2020 年度

東洋大学審査学位論文

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

食環境科学研究科　食環境科学専攻　博士後期課程

4 C10180002　芹澤奈保

目次

序論 1
参考文献 3

第 1 章 食塩制限が早朝第二尿中のミネラル（Na, K, Ca, Mg, P, Zn）排泄量に与える影響 4
第 1 節 緒言 4
第 2 節 方法 5
1.2.1 被験者について
1.2.2 実験期間
1.2.3 食事摂取および食塩摂取量
1.2.4 実験試料
1.2.5 試料分析
1.2.6 統計解析
第 3 節 結果 12
1.3.1 血清ミネラル濃度と Na 摂取量との関係（出納期の群間比較）
1.3.2 EMU-ミネラルと Na 摂取量との関係（出納期の群間比較）
1.3.3 Na 制限群における Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係（群内比較）
第 4 節 考察 19
1.4.1 血清ミネラルと Na 摂取量の関係
1.4.2 Na 摂取量と EMU ミネラルの関係
1.4.3 Na 制限群における Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係
1.4.4 Na 制限が EMU-Ca と Mg を減少させるメカニズム
参考文献 21

第 2 章 ビタミン B_2 および α-トコフェロールの単独・併用摂取による
血漿ホモシステイン濃度低下の検討 23
第 1 節 緒言 23
第 2 節 方法 24
2.2.1 研究倫理
2.2.2 被験者特性
2.2.3 実験期間
2.2.4 被験者の実験期間中の生活
2.2.5 食事摂取およびビタミン負荷量
2.2.6 試料およびデータ採取
2.2.7 血液分析

2.2.8 MTHFR（C677T）の SNP 型判定
2.2.9 HPLC 法による血漿 HCY の測定
2.2.10 HPLC 法による血漿α-TP の測定
2.2.11 葉酸（ELISA 法）
2.2.12 統計解析
第 3 節 結果 46
2.3.1 被験者の C677T 多型の状態と身体的特徴
2.3.2 栄養素摂取状況
2.3.3 血清 V.B_2 濃度
2.3.4 血漿中α-TP 濃度
2.3.5 血漿中葉酸濃度
2.3.6 血漿中 HCY 濃度
第 4 節 考察 52
参考文献 54

第 3 章 α-トコフェロール・δ-トコトリエノールの短期摂取による血中動態と脂質代謝および骨代謝改善の検討 59
第 1 節 緒言 59
第 2 節 方法 61
3.2.1 研究デザイン
3.2.2 被験者特性
3.2.3 実験期間
3.2.4 被験者の実験期間中の生活
3.2.5 サプリメント摂取
3.2.6 試料およびデータ採取
3.2.7 血液分析
3.2.8 HPLC 法による血漿 α-TP、δ-T3 の測定
3.2.9 HPLC 法による血漿 HCY の測定
3.2.10 統計解析
第 3 節 結果 79
3.3.1 身体特性
3.3.2 食事記録調査
3.3.3 血液項目
第 4 節 考察 88
3.4.1 α-TP およびδ-T3 摂取による血中動態について
3.4.2 α-TP、δ-T3 による血中脂質代謝の影響

3.4.3 α -TP、δ-T3 による骨代謝への影響
3.4.4 α-TP・δ-T3 摂取による HCY への影響
参考文献 95

研究業績 104

謝辞 105

序論

2021 年に内閣官房は人生 100 年時代構想を掲げ、日本は、これから人生 100 年時代を迎えようとしている。国の健康寿命延伸プランでも示されているように、予防・健康づくりを強化し、国民の健康寿命の延伸を図ることが求められている。「健康寿命」とは、2000 年に WHO が提唱した新しい指標で、健康日本 21（2 次）では「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」と定義されている。つまり、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つ。内閣府による平成 30 年版高齢社会白書による日本人の健康寿命は、2016 年の段階で男性：72.14 年、女性：74.79 年となっている。今後、更なる健康寿命の延伸を図るために、厚生労働省は次の 3 分野 1）次世代を含めたすべての人の健やかな生活習慣形成、2）疾病予防・重症化予防、3）介護予防・フレイル対策、認知症予防 を中心に取組を推進している。健康寿命を延伸するには疾病予防や介護予防が重要である。令和元年（2019）人口動態統計（確定数）の概況による、近年のわが国の死因の第一位は悪性新生物、二位は心疾患、四位は脳血管疾患であり、これら疾患の予防が課題となっている。介護予防においてはフレイルや認知症などの要介護要因を未然に防ぐ手段が必要である。さらに、わが国の男女共同参画における基本計画の中に、生涯を通じた女性の健康の保持増進対策の推進が掲げられている。これはライフステージにおける女性の健康保持を目的とするものである。これら疾病などの予防には早期から取り組むことが重要だと考えている。そこで本研究では、女性や若年層の疾病予防を考えるうえで、基礎的知見となる介入研究に着手した。

第 1 章では、ミネラルの栄養状態（過不足）を把握する指標として、早朝第二尿（EMU）に着目し、女子大学生を対象に、ナトリウム（Na）制限群（NaCl：6g/d）の EMU-ミネラル（Na、カリウム [K]、カルシウム [Ca]、マグネシウム [Mg]、リン [P]、亜鉛 [Zn]）排泄量を測定し、対照群（NaCl：12g/d）の EMU-ミネラル排泄量と比較した。血漿ミネラル濃度はヒトの健康状態を示す指標の一つであるが、恒常性維持機構の発動により、厳密に濃度が維持されているため、ミネラル摂取量の過不足を示す栄養状態の指標として血漿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である。これまでに、Na 制限が Ca と Mg の吸収を低下させ、Ca と Mg のミネラル出納において負のバランスをもたらすことが明らかとなっている[1]。そこで本研究では Na 制限が EMU-Ca と Mg の変化を引き起こす可能性があると仮説を立て、Na 制限が EMU に及ぼす影響について検討した。

第 2 章では、女子陸上長距離選手を対象に、女性アスリートの疲労骨折予防を目的として、ビタミン B_2（$V.B_2$）・ビタミン E（α-TP）の単独および併用摂取による効果を把握する

