

氏名（本籍地）	芹澤 奈保（千葉県）			
学位の種類	博士（食環境科学）			
報告・学位記番号	甲第 495 号（甲（食）第二号）			
学位記授与の日付	2021 年 3 月 25 日			
学位記授与の要件	本学学位規程第 3 条第 1 項該当			
学位論文題目	微量栄養素による骨代謝への影響および脂質異常症をはじめとする生活習慣病の予防			
論文審査委員	主査	教授	薬学博士	矢野 友啓
	副査	教授	博士（農学）	佐藤 順
	副査	准教授	博士（学術）	太田 昌子
	副査	千葉大学 客員教授	薬学博士	上野 光一

学位論文審査結果報告書〔甲〕

No 2

【論文審査】

本論文は「微量栄養素による骨代謝への影響および脂質異常症をはじめとする生活習慣病の予防」を主題に、微量栄養素摂取の過不足に由来する健康の一次予防について論じたものであり、序章および三章から構成されている。

【序章】

2021年に内閣官房は人生100年時代を見据えた社会構想を提唱し、その一つが健康寿命の延伸を図ることである。健康寿命とは、2000年にWHOが提唱した新しい指標であり、平均寿命から寝たきりや認知症など介護状態の期間を差し引いた期間を示す。また、健康寿命の延伸とは健康に生活できる期間を延ばす意味をもち、国策として疾病予防や介護予防が取り組まれている。近年わが国の主たる死因は悪性新生物、心疾患および脳血管疾患があり、これら疾患に対して共通となる疾病予防は適切な栄養管理、すなわち、健全な食習慣の形成である。

健全な食習慣の形成を考えたとき、ライフステージの早い段階から取り組むことが望ましく、平均寿命および健康年齢が男性よりも長期になる女性において、早期取り組みの効果は顕著となることが示唆される。これらの背景をふまえ、本論文は若年層の女性の疾病予防を考えたとき、基礎的知見となる微量栄養素の摂取量や摂取期間に着目している。

【第1章】

第一章では、微量栄養素中のミネラルを「水素、炭素、窒素、酸素の4元素以外の元素の総称」と意味づけ、尿中に排泄される、Na、K、Ca、Mg、P、Znの6元素に着目している。

尿中のカルシウム(Ca)やマグネシウム(Mg)の排泄は、エネルギー摂取過多や精神的・肉体的ストレスによって増加し、糖尿病や高血圧症の危険因子でもある。また、生活習慣病の予防因子として知られている軽運動によって、その排泄は減少することが報告されている。疾病の一次予防を考えるうえで、ミネラルの栄養状態、すなわち、過不足の指標は、血中レベルで検討されているが、ミネラルの不足が顕著でない場合には、血液中のミネラル濃度の変化は恒常性維持に伴い、厳密に維持されているため、狭い範囲にとどまる。つまり、ミネラルの栄養状態の指標として血清ミネラル濃度を用いることは適さない。

したがって、ミネラルの栄養状態を判定し、ミネラルの過不足と疾病との関係を直接的に明らかにすることが、課題となる。そこで、本章では、ミネラルの栄養状態を示す指標として尿中のミネラル排泄量に着目している。尿中ミネラル排泄量は日内変動があり、昼間に多く、夜間に少ないことが知られている。さらに、尿中ミネラル排泄量は食事の影響を受けるため、随時尿は本目的には適していない。そこで、本研究では食事から最も離れた時間で得られる尿である早朝第二尿(Early morning urine, EMU)に着目した。既報では、Mgが不足した食事(160 mg/d)では、EMU-Mgは有意に減少し、EMUはミネラルの栄養状態の指標である可能性が示されている一方で、ナトリウム(Na)の摂取制限はCaとMgの吸収を低下させたことが報告されている。Na制限はEMU-CaとMgの排泄量に変化を引き起こす可能性があると考え、前述の仮説に従い、

Na 制限群 (NaCl: 6g/d) の EMU-ミネラル (Na、カリウム [K]、Ca、Mg、リン [P]、亜鉛 [Zn]) を測定し、対照群 (NaCl: 12g/d) の EMU-ミネラルと比較している。

その結果、既報通り、血液中のミネラル濃度は恒常性維持機構により厳密に一定の範囲内で維持されているため、血中ミネラル濃度からミネラル摂取量を判断することは適さなかった。Na は血清ミネラルに影響を与えるが、基準値の範囲内で変動しており、血液検査ではミネラルの欠乏や過剰、健康状態を反映したり明らかにしたりすることはほぼできないことを明示する結果となった。

