群」は「卵巢摘出・コントロール食群」と比べ、骨密度や筋肉量が低下することが示された。さらに、「卵巢摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」においても、「卵巢摘出・コントロール食群」と比べて骨密度や筋肉量が低下することが示された。また、ヒラメ筋および腓腹筋のいずれにおいても*myogenin*遺伝子のmRNA発現量が低値を示したことから、ビタミンD制限や高脂肪食摂取時のビタミンD制限は、筋形成調節に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

＜研究3＞では、さらに幼若ラットとして7週齢、成熟ラットとして14週齢のSD系雄性ラットを用い、週齢の違いについて検討を行った。それぞれの週齢のラットを＜研究1＞と同様に「コントロール食群」、「ビタミンD制限食群」、「高脂肪食群」、「高脂肪ビタミンD制限食群」に分け、28日間飼育した。ビタミンD制限、高脂肪食、週齢を因子とし、三元配置分散分析を行ったところ、カルシウム吸収率について、ビタミンD制限の影響が有意であり、ビタミンD制限群がビタミンD非制限群と比較して有意に低値を示した。いずれの週齢においても、高脂肪食摂取により体脂肪量の有意な増加が認められ、ヒラメ筋および腓腹筋重量は、ビタミンD制限によって有意に低値を示した。また、大腿骨ならびに腰椎の骨密度や皮質骨厚において、ビタミンD制限による影響が有意であり、ビタミンD制限群がビタミンD非制限群と比較して有意に低値を示した。これらの結果より、7週齢および14週齢の雄性ラットでは、高脂肪食摂取時においても、ビタミンD制限によって、大腿骨ならびに腰椎の骨密度や筋肉重量が低下することが明らかになった。

ラットを用いた先行研究において、妊娠期間中に葉酸を摂取しても、妊娠前の28日間の葉酸制限によって、出産後の母体の大腿骨の骨密度が低下することが報告されている¹⁰⁾。また、これまでに葉酸欠乏または高脂肪食が筋代謝や骨代謝に及ぼす影響に関する研究は行われているが、高脂肪食摂取時の葉酸制限の影響については検討されていない。そこで、＜研究4＞では、12週齢SD系雌性ラットに偽手術あるいは卵巢摘出術を施し、14週齢時に卵巢摘出群を「コントロール食群」、「葉酸制限食群」、「高脂肪食群」、「高脂肪葉酸制限食群」に分け、28日間飼育した。その結果、卵巢摘出群において、高脂肪食摂取により、腹部脂肪量の有意な増加が認められ、大腿骨の海綿骨密度において、「卵巢摘出・高脂肪葉酸制限食群」が「卵巢摘出・高脂肪食群」と比べて有意に低値となった。卵巢摘出ラットにおける高脂肪食摂取時の葉酸制限が大腿骨の海綿骨密度を低下させることを示す

ことができ、骨粗鬆症予防のための適切な葉酸摂取の重要性が考えられた。

第1章において、雄性ラットならびに卵巣摘出ラットでは、高脂肪食摂取時においても、ビタミンD制限によって、骨密度が低下することが明らかになった。また、7週齢および14週齢のいずれの週齢の雄性ラットにおいても、同様の結果が得られた。さらに、高脂肪食摂取時の葉酸制限が骨密度を低下させることも示すことができた。今後は、ビタミンD制限と高脂肪食摂取時のビタミンD制限、あるいは、葉酸制限と高脂肪食摂取時の葉酸制限における骨強度低下のメカニズムについて、より詳細な検討を行うことにより、骨粗鬆症予防の一助となることが期待される。

第2章 食事性因子がアルカリホスファターゼに及ぼす影響

腸内細菌由来のリポ多糖 (LPS) はエンドトキシンとして知られており、代謝性内毒素血症の診断にも用いられる。以前の研究において、高脂肪食の摂取がメタボリックシンドロームにおける代謝性内毒素血症や腸の炎症を誘発することなどが示されている¹¹⁾。肥満症の患者においては、血清25-ヒドロキシビタミンD濃度が低値の者が高頻度で観察されることが明らかになっており、ビタミンDが体脂肪に蓄積することから、肥満者においてビタミンDの利用効率が低下することが示唆されている¹²⁾。