ために、介入研究を実施した。アスリートにおける骨折は、選手生活の QOL を低下させる一要因である。骨折リスクの独立した危険因子であるホモシステイン（HCY）はメチオニン代謝における中間代謝物であるが、この代謝に関わる MTHFR の C677T 多型が血中 HCY 濃度に大きく関与している。第 2 章では C677T のホモ型（TT）およびヘテロ型（CT）を持つ女子陸上長距離選手の血中 HCY 濃度低下を目的とし、MTHFR の補酵素である V.B2 および抗酸化能を有する α-TP 摂取における効果を検討した。

第 3 章は、抗酸化能を有する α-TP および δ-トコトリエノール（δ-T3）の血中動態および脂質代謝・骨代謝への影響を明らかにすることを目的に介入研究を行った。これまで、健康な若年者を対象に δ-T3 の血中動態を明らかにした報告や、14 日間の短期摂取による α-TP や δ-T3 の血中濃度変化の報告は少ない。そこで、健康な若年男女を対象に、δ-T3 摂取による δ-T3 の血中動態解明を目的の一つとし研究を実施した。さらに、*in vitro* で脂肪細胞に関係していることが示されている γ-T3、δ-T3[2-4]のうち、γ-T3 は TG、脂肪細胞や脂肪量に対する影響は明らかになりつつあるものの[5, 6]、δ-T3 でのそれは未だ不明な点が多い。しかしながら α-T3 や γ-T3 を含まない純度 90%の δ-T3 が肥満ラットの脂肪量を有意に減少させており[7]、本研究でも δ-T3 の摂取によりヒト血中 TG および LDL-コレステロール（LDL）濃度を低下させる可能性があると予測した。また、*in vivo* では、TRF（α-, β-, γ-, δ-T3 の混合）摂取による血中脂質濃度低下に関する報告が多く、ヒトを対象にした δ-T3 単独摂取での報告は少ない。したがって、本研究で δ-T3 摂取による血中脂質濃度の低下を明らかにすることは新規性を有する研究であると考えた。これまでも T3 は血中コレステロール低下に作用することが明らかであったが、T3 の中でも、特に強い抗酸化能を有する δ-T3 の血中コレステロール低下への有用性を示すことは意義があると考えた。

また、国民生活基礎調査（平成 28 年）において要介護になる原因の 4 位に、全体の 12.1%にあたる骨折・転倒がある。骨粗鬆症や生活習慣病など、壮年期以降に発症することの多い疾患は、若年期からの予防が重要である。したがって、若年期から骨の健康を維持することは壮年期から老年期における骨粗鬆症発症やそれに伴う骨折リスクを低減させることにつながり、最終的に健康寿命の延伸につながると考えた。しかしながら、骨折予防を目的とした若年者対象の介入研究はほとんどない。これまで V.E は骨疾患保有者や、閉経後の女性に対し研究が行われてきたが、骨粗鬆症や骨折予防を目的に若年者への介入を行うことで新しい知見が得られる可能性もある。そこで本研究では、α-TP および δ-T3 サプリメントを被験者である若年男女に 14 日間摂取させ、その後のアウトカムとして、ヒト血中 TG、LDL、HDL および骨代謝マーカーである Ntx、total P1NP、さらに HCY 濃度の変動に着目し、α-TP および δ-T3 摂取後の脂質代謝・骨代謝への有用性を証明することを 2 つ目の目的に介入研究を実施した。

参考文献

[1] Nishimuta M, Kodama N, Morikuni E, Yoshioka YH, Matsuzaki N, Takeyama H, et al. Positive Correlation between Dietary Intake of Sodium and Balances of Calcium and Magnesium in Young Japanese Adults

Low Sodium Intake Is a Risk Factor for Loss of Calcium and Magnesium. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2005;51:265-270 doi: 10.3177/jnsv.51.265.

[2] Das S, Mukherjee S, Lekli I, Gurusamy N, Bardhan J, Raychoudhury U, et al. Tocotrienols confer resistance to ischemia in hypercholesterolemic hearts: insight with genomics. Mol Cell Biochem. 2012;360:35-45 doi: 10.1007/s11010-011-1041-9.

[3] Watkins T, Lenz P, Gapor A, Struck M, Tomeo A, Bierenbaum M. γ-tocotrienol as a hypocholesterolemic and antioxidant agent in rats fed atherogenic diets. Lipids. 1993;28:1113-1118 doi: 10.1007/BF02537079.

[4] Qureshi AA, Qureshi N, Hasler-Rapacz JO, Weber FE, Chaudhary V, Crenshaw TD, et al. Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B2, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias. Am J Clin Nutr. 1991;53:1042s-1046s doi: 10.1093/ajcn/53.4.1042S.

[5] Zhao L, Ha JH, Okla M, Chung S. Activation of autophagy and AMPK by gamma-tocotrienol suppresses the adipogenesis in human adipose derived stem cells. Mol Nutr Food Res. 2014;58:569-579 doi: 10.1002/mnfr.201300157.

[6] Zhao L, Kang I, Fang X, Wang W, Lee MA, Hollins RR, et al. Gamma-tocotrienol attenuates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting adipose inflammation and M1 macrophage recruitment. Int J Obes. 2015;39:438-446 doi: 10.1038/ijo.2014.124.

[7] Wong W-Y, Ward LC, Fong CW, Yap WN, Brown L. Anti-inflammatory γ- and δ-tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. Eur J Nutr. 2017;56:133-150 doi: 10.1007/s00394-015-1064-1.