一方で、EMU に着目し、Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係をみると、実験期間中、参加者全員が Na 以外は同量のミネラルを摂取しているにもかかわらず、Na 制限群の EMU-Na、Ca、Mg、P、Zn は対照群に比べて有意に低かった。さらに、EMU-Na、Ca、Mg、P、Zn と Na 摂取量との間には有意な正の相関が認められた。このことから、Na 制限群 (NaCl: 6g/d) では Na 摂取量が実質的に不足しているため、本研究における Na 代謝機能のいくつかは腎外系だけでなく腎臓でも行われたことが示唆された。腎臓での Na 代謝調節機能は主に、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系とナトリウム利尿ペプチド系が仲介している。アルドステロンは、腎臓の尿細管内の Na ポンプに作用して Na の再吸収を促進する。これらの系は骨からの Na 再吸収にも関与しており、この作用は骨 (骨のミネラル) に貯蔵されている Na だけでなく Ca、Mg、P、Zn にも影響を与えたことが示唆された。また、骨に K は蓄えられていないため、本研究結果において、EMU-K は有意な変化を示さなかったと考えた。

Na 制限群に対し、回復期の EMU-ミネラルの動向をみると、関係をみると、回復期における平均 EMU-Na、K、Ca、Mg、Zn は Na 制限期 (NaCl: 6g/d) の EMU-ミネラルと比較して有意に高かったが、EMU-P は有意に低かった。回復期 (NaCl: 12g/d) における EMU-K の増加は、Na の摂取量および吸収量の増加に伴う K 吸収量増加の影響として説明できる。回復期における EMU-P の減少は、いくつかの要因によって引き起こされた可能性があり、尿中 P の減少は Ca の吸収を増加させる可能性がある。Ca の一部は P と一緒に骨に蓄積されていることから、骨の P の増加を補うために尿 P が減少している可能性が考えられた。本研究では、NaCl の 6g/d という低い Na 制限が EMU-ミネラル (Na, K, Ca, Mg, P, Zn) の変化を引き起こす要因の一つであると結論づけた。食事中的 Na は、ミネラル (Na, K, Ca, Mg, P, Zn) の代謝をコントロールする重要な要因の一つであると考えられる。また、Na 制限は、骨を構成するミネラル出納やヒトのミネラルの栄養状態へ影響を及ぼすことから、骨の健康の観点からも過度な Na 制限は慎重に検討すべき項目であることを示している。

【第二章】

スポーツへの関心が高まっている一方で、過剰な運動負荷に伴う健康問題もある。特に、女性アスリートにおける健康問題は、「エネルギー摂取不足」「無月経」「骨の健康・骨粗鬆症」が挙げられ、これらは American College of Sports Medicine (ACSM) によって 2007 年に「女性アスリートの三主徴 (Female Athlete Triad, FAT)」として提唱された。FAT は女性アスリートの健康管理上の問題点であり、運動能力の低下や、筋力や持久力などのコンディション低下につながり、競技生活を悪化させている。具体的には、女子陸上競技は疲労骨折のリスクが高い競技と報告されており、その予防方法は確立されていない。

ホモシステイン (homocysteine, HCY) は非タンパク性アミノ酸であり、骨代謝異常の独立した危険因子として報告され、ストレス骨折との関連も示唆されている。HCY はメチオニンの中間代謝物であり、主に葉酸、ビタミン B12 (V.B12)、リボフラビン (ビタミン B2, V.B2) に依存したメチオニンへの再メチル化とビタミン B6

(V.B6)に依存した硫黄転移化の2つの経路で代謝される。再メチル化経路では、5,10-メチルテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)という酵素によって触媒され、食事から得られる葉酸に由来する5-メチルテトラヒドロ葉酸からメチル基が付加されてメチオニンを形成する。MTHFRをコードする遺伝子では、677番に(MTHFR C677T)遺伝子多型(SNP)があり、これはシトシンがチミンに置き換えられたものである。C677Tに対するホモ接合体およびヘテロ接合体は、MTHFRの酵素活性をそれぞれ60~70%および30~35%低下させることが報告されている。