これまでの研究において、ビタミンD欠乏がIAP活性に及ぼす影響に関する研究は行われているが、高脂肪食摂取時におけるビタミンD制限がALPに及ぼす影響については検討されていない。そこで今回、＜研究5＞では雄性ラット、＜研究6＞では卵巣摘出ラット、＜研究7＞では異なる週齢の雄性ラットを用い、高脂肪食摂取時におけるビタミンD制限がALPに及ぼす影響について検討を行った。

＜研究5＞では、＜研究1＞で用いた雄性ラットについて検討を行った。実験食開始28日後の大腿骨のALP比活性において、「ビタミンD制限食群」が「コントロール食群」と比べて、「高脂肪ビタミンD制限食群」が「高脂肪食群」と比べて、それぞれ有意に低値を示した。十二指腸のALP比活性においては、「高脂肪ビタミンD制限食群」が「高脂肪食群」と比べて有意に低値を示した。ラットの小腸型ALPとして、2種類のmRNAs (*IAP-I*と*IAP-II*) が報告されていることから¹³⁾、それぞれに特異的なプライマーを用いて、RT-PCR法により十二指腸における遺伝子発現量を比較した。その結果、*IAP-I*ならびに*IAP-II*遺伝子のmRNA発現量のいずれにおいても、「ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比べて、それぞれ有意に低値を示した。これらより、高脂肪食摂取時においても、ビタミンD制限によって、大腿骨のALP比活性が低下すること、高脂肪食におけるビタミンD制限が十二指腸のALP比活性や*IAP*遺伝子発現量を低下させることが初めて明らかになった。

＜研究6＞では、＜研究2＞で用いた卵巣摘出ラットについて検討を行った。実験食開始後28日目大腿骨のALP比活性について、ビタミンD制限、高脂肪食を因子とした二元配置分散分析を行った結果、ビタミンD制限の影響が有意であり、ビタミンD制限群はビタミンD非制限群と比較し、低値を示した。十二指腸のALP比活性については、ビタミンD制限と高脂肪食の有意な交互作用が認められ、「卵巣摘出・ビタミンD制限食群」と「卵巣摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巣摘出・コントロール食群」と比べてそれぞれ有意な低値を示し、「卵巣摘出・高脂肪食群」は「卵巣摘出・コントロール食群」と比べて

有意な高値を示した。十二指腸における *IAP-I* ならびに *IAP-II* 遺伝子の mRNA 発現量においても、ビタミンD制限と高脂肪食の有意な交互作用が認められた。*IAP-I* 遺伝子の mRNA 発現量については、「卵巣摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巣摘出・コントロール食群」ならびに「卵巣摘出・高脂肪食群」と比較し、それぞれ有意に低値を示した。*IAP-II* 遺伝子の mRNA 発現量については、「卵巣摘出・ビタミンD制限食群」ならびに「卵巣摘出・高脂肪ビタミンD制限食群」は、「卵巣摘出・コントロール食群」ならびに「卵巣摘出・高脂肪食群」と比較し、それぞれ有意に低値を示した。卵巣摘出ラットでは、高脂肪食摂取時においても、ビタミンD制限によって、大腿骨のALP比活性、十二指腸のALP比活性やその遺伝子発現が低下することが明らかになった。

<研究7>では、<研究3>で用いた異なる週齢の雄性ラットについて検討を行った。実験食開始後28日目の大腿骨のALP比活性について、ビタミンD制限、高脂肪食、週齢を因子とした三元配置分散分析を行った結果、ビタミンD制限群はビタミンD非制限群と比べて、14週齢群は7週齢群と比べて、それぞれ低値を示した。また、いずれの週齢においても、十二指腸のALP比活性は、ビタミンD制限と高脂肪食の有意な交互作用が認められ、「高脂肪食ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比較し、低値を示した。

第2章において、雄性ラットと卵巣摘出ラットのいずれにおいても、ビタミンD制限により、大腿骨のALP比活性が低下することが明らかになった。さらに、雄性ラットについては、7週齢と14週齢のいずれにおいても、同様の結果が得られた。十二指腸のALP比活性については、雄性ラットでは、いずれの週齢においても、高脂肪食摂取時のビタミンD制限により低下すること、卵巣摘出ラットにおいては、コントロール食、高脂肪食のいずれにおいても、ビタミンD制限により低下することが示された。以上の結果より、高脂肪食摂取時のビタミンDの制限が骨代謝や腸のホメオスタシス維持に影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの新たな知見は、ALP生理機能解明の一助となることが期待され、食事性因子がALPに及ぼす影響を明らかにするための基礎データとなるであろう。