第１章　食塩制限が早朝第二尿中のミネラル（Na, K, Ca, Mg, P, Zn）排泄量に与える影響

第１節　緒言

栄養学でいうミネラルとは科学的に定義された言葉ではない。本論文ではミネラルを水素、炭素、窒素、酸素の 4 元素以外の元素の総称と意味づけ、論述する。それらのうち、本研究では尿中に排泄される、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）、リン（P）、亜鉛（Zn）の 6 元素を研究対象としている。

尿中 Ca や Mg の排泄は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病の危険因子として知られており、これまで尿中の Ca や Mg はエネルギー摂取過多[1,2]や精神的・肉体的ストレス[3,4]によって増加し、生活習慣病の予防因子として知られている軽運動[5]によって減少することが報告されている。したがって、生活習慣病の病因を考える上で、ミネラル摂取について考慮することは重要である。これまでにミネラルの必要量を確立するために、ヒトにおけるミネラルの代謝出納の報告がなされている[6-9]。我々は、ミネラルの栄養状態（過不足）の指標としていくつかの候補、例えば血中レベルなどを検討してきた[10,11]。血中ミネラル濃度はヒトの健康状態を示す指標の一つであるが、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狭い範囲にとどまる。つまり、恒常性維持機構の発動により、血中ミネラル濃度は厳密に維持されているため、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、本研究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た。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（EMU）を選択した。Mg が不足した食事（160 mg/d）では、EMU-Mg は有意に減少し[12]、EMU はミネラルの栄養状態の指標である可能性が示された。しかし、これまでにナトリウム（Na）制限は Ca と Mg の吸収を低下させたことから[6]、Ca と Mg 出納に負のバランスを引き起こすと考えた。したがって、Na 制限は EMU-Ca と Mg の変化を引き起こす可能性がある。上記の仮説に従い、Na 制限群（NaCl：6g/d）の EMU-ミネラル（Na、K、Ca、Mg、P、Zn）を測定し、対照群（NaCl：12g/d）の EMU-ミネラルと比較した。

第２節　方法

1.2.1 被験者について

本研究は、ヘルシンキ宣言の規定に従って実施され、国立健康・栄養研究所の倫理委員会の承認を得た（申請番号：04003、承認日：2004 年 7 月 18 日)。被験者は 19 から 23 歳の健康な日本人女性 11 名であった（Table1-1)。被験者は実験期間中、国立健康・栄養研究所の実験用宿泊施設に滞在し、2 つのグループに分かれた。グループは Na 制限群（n= 5、NaCl 摂取量 6 g /d）と対照群（n= 6、NaCl 摂取量 12 g / d ）に分けられた。

Table 1-1. Characteristics of subjects (11females)

	Age (years)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI
	Mean ± SD			
Na restriction (n= 5) (NaCl intake 6g/d)	20.6 ± 0.5	160.8 ± 6.8	51.5 ± 5.2	19.9 ± 1.1
Control (n= 6) (NaCl intake 12g/d)	20.8 ± 1.3	159.4 ± 5.9	53.1 ± 6.6	20.9±2.1

Significant differences between the items were not observed.

1.2.2 実験期間

実験は 2004 年 8 月に実施され、実験期間は出納期 16 日間を含む 21 日間で、出納期後に 3 日間の回復期を設けた（Figure 1-1）。

Experiment Design

One day (from 8:30 am to 8:30 next day)

Experimental day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Step		Balance period																Recovery period			
		(Step1)				(Step2)				(Step3)				(Step4)							
Menu number	A*1	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	A*1
NaCl intake of Na restriction group		6 g/d																12 g/d			
NaCl intake of control group		12 g/d																			
Samples: Meal		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Samples: EMU*2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Samples: Fasting blood		○				○				○				○				○			
Data of intergroup comparison		Na restriction (NaCl intake 6 g/d) *vs.* Control (NaCl intake 12 g/d)																			
Data of intragroup comparison (within Na restriction group)														NaCl intake 6 g/d				NaCl intake 12 g/d			

*1: *Ad lib*

*2: Collected separately from 6:00 (Waking up) to 8:30 (Breakfast) (2.5hU)

Figure 1-1. Experiment protocol This metabolic balance study consisted of two phases; the balance period (step 1, step 2, step 3, and step 4), and the recovery period. The participants consumed a diet consisting of a 4-day-rotating menu throughout the study. The 24-h urine was collected from 8:30 am to 8:30 am the next day as one day. The second voided fasting early morning urine (EMU) was obtained from 6:00 am (the first voiding in the morning: night urine) to 8:30 am (before breakfast), collected separately from the other urine. In the morning of the days 1, 5, 9, 13, and 17, fasting blood samples were collected. The NaCl intake of the Na restriction group was 6 g/d during the balance period, but it increased to 12 g/d during the recovery period. The EMU data during the balance period were used to compare between the Na restriction group and the control group, as the intergroup comparison. In the Na restriction group, the EMU data in step 4 and the recovery period were used for the intragroup comparison.

1.2.3 食事摂取および食塩摂取量

日本人の食事摂取基準[13]および日本食品成分表[14]に基づいて、管理栄養士が実験期間中の各食事の献立を作成し、調理提供した。参加者と食事サンプルを均一に供給できる条件下で、Na 制限食（NaCl：6g/d）の 4 日間のローテーションメニューを用意した[15]。実験期間中、対照群は Na 制限食（NaCl：6g/d）と同じ Na 制限食に、毎食 2g の塩分を追加（＋6 g/d）した食事を毎日摂取した。Na 制限群は、出納期には Na 制限食（NaCl：6 g / d）を摂取したが、回復期には対照食（NaCl：12 g /d）に変更した。実験期間中に供給された食事中のエネルギーおよび栄養素量を Table1-2 に示す。

Table 1-2. Mean dietary composition of energy and nutrients

Items*1	Energy (kcal/d)	Protein (g/d)	Lipid (g/d)	Carbohydrate (g/d)
	1.9×10^3	7.3×10	4.3×10	3.0×10^2

Items*2	Na*3, 4 (mg/d)	K (mg/d)	Ca (mg/d)	Mg (mg/d)	P (mg/d)	Zn (mg/d)
	*3 4.8×10^3 *4 2.4×10^3	2.4×10^3	6.0×10^2	2.3×10^2	1.1×10^3	9.2

*1: Calculated by Standard Tables of Food Composition [14]

*2: Measured by Atomic Absorption method or Colorimetry [8]

*3: Control diet

*4: Na restriction diet

1.2.4 実験試料

1. 尿

EMU は、起床時に排尿後、朝食前に採取した起床後 2 番目に排泄した尿である。

2. 血液

早朝空腹時血液サンプルは、実験日 1 日目、5 日目、9 日目、13 日目、17 日目に採取した（Figure1-1）。

1.2.5 試料分析

5 種類のミネラル（Na、K、Ca、Mg、Zn）を原子吸光光度計（AAS、Varian AA-5、Australia）を用いて分析した。試料を 0.5 mol/L の硝酸で分析閾値範囲内の濃度に希釈した後、必要に応じて硝酸と過酸化水素で湿式灰化して分析した。P は比色計（モリブデンブルー法）で測定した。ヒト代謝出納試験では、他の EMU-ミネラル試験で報告された結果以外にも様々な結果が得られた[15, 16]。また、他の実験条件については先行研究[8, 16,17]に記載されている。血液中のミネラルは、株式会社ビー・エム・エル（BML, INC.）および株式会社エスアールエル（SRL, Inc.）に業者委託し分析を実施した。