本研究の目的は、C677T多型のホモ型(TT)およびヘテロ型(CT)を持つ女子陸上競技選手は遺伝的素因から血中HCY値の上昇が示唆され、その予防としてV.B2とV.E(α -tocopherol: α -TP)摂取の効果を決定することにあつた。MTHFR遺伝子のC677TにCTおよびTT型を保有する女子陸上競技選手を対象に、V.B2と α -TPの同時摂取が血中HCY濃度に及ぼす影響を評価した。その結果、V.B2(28mg/d)と α -TP(60mg/d)を単独または併用で14日間摂取すると、すべての期間において血漿HCY濃度が有意に低下した。また、V.B2と α -TPの併用摂取期では、 α -TP期と比較して血漿中HCY濃度が最大かつ有意に低下した。V.B2はMTHFRの触媒活性を活性化し、 α -TPは葉酸の抗酸化を促進しメチオニン代謝を促進させたことで、血漿HCY濃度が低下したことが示唆された。したがって、本研究はMTHFR遺伝子多型を保有する女子陸上競技選手にV.B2と α -TPを併用で摂取することで、血中HCY濃度上昇に起因する疲労骨折のリスク因子を予防できる可能性を示した。

また、本研究においては、女性アスリートにおける血中 α -TPにおいても新規知見を見いだしている。本研究に参加したアスリートは、栄養士による日常的な管理を受け、エネルギー源となる栄養素(炭水化物、脂肪、タンパク質)、葉酸代謝や抗酸化に関わるビタミンを日常的に十分に摂取していた。しかし、食事由来のV.E(α -TP)を十分に摂取していたにもかかわらず、血漿 α -TP濃度が α -TPの血管機能改善効果を期待する境界濃度となる20 μ M未満であった。メタアナリシス解析では、血漿V.E濃度が20 μ mol/L以下の群にV.Eを投与した場合、血管機能の有意な改善が認められる一方で、血漿V.E濃度が21 μ mol/L以上の群はV.Eは充分量に到達していると考えられ、摂取しても血管機能改善の効果は認められないことが報告されている。これらの結果から、日本人の食事摂取基準の推奨量の範囲内では、女性アスリートの場合、 α -TPの機能性を期待できる血漿濃度である20 μ Mに到達できない可能性があることが示唆された。そのような場合、1日の食事に60mgの α -TPを追加で摂取することで、月間400kmの走行距離の運動を日常的に行っている女性陸上競技者において、血漿中 α -TP濃度20 μ M以上を維持することが可能となることがわかった。女性アスリートが血漿 α -TPを血管機能改善効果が期待できる21 μ M以上に維持できた場合、トレーニング後の酸化ストレス発生の軽減にも関与し、女子陸上競技選手の血管機能を改善する可能性があることが示唆された。

【第三章】

既報におけるビタミンE(V.E)の大規模疫学研究においても、V.E摂取量と冠動脈疾患発症とは逆相関することが示されている。さらに、ヒト介入研究では、 α -TPが骨粗鬆症の予防に有効であることが示されている。

この抗酸化作用に着目した場合、 δ -T3は α -TPと比較し、高齢期女性の骨吸収や酸化ストレスに、より重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、 α -、 γ -および δ -T3の経口での絶対的バイオアベイラビリティはそれぞれ27.7%、9.1%、8.5%と低く、また一貫性がないことが報告されている。

そこで、 δ -T3 を健常人が摂取した場合の血中動態を明らかにすることを目的に本研究を実施した。 δ -T3 の 14 日間の短期摂取により、血漿 δ -T3 濃度は有意に増加させることが明らかとなった。同じように α -TP 摂取の短期摂取においても、血漿 α -TP 濃度および δ -T3 に有意な増加が認められた。

これまで、T3 のバイオアベイラビリティは低く、TP よりも早く排泄されるといわれてきた。本研究結果の最も注目すべき点は、これまでに報告の少ない健康な若年男女に δ -T3 を 14 日間投与し、短期摂取での有意な δ -T3 濃度増加の証明と、その具体的な血中 δ -T3 濃度を示した点である。また、 α -TP においても、4 週間以上の摂取と同レベルの α -TP 濃度に 14 日間で到達することを明らかにした。このことは、 δ -T3 や α -TP の血中への疾病予防効果、疾患改善効果が短期摂取でも作用する可能性を示した。

更に、 α -TP、 δ -T3 を短期摂取した後の血中脂質の変動もみている。 δ -T3 と脂質濃度との関係において、 δ -T3 (250mg/d) 摂取した場合に、HDL に増加傾向がみられた ($p = 0.063$)。既報では、HDL が 1mg/dL ずつ増加するごとに、冠動脈疾患 (CAD) リスクが男性で 2%、女性で 3% 減少することから HDL レベルは CAD リスクの有力な予測因子であることが示されており、 δ -T3 は、抗酸化機能のみならず、HDL レベルを増加させる栄養素としての機能も期待できる。