第1章と第2章の結果より、高脂肪食摂取時のビタミンD制限により、骨強度や筋肉量が低下し、大腿骨や十二指腸のALP比活性が減少すること、また、高脂肪食摂取時の葉酸制限により骨密度が低下することが示された。ヒト閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラットにおける高脂肪食摂取時のビタミンD制限あるいは葉酸制限により、骨密度が低下することから、適切なビタミンDや葉酸の摂取が骨粗鬆症予防に重要性であることが示唆された。今後、様々な食事性因子が体組成や骨強度、ALPの酵素活性や遺伝子発現などに及ぼす影響について詳細に検討を進めることにより、骨粗鬆症予防のための重要なデータが得られることが期待される。

主要な参考文献

- 1) 五関正江ら. 骨のアルカリホスファターゼの構造と生理的機能. 日本骨代謝学会誌. 8:9-19, 1990.
- 2) Millán JL. Mammalian Alkaline Phosphatases. Weinheim: WILEY-VCH. 2006.
- 3) Goldberg RF, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:3551-6, 2008.

- 4) Kaliannan K, et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**:7003–8, 2013.
- 5) Bischoff-Ferrari HA, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Journals*.**339**:b3692, 2009.
- 6) Nakamura K, et al. Impact of demographic, environmental, and lifestyle factors on vitamin D sufficiency in 9084 Japanese adults. *Bone*.**74**:10–7, 2015.
- 7) Yoshimura N, et al. Profiles of vitamin D insufficiency and deficiency in Japanese men and women: association with biological, environmental, and nutritional factors and coexisting disorders: the ROAD study. *Osteoporos Int*.**24**:2775–87, 2013.
- 8) Behera J, et al. Homocysteine as a Pathological Biomarker for Bone Disease. *J Cell Physiol*.**232**:2704–9, 2017.
- 9) Nishio K, et al. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake. *J Epidemiol*.**18**:125–31, 2008.
- 10) 田辺里枝子ら.ラットの妊娠前の葉酸制限が母体の骨密度に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌. **66**:287–92, 2013.
- 11) Pendyala S, et al. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. **142**:1100–1, 2012.
- 12) Wortsman J, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. **72**:690–3, 2000.
- 13) Engle MJ, et al. The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. *Clin Chem*.**38**:2506–9, 1992.

論文審査結果の要旨

現在の日本において、高齢者が要支援・要介護となる原因の約5分の1が転倒・骨折や関節疾患などの障害によるものであり、骨や関節などを維持するための対策が必要とされている。特に女性では、閉経後のエストロゲン分泌の低下により骨密度が急激に低下することが示されており、骨粗鬆症の発症を予防するためには、成長期に高い最大骨量を獲得し、加齢などに伴う骨密度低下を抑制することが重要である。

アルカリホスファターゼ (ALP) は、アルカリ性に至適pHを有し、リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒する酵素である。骨組織のALPは「骨芽細胞分化マーカー」として知られ、骨形成に深く関わっている。小腸型ALP (IAP) は、「腸上皮細胞の分化マーカー」として知られており、マウスでは絶食によりIAP活性が低下するが、食物摂取によりIAP活性が上昇することから、IAP活性と食事性因子との関連が深いと考えられている。また、IAPが内毒素として知られるグラム陰性菌の細胞壁構成成分のリポ多糖 (LPS) を脱リン酸化して解毒することから、粘膜防御因子としての作用も報告されている。さらに、IAPノックアウトマウスでは顕著な体重増加や血中脂質パラメーターの異常などの表現型が報告されており、IAPが生活習慣病予防に重要な役割を果たす可能性が示

唆されている。このように近年、ALPの生理機能の解明が進められているが、不明な点も多く残されている。

本研究では、高脂肪食やビタミンDなどの食事性因子が体組成や骨強度、ALPに及ぼす影響について、骨粗鬆症予防、生活習慣病予防の観点から骨組織のALPだけでなく、小腸におけるALPについて検討することを目的とした。