1.2.6 統計解析

Na 摂取量と EMU-ミネラル（Na、K、Ca、Mg、P、Zn）との関係を体重（BW）あたりの指標として分析した[12]。BW は、出納期間中の被験者の平均的な早朝空腹時の BW である。出納期間中の EMU-ミネラルのデータは、Na 制限群（n= 5）と対照群（n= 6）との比較に用いた（対応のない t-test）。また、最終出納期（ステップ 4：NaCl 6 g/d）と回復期（NaCl 12 g/d）の EMU-ミネラルのデータは、Na 制限群の EMU-ミネラルの比較に使用した（対応のある t-test）（Figure 1-1）。全被験者（n= 11）のデータを用いて、Na 摂取量と EMU ミネラルの単相関を求めた。統計解析には IBM SPSS Statistics version 22、24 を使用した。有意水準は 5%未満とした。

第３節　結果

1.3.1 血清ミネラル濃度と Na 摂取量との関係（出納期の群間比較）

出納期間中の Na 制限群と対照群の血清ミネラル濃度を Table. 1-3 に示す。Na 制限群の血清 K、Mg、P は対照群よりも有意に高かった。また、血清 Na、Ca、Zn は両群の間に有意な差はなかった。

Table 1-3. Serum minerals at the inter group comparison

Serum-minerals	Na restriction (n= 5) (NaCl intake 6g/d)	Control (n= 6) (NaCl intake 12g/d)	*P*
Serum Na (mmol/L)	144 ± 4	144 ± 6	NS
Serum K (mmol/L)	4.6 ± 0.3	4.3 ± 0.3	< 0.01
Serum Ca (mmol/L)	2.29 ± 0.05	2.28± 0.08	NS
Serum Mg (mmol/L)	0.90 ± 0.04	0.83 ± 0.03	< 0.001
Serum P (mmol/L)	1.34 ± 0.06	1.29 ± 0.08	<0.05
Serum Zn (mmol/L)	12.6 ± 1.8	12.0 ± 1.2	NS

(Mean ± S.D.)

1.3.2 EMU-ミネラルと Na 摂取量との関係（出納期の群間比較）

出納期間中の Na 制限群と対照群の EMU-ミネラルを Table1-4 に示した。K を除くすべての尿中ミネラル濃度は、Na 制限群と対照群で有意な差があり、Na 制限群の EMU-Na、P、Ca、Mg、Zn は対照群よりも有意に低かった。さらに、両群の全試料（n= 175）を用いて、Na 摂取量と EMU-ミネラルの相関を算出した。その結果、Na 摂取量と EMU-Na、Ca、Mg、P、Zn の間には有意な正相関が認められた（それぞれ、$p<0.001$）。しかし、Na 摂取量と EMU-K との相関は有意ではなかった（Figure1-2）。

Table1-4. EMU-minerals at the intergroup comparison

	Na restriction (n= 5)	Control (n= 6)	Unit	p
EMU-Na	0.66±0.42	1.47±0.82	μmol/ kg BW/ min	<0.001
EMU-K	0.43±0.17	0.39±0.15	μmol/ kg BW/ min	NS
EMU-P	165±56	194±57	nmol/ kg BW/ min	<0.05
EMU-Ca	19.3±11.3	33.0±16.6	nmol/ kg BW/ min	<0.001
EMU-Mg	33.6±10.2	38.9±9.5	nmol/ kg BW / min	<0.001
EMU-Zn	50.2±12.4	64.1±20.1	pmol/ kg BW / min	<0.001

(Mean ± S.D.)