本章では、健常人が δ -T3 や α -TP を 14 日間の短期摂取をしたときに、有意に上昇することを証明した研究である。したがって、 α -TP および δ -T3 の機能性は短期摂取の場合でも、ヒトの体内において有効に作用する可能性を証明した。また、 δ -T3 摂取による HDL の増加傾向を明らかにし、 δ -T3 摂取による動脈硬化予防の可能性が示された。

【審査結果】

芹澤奈保氏の研究は、若年層や女性の疾病予防を微量栄養素の摂取量や摂取期間の観点から着目した研究であり、その成果は 2021 年に内閣官房が人生 100 年時代を見据えた社会構想の一施策である健康寿命の延伸を、栄養管理の側面から考えた基礎的知見となる論文である。

本論文の第一章は早朝第二尿に着目し、その尿中に含まれるミネラル排泄量が微量栄養素の過不足の判断基準となることを明示したほか、食塩量 6g/d に制限を行った食事は骨代謝に関わるミネラルの排出を負に傾けることを示唆し、過度な Na 制限食は骨の健康の観点からも慎重に対応すべき項目であることを示している。第二章では、女性アスリートの三主徴のうち、骨の健康に着目し、疲労骨折や骨代謝異常を反映する独立した危険因子であるホモシステイン (homocysteine, HCY) の上昇抑制を、ビタミン B2 と α -TP の併用摂取の観点から、着目している。その結果、月間走行距離が 400km 以上の運動量を日常的に行い、MTHFR 遺伝子多型保有者の女子陸上選手においては、V.B2 (28mg/d) と α -TP (60mg/d) を単独または併用で 14 日間摂取すると、血漿 HCY 濃度の上昇抑制効果が期待できることが明らかになった。V.B2 は MTHFR の触媒活性を活性化し、 α -TP は葉酸の抗酸化を促進しメチオニン代謝を促進させたことで、血漿 HCY 濃度が低下したことが示唆された。同時に、日本人の食事摂取基準の推奨量の範囲内での V.E 摂取量では、女性アスリートの場合、 α -TP の機能性を期待できる血漿濃度である 20 μ M に到達できない可能性があることが示唆された。そのような場合、60mg/日の α -TP を追加で摂取することで、血管機能改善効果が期待できる血漿 α -TP 濃度 (21 μ M 以上) に維持されることが示唆された。これらの結果から、女性アスリートが日常的に血漿 HCY の上昇抑制を行うために、血漿 α -TP を 21 μ M で維持できた場合、トレーニング後の酸化ストレス発生の軽減にも関与し、女子陸上競技選手の血管機能を改善する可能性があることが示唆された。第三章では、V.E の抗酸化能に着目し、同位体である δ -T3 に着目している。これ

までに報告の少ない健康な若年男女に δ -T3(250mg/d)を 14 日間摂取した場合、有意な δ -T3 濃度増加の証明と、その具体的な血中 δ -T3 濃度を示している。既報では4週間以上の摂取報告が多いなかで、同レベルの α -TP 濃度に 14 日間で到達できることを明らかにした。このことは、 δ -T3 や α -TP の血中への疾病予防効果、疾患改善効果が短期摂取でも作用する可能性を示している。

更に、 α -TP、 δ -T3 を短期摂取した後の血中脂質の変動もみており、 δ -T3 は、抗酸化機能のみならず、HDL レベルを増加させる栄養素としての機能も期待できることを述べている。

これらの研究成果は、遺伝子多型等を考慮して対象者層を設定した場合に、より詳細な尿中および血中の濃度設定や、摂取期間を明示しており、関連する研究分野において、これまでに研究例がない独創的なものであり、対象者層における疾病予防や健康寿命の延伸に多大な貢献をする可能性が考えられる。

研究成果の一部は、査読付き国際誌に原著論文 1 報に掲載されており、芹澤氏の高い学識と研究遂行能力を示すものである。また本博士学位論文は、微量栄養素であるナトリウム摂取量や V.B2(28mg/d)と α -TP(60mg/d)、更には δ -T3(250mg/d)の 14 日間短期摂取は疾病や介護予防を目的とした健康寿命の延伸に有用性を示す首尾一貫したデータであり、研究背景の概説から一連の研究成果の総括まで、適切に執筆されている。

以上のことから、食環境科学研究科(食環境科学専攻)の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究内容であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を持って芹澤奈保氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。