研究結果については、以下に述べる2章から構成される論文にまとめた。まず、第1章（研究1～3）では、食事性因子として高脂肪食摂取時のビタミンD制限が体組成や骨強度に及ぼす影響について検討を行った。研究1では、雄ラットの内臓脂肪量において、「高脂肪食群」は「コントロール食群」と比較し有意に高値を示し、大腿骨の骨密度において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比較し有意に低値を示した。これらの結果より、高脂肪食による内臓脂肪量の増加と、高脂肪食摂取時のビタミンD制限による大腿骨骨密度の低下が明らかになった。研究2では、ヒト閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラットの大腿骨の骨梁骨密度ならびに皮質骨厚、ヒラメ筋および腓腹筋重量において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」と比較し有意に低値となることを示した。また、筋形成調節因子である*myogenin*遺伝子のmRNA発現量については、「高脂肪ビタミンD制限食群」が「コントロール食群」と比較し有意に低値となることを示した。研究3では、7週齢と14週齢の雄ラットを用い、週齢の違いについて検討した。いずれの週齢においても、カルシウム吸収率、大腿骨ならびに腰椎の骨密度でビタミンD制限群がビタミンD非制限群と比較し有意に低値となることを示した。研究4では、卵巣摘出ラットを用い、食事性因子として高脂肪食摂取時の葉酸制限について検討した結果、大腿骨の海綿骨密度において、「高脂肪葉酸制限群」は「高脂肪食群」と比較し有意に低値となることを示した。

第2章（研究5～7）では、食事性因子として高脂肪食摂取時のビタミンD制限がALPに及ぼす影響について検討を行った。研究5では、雄ラットの大腿骨のALP比活性や十二指腸のALP比活性において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比較し有意に低値を示した。さらに、十二指腸の*IAP*遺伝子発現量において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比較し有意に低値を示した。これらの結果より、高脂肪食摂取時のビタミンD制限による大腿骨のALP活性、十二指腸のALP活性やその遺伝子発現の低下が明らかになった。研究6では、卵巣摘出ラットの大腿骨のALP比活性において、「ビタミンD制限群」は「ビタミンD非制限群」と比較し有意に低値となることを示した。また、十二指腸のALP比活性において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」や「高脂肪食群」と比較し有意に低値となり、さらに、十二指腸における*IAP*遺伝子発現量において、「高脂肪ビタミンD制限食群」は「コントロール食群」や「高脂肪食群」と比較し有意に低値となることを示した。研究7では、7週齢と14週齢の雄ラットを用い、週齢の違いについて検討をした。いずれの週齢においても、大腿骨のALP比活性は「ビタミンD制限群」が「ビタミンD非制限群」と比較し有意に低値となり、十二指腸のALP比活性で「高脂肪食ビタミンD制限食群」は「高脂肪食群」と比較し有意に低値となることを示した。

第1章と第2章（研究1～研究7）の結果から、高脂肪食摂取により内臓脂肪量の有意な増加を引き起こし、ビタミンD制限による骨強度やALPへの影響を研究するためのラットを用いた*in vivo*機能解析系が確立されたと考えられる。このうち、ヒト閉経後骨粗鬆症

モデルである卵巣摘出ラットでの高脂肪食摂取時のビタミンD制限や葉酸制限に伴う骨密度の低下から、適切なビタミンDや葉酸の摂取が骨粗鬆症予防に重要性であることが示唆された。今後、本研究で確立された解析系を用いて様々な食事性因子が体組成や骨強度、ALPの酵素活性や遺伝子発現などに及ぼす影響について詳細に検討を進めることにより、骨粗鬆症や生活習慣病の予防のための重要な知見を得られることが期待される。さらに、食事性因子や栄養因子によるIAPへの影響に関する研究は少なく、本研究で得られたIAPに関する知見は今後のIAPの生理作用の解明にとって重要な役割を果たすと期待される。

以上のことから、本研究は研究目的の独創性と重要性、研究方法の新規性と妥当性、研究結果の再現性と正確性、研究内容の意義から審査し、総合的に博士課程論文として十分な内容に到達していると判断し報告する。