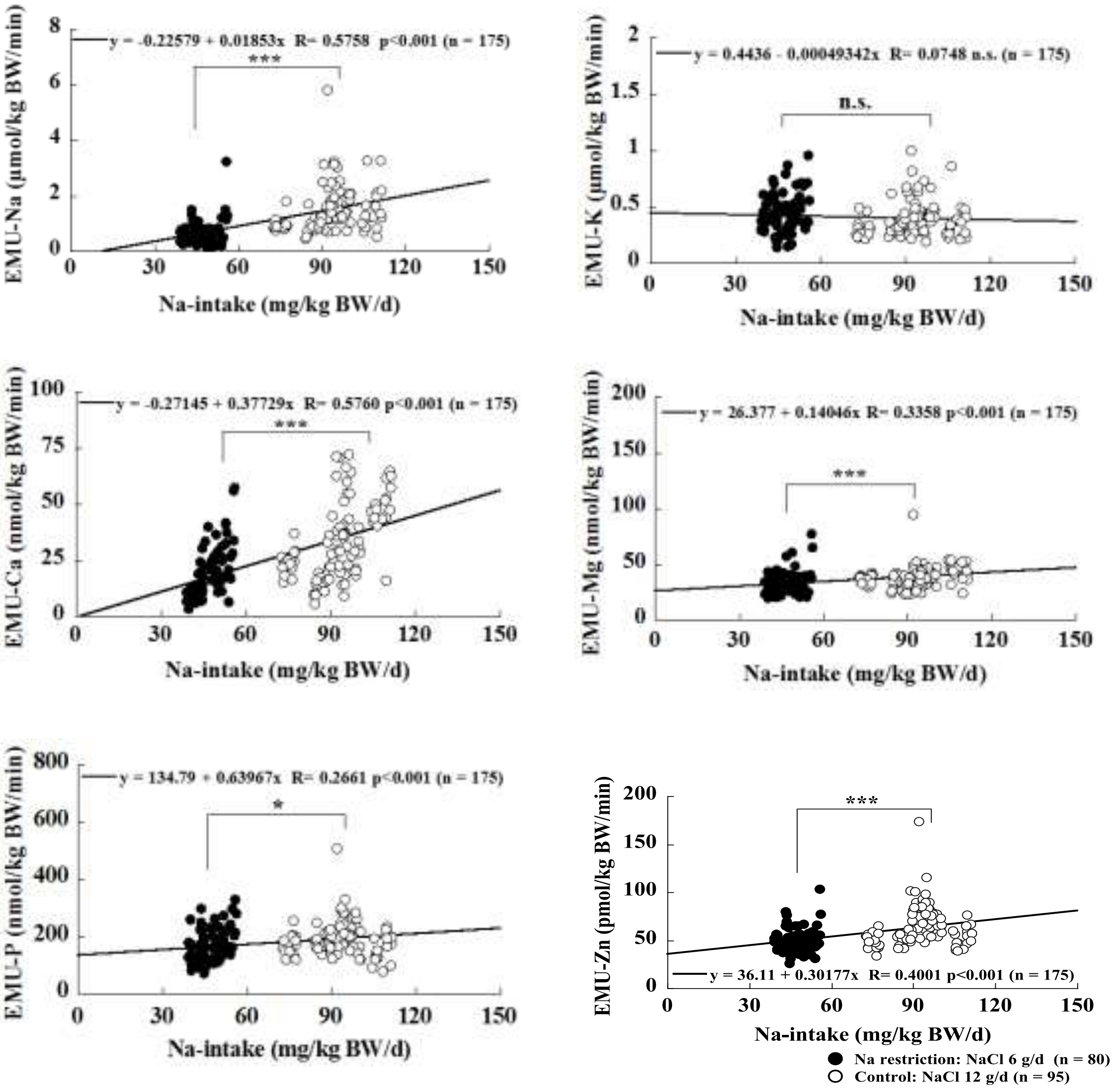


Figure 1-2. Relationships between Na intake and EMU-minerals in the balance period (intergroup comparison) The relationships between Na intake and EMU-minerals (Na, K, Ca, Mg, P, and Zn) were analyzed as the parameter; /BW/min. The closed circles represent data from the Na restriction group, and the open circles represent data from the control group. Significant differences in EMU-Na, Ca, Mg, P, and Zn were observed between the two groups ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.05$, and $p<0.001$, respectively), but not in K (intergroup comparison). Further, significantly positive correlations were shown between Na intake and EMU-Na, Ca, Mg, P, and Zn (each, $p<0.001$), but not in K.

1.3.3 Na 制限群における Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係（群内比較）

回復期（NaCl：12 g / d、連続 3 日間及び 3 日間の平均）の EMU-ミネラルを、出納期間のステップ 4 （NaCl：6g/d）の EMU-ミネラルと比較した。回復期の平均 EMU-Na、K、Ca、Mg、Zn はステップ 4 のそれと比較し、有意に高い値を示したが、EMU-P は有意に低い値を示した（Table1-5）。

Table1-5. EMU-minerals at the intragroup comparison in the Na restriction group

(mean for the 3d)

(n= 5)	NaCl 6g/d (Step4)	NaCl 12g/d (Recovery)	Unit	p
EMU-Na	0.78±0.34	2.12±0.82	μmol/ kg BW/ min	<0.001
EMU-K	0.46±0.18	0.75±0.20	μmol/ kg BW/ min	<0.001
EMU-P	176±37	152±40	nmol/ kg BW/ min	<0.01
EMU-Ca	19.0±8.8	27.0±13.6	nmol/ kg BW/ min	<0.001
EMU-Mg	34.4±8.2	40.9±8.8	nmol/ kg BW/ min	<0.01
EMU-Zn	49.1±9.3	59.5±9.1	pmol/ kg BW/ min	<0.001

(Mean ± S.D.)

第 4 節　考察

1.4.1 血清ミネラルと Na 摂取量の関係

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困難である。本研究結果では、Na 制限群では対照群に比べて血清 K、Mg、P 濃度が有意に高かった。塩分摂取は細胞外液の増加をもたらすが、Na 摂取量の増加は血中の Na 濃度を直接増加させるものではない[18]。これまでに、健康な人の血清 K、Mg、P 濃度に Na 制限が影響するという報告はほとんどない。本研究における各血清ミネラルの濃度は、臨床検査法提要の基準値[19]とは異なっていた。したがって、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いる場合、従来の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に注意が必要である。

1.4.2 Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係

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（Figue1-2）。このことから、Na 制限群（NaCl：6g/d）では Na 摂取量が実際には不足しているため[8,20]、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[21]。これらの系は骨からの Na 再吸収にも関与しており[22]、この作用は骨に貯蔵されている Na だけでなく Ca、Mg、P、Zn（骨のミネラル）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。

1.4.3 Na 制限群における Na 摂取量と EMU-ミネラルの関係

回復期における平均 EMU-Na、K、Ca、Mg、Zn はステップ 4 の出納期（NaCl：6g/d）の EMU-ミネラルと比較し有意に高かったが、EMU-P は有意に低かった（Table1-5）。群間比較と群内比較の違いは、EMU-K と EMU-P の変化である。回復期（NaCl：12 g / 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[20]。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る。尿中の 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中の P が減少している可能性が考えられた。

1.4.4 Na 制限が EMU-Ca と Mg を減少させるメカニズム

Na 摂取量と Ca・Mg 出納には有意な正の相関があることを報告している[6]。冒頭で述べたように、食塩摂取量が少ない（NaCl：6g/d）と、腸管からの Ca・Mg の吸収が抑制され、同じ骨ミネラル（Ca・Mg）が Na と一緒に骨から放出される[20]。今回の研究では、Na 摂取量が少ない参加者では腸管からの Ca・Mg の吸収が抑制され、血中 Ca・Mg 濃度を維持するために腎臓での再吸収が促進することが示された。骨を構成する P や Zn は、Ca や Mg と同様に、それらと同じメカニズムであると考えられる。しかし、本研究ではこれらのメカニズムを明らかにすることはできなかった。したがって、今後の研究では、EMU-ミネラルと血中ホルモン濃度との関係や、Na が他のミネラル代謝に与える影響などを明らかにしていく必要がある。

本研究では、NaCl の 6g/d という低い Na 制限が EMU-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。食事中の Na は、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るべき項目である。

参考文献

[1] Nishimuta M, Tsuji E, Kodama N, Ono K, Kobayashi S. Magnesiuresis after Butter and Egg rich diet in young Japanese females. J Jap Soc Mg Res. 1986. **5**：53–60 (in Japanese).

[2] Yamada H,　Nishimuta M. Some energy sources shift mineral metabolism in young rat. J Jap Soc Mg Res. 1987. **6**: 185–191 (in Japanese).

[3] Nishimuta M, Kodama N, Ono K, Matsumoto Y, Tera T, Yamada H, Kobayashi S. Stress induced magnesiuresis in human. J Jap Soc Mg Res. 1988.**7**: 123–132 (in Japanese).

[4] Nishimuta M, Kodama N, Ono K. Fatigue and mineral metabolism in human. Hirou to kyuyo no kagaku. 1989.**4**：55–60 (in Japanese).

[5] Nishimuta M, Kodama N, Takeyama H, Toyooka F. Magnesium metabolism and physical exercise in human. In: Magnesium: Current status and new developments. Kuluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1997.109–113.

[6] Nishimuta M, Kodama N, Morikuni E, Yoshioka H Y, Matsuzaki N, Takeyama H, Yamada H, Kitajima H. 2005. Positive correlation between dietary intake of sodium and balance of calcium and magnesium in young Japanese adults -Low sodium intake is a risk factor for loss of calcium and magnesium-. J Nutr Sci Vitaminol **51**: 265–270 doi: https://doi.org/10.3177/jnsv.51.265

[7] Nishimuta M, Kodama N, Morikuni E, Yoshioka H Y, Takeyana H, Yamada H, Kitajima H, Suzuki K. Balance of calcium, magnesium and phosphorus in Japanese young adults. J Nutr Sci Vitaminol.2004. **50**: 19–25 doi:https://doi.org/10.3177/jnsv.50.19

[8] Nishimuta M, Kodama N, Shimada M, Yoshitake Y, Matsuzaki N, Morikuni E. Estimated equilibrated dietary intakes for nine minerals (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu and Mn) adjusted by mineral balance medians in young Japanese females. J Nutr Sci Vitaminol 2012.58: 118–128 doi: 10.3177/jnsv.58.118

[9] Kodama N, Morikuni E, Matsuzaki N, Yoshioka YH, Takeyana H, Yamada H, Kitajima H, Nishimuta M. Sodium and potassium balance in Japanese young adults. J Nutr Sci Vitaminol 2005.**51**: 161–168 https://doi.org/10.3177/jnsv.51.161

[10] Nishimuta M, Yamada T, Kobayashi S, Suzuki K. Post exercise depression of serum magnesium in man. J Jap Soc Mg Res 1983. **2**: 49-56.

[11] Nishimuta M, Kodama N, Yoshioka HY, Morikuni E, Takeyama H, Kitajima H, Yamada H. Intake and balance of magnesium in young Japanese. J Jap Soc Mg Res 2000.**19**: 1–8 (in Japanese).

[12] Serizawa N, Nishimuta M, Kodama N, Shimada M, Yoshitake Y. Second voided fasted early morning urine magnesium (EMU-Mg) as a possible indicator for intracellular magnesium status in humans. J Jap Soc Mg Res 2014. **33**: 1–10.

[13] Ministry of Health, Labour and Welfare. Recommended dietary allowances for the Japanese (6th revision): Dietary reference intakes. 1999. Daiichi-shuppan, Tokyo (in Japanese).

[14] Resources Council: Science and Technology Agency, Japan. Standard Tables of Food Composition

in Japan Fifth revised ed. 2000. National Printing Bureau. Tokyo (in Japanese).

[15] Kumae T, Kogure H, Nishimuta M, Kodama N, Yoshitake Y. Effect of 21 days metabolic study on serum opsonic activity in female college students, assessed by a chemiluminescence technique. *Luminescence* 2006.**21**: 256–261doi: 10.1002/bio.918

[16] Nishimuta M, Kodama N, Matsuzaki N, Morikuni H, Shimada M, Yoshitake Y. Decrease in fecal moisture and sodium concentration under salt restriction (6g/d) in humans. *Bulletin of Chiba Prefectural University of Health Sciences* 2011. **2**: 27–37 (in Japanese).

[17] Kodama N An estimation for reliability of dietary intake of minerals on the calculating method of duplicating analysis. Comparison among dietary mineral contents calculated by the tables in menu and measured in diets made of food exactly followed by the menu used for human mineral balance studies. *Annual Rep, Natl. Inst. Health Nutr*. 1991. **40**: 59–68 (in Japanese).

[18] Imai M. Regulation of water and sodium metabolism: urine concentrating mechanisms and action of vasopressin. *J Jpn Soc Int Med* 1985. **74**: 675–680 (in Japanese).

[19] Kanai M. Kanai's manual of Clinical laboratory medicine (revised edition no. 34). *Kanehara & Co Tokyo., Ltd*: 2015. 662–665, 1862–1863.

[20] Kodama N, Nishimuta M, Suzuki K. Negative balance of calcium and magnesium under relatively low sodium intake in humans. *J Nutr Sci Vitaminal* 2003. **49**: 201–209 doi: https://doi.org/10.3177/jnsv.49.201

[21] O'Neil RG. Aldosterone regulation of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct. *Semin Nephrol* 1990. **10**: 365–374 doi: https://doi.org/10.5555/uri:pii:027092959090020Z

[22] Nishimuta M, Kodama N, Ono K, Kobayashi S, Suzuki K. 1985. Mineral contents in arm sweat at a low mineral diet with special reference to the onset of physical exercise. *J Jap Soc Mg Res* **4**: 13–21 (in Japanese).

第 2 章　ビタミン B_2 および α-トコフェロールの単独・併用摂取による血漿ホモシステイン濃度低下の検討

第 1 節　緒言

ここ数十年、人々のスポーツへの関心が高まっている一方、運動に伴う健康問題も増えている。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（FAT）」として提唱された[1]。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である[2]。

ホモシステイン（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ており、ストレス性骨折との関連も示唆されている[3-8]。HCY はメチオニンの中間代謝物であり、主に葉酸、ビタミン B_{12}（$V.B_{12}$）、リボフラビン（ビタミン B_2[$V.B_2$]）に依存したメチオニンへの再メチル化とビタミン B_6（$V.B_6$）に依存した硫黄転移化の 2 つの経路で代謝される[5]。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）によって 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[9]。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[9]。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[9-11]。さらに、C677T は MTHFR の酵素活性を低下させ、5-メチルテトラヒドロ葉酸の産生を減少させるので、その結果、HCY からメチオニンへの経路を阻害し、血中 HCY 濃度の上昇につながることが示されている[12-15]。MTHFR 遺伝子の C677T 多型の変異は、ストレス性骨折と関連しており、独立した危険因子として同定されている[16]。MTHFR の補酵素である FAD の前駆体である $V.B_2$ は、血漿 HCY レベルの独立した決定因子であることが示されている[17]。しかし、低 $V.B_2$ 摂取（1.6 mg/日）では血中 HCY レベルに影響を与えないことが明らかになっており[18]、$V.B_2$ 摂取の血中 HCY 低下の効果を確認するためにはさらなる研究が必要である。

さらに、葉酸は一炭素担体として重要な役割を果たしており、メチル化反応の際に HCY のメチオニンへの変換を促進する。いくつかの研究でビタミン C（V.C）と葉酸の間の相互作用が記述されているが、根本的なメカニズムは解明されていない[19, 20]。葉酸の抗酸化は、葉酸の循環レベルを高め、血中 HCY レベルを低下させる方法として検討されてきた。抗酸化物質である V.C、ビタミン E（V.E）を含む食事のサプリメントは、血中の HCY レベルを低下させることが報告されている[21]。さらに、単純回帰分析により、血漿中の V.C レ

ベルは HCY レベルと負の関連があることが示されている[22]。したがって、抗酸化ビタミンの同時投与は、血漿中 HCY レベルの上昇に対する V.B 群の効果を増強する可能性があるという仮説を立てた。したがって、本研究の目的は、C677T 多型のホモ型（TT）およびヘテロ型（CT）を持つ女子陸上長距離選手の血中 HCY 濃度に対する $V.B_2$ および/または V.E（α-トコフェロール:α-TP）補給の効果を決定することにあった。本研究の知見は、遺伝的多型を考慮した栄養管理支援の発展への科学的根拠となり得ると考えており、女子陸上長距離選手の健康管理における遺伝的多型を考慮した栄養管理支援の発展に寄与できると考えている。

第 2 節　方法

2.2.1 研究倫理

本研究は、ヘルシンキ宣言に定められたヒトを対象とした研究に関するガイドラインに準拠して実施され、「東洋大学における人を対象とする医学系研究に関する倫理運営委員会」東洋大学「ヒトを対象とした医療・健康研究に関する倫理指針」委員会（承認番号：TU2016-012 承認日 2016 年 9 月 16 日、承認番号 TU2018-016 承認日 2018 年 10 月 3 日）の承認を得た。本研究を実施するにあたり、倫理運営委員会規定に従い、被験者個人の権利を守り、不利益が生じないよう十分に配慮した。被験者全員に本研究目的、内容、本研究のリスク、不快感、有益性、途中離脱に際し不利益がないことを書面および口頭にて説明を行い、被験者の同意を文書にて得た上で実施した。

2.2.2 被験者特性

本研究では，年齢≧18 歳の包括基準を満たす女子大学陸上競技選手 21 名を被験者として募集した。このうち、インフルエンザの症状を示す 4 名を除外し、残りの 17 名を対象に MTHFR C677T 多型の TT または CT 遺伝子型を解析した。MTHFR C677T 多型における TT または CT 遺伝子型を有する女子陸上長距離選手は 11 名であった。方法は、以下の MTHFR C677T 多型の解析に記載した。したがって、本実験の最終的な被験者数は 11 名であった。サンプルサイズは検出力 80%、$\alpha = 0.05$、$\beta = 0.20$ のパラメーターを用い、HCY のエフェクトサイズは 1.0 μmol/L とした[23]。被験者の身体的特徴と競技成績を Table 2-1 に示す。

Table 2-1. Physical characteristics of female track and field athletes with C677T genotype and their competition performance

ID	Sex	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI	Number of stress fractures	SNPs (MTHFR C677T)	Monthly running distance (km)	Competing in the track and field (yr)	Best record (3,000 m-race) (min)
A	F	21	156.0	45.0	18.5	2	CT	425	9	9.34
B	F	21	165.2	49.5	18.1	1	CT	392	9	9.57
C	F	21	162.8	42.4	16.0	2	CT	416	10	9.43
D	F	21	150.0	42.0	18.7	0	CT	519	12	9.47
E	F	20	160.0	42.5	16.6	0	CT	804	5	9.25
F	F	20	160.0	46.5	18.2	0	TT	418	8	9.48
G	F	19	163.0	47.5	17.9	0	CT	500	7	9.36
H	F	19	158.3	38.5	15.4	0	CT	252	4	9.45
I	F	19	157.3	45.9	18.6	0	CT	517	7	9.49
J	F	19	163.5	53.0	19.8	0	CT	467	4	10.08
K	F	19	171.0	49.0	16.8	0	CT	525	7	9.29
(Mean ± S.D.)		19.9 ± 0.9	160.6 ± 5.2	45.6 ± 3.9	17.7 ± 1.3	0.5 ± 0.8		476 ± 128	7.5 ± 2.4	9.47 ± 21

2.2.3 実験期間

本研究は、2018 年 1 月から 2018 年 11 月までの期間で実施した。実験期間は、対照期間（コントロール期）、$V.B_2$ 摂取期間（$V.B_2$ 期）、α-TP 摂取期間（α-TP 期）、併用摂取期間（$V.B_2$ ＋α-TP 期）の 4 つの期間に分けた。各実験期間の間に 14 日間以上のウォッシュアウト期間が設けられた。総実験期間 12 週間であった。身体計測および、採血は東洋大学 板倉キャンパス内で実施した。実験プロトコルを Figure 2-1 に示した。

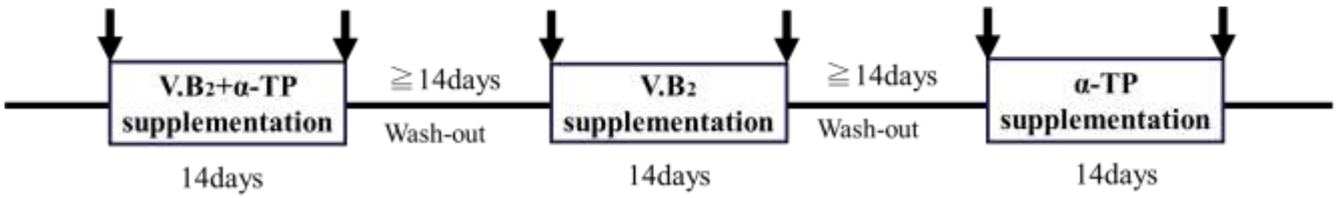


Figure 2-1. Experiment protocol

Schematic showing the study period. The duration of the study was 12 weeks (four periods of 14 days for the various vitamin loading periods), including a 2-week washout periods after each supplement period. The loading test was carried out in combination with $V.B_2$ and α-TP (concurrently intake), and another loading test was conducted with each vitamin taken alone. Morning fasting blood collection before and after each vitamin period is shown in the arrows.

2.2.4 被験者の実験期間中の生活

被験者は実験期間中、全員が同一施設にて生活した。食事も全員、ほぼ同時刻に摂取した（朝：7 時 30 分、昼：12 時 40 分、夜：7 時 30 分）。

2.2.5 食事摂取およびビタミン負荷量

被験者は同一施設内にて生活し、朝食と夕食は同一の食事を摂取した。食事調理にあたっては、献立化されており、被験者は全員が平均的な日本人の 18-29 歳の食事を日常的に摂取していた。本研究における $V.B_2$ および α-TP の 1 日の負荷量は、日本人の食事摂取基準量（2015 年版）およびこれまでの報告を考慮し、$V.B_2$ が 28mg/日、α-TP を 60mg/日とした[24-27]。被験者は、1 日 2 回、朝食時と夕食時に粉末ビタミンを経口摂取した。摂取頻度は、血中のビタミン半減期を考慮して設定した[28, 29]。各ビタミンはサイクルメニューとして参加者の食事（ヨーグルト、ゼリー、シャーベット、スムージー）に混ぜて提供された（Table 2-2）。コントロール期は、それら食品を摂取してもらうが、ビタミンの負荷は実施していない。なお、$V.B_2$ 製剤（リボフラビン F）および α-TP 製剤（抽出 α-E 末）は、三菱化学フーズ株式会社製のものを使用した。

Table 2-2. Four menus of mixed with vitamin B_2 and/or α-TP

Menu/ ingredients	1 serving	Menu/ ingredients	1 serving
Yoghourt		**Sorbet**	
Yoghourt（no fat）	50g	100% orange juice	100mL
Canned pineapple	20g	Canned paineapple	50g
Marmalade	7g	Sugar	9g
Orange jelly		**Smoothie**	
100% orange juice	130mL	Yoghourt (no fat)	50g
Sugar	13g	Banana	40g
Gelatin	2.5g	Canned peach	25g
Canned orange	13g	Canned orange	25g
Water	22g	Honey	5g
		Syrup	5g

These meals were prepared in the dorm kitchen. Each vitamin was mixed into these foods. Subjects had taken these meals without knowing that they contained vitamins ($V.B_2$ 30mg/d, α-TP 60mg/d). We provided these four menus as cycle menus.

2.2.6 試料およびデータ採取

1. 身長および体重

被験者の身長及び体重は体成分分析装置（ボディーコンポジションアナライザー Inbody 770、株式会社インボディ・ジャパン、東京、日本)にて測定した。体重測定に際しては、排尿排泄後、上半身はTシャツ（ランニングシャツ）、下半身はトレーニングウエアを着用し測定した。体重測定時には、衣服の風袋重量を考慮し、500g を差し引いて測定した。

2. 採血

1) 採取条件

各ビタミン摂取期間の前後に空腹時採血を行った（Fig.2-1）。各ビタミン摂取開始当日の朝と、摂取終了後の翌日の朝である。被験者は、採血日に学内に設けた採血会場に集合した。早朝空腹時の採血のため、被験者には朝食の摂食なし（水のみ摂取可能）で、血液を採取した。血液の採取は上腕の静脈血採取法により実施した。採血は医師の指示および監督のもと、採血業者（一般社団法人 健康倶楽部、医療法人クレモナ会 TM クリニック）に依頼し、看護師および臨床検査技師により被験者の採血が実施された。

2) 血液保管

試料を採取する採血管は生化学管と EDTA-２K 管を用意した。事前に採血管には ID を記し試料に混合がないようにした。一回の採血量は 20mL/人とした。採血量については、通常の健康診断および献血量から鑑みて、採血量は少量であり適切量である。採血後に静置した採血管を遠心機 (As one Hsiang Tai Centrifuge）に 3000rpm 10 分間 遠心し、血漿および血球、血清および血球に分離した。採血当日中に、学内で分析する血漿・血清を 1.5mL チューブにそれぞれ分注し、分析まで-30℃で保管した（SANYO BIOCEMICAL FREEZER、三洋電機株式会社、大阪、日本)。

3. 食事記録

食事による栄養素摂取量は簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ：brief-type self-administered diet history questionnaire）を用い、被験者に記入してもらい、データ分析を DHQ サポートセンターに依頼した。BDHQ は類似の質問票とほぼ同じか、またはわずかに高い妥当性を持つ食事摂取量の質問票として信頼性が高い[30, 31]。

2.2.7 血液分析

1. 測定項目

測定項目は、被験者の MTHFR の SNP 型、血漿 α-Toc、血清 $V.B_2$、血漿 HCY、葉酸であ

る。

2. 測定方法

MTHFR の C677T の SNP 型は PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 法および電気泳動法にて判定した。血漿 α-TP、HCY 濃度は学内で液体クロマトグラフィー：High performance liquid chromatography 法（HPLC 法）、血漿葉酸濃度は酵素結合免疫吸着法（ELISA 法）で測定した。

2.2.8 MTHFR（C677T）の SNP 型判定

1. 唾液の採取

DNA 採取キット Oragene® Discover kit, OGR-600 (DNA Genetek Inc., Ottawa, Canada)を用いて、被験者の唾液を採取した。唾液とキット内試薬を十分に混合させるため転倒混和し、静置後に滅菌済み 1.5mL チューブに 600μL 分注した（唾液サンプル）。分析まで期間がある場合には-30°Cで凍結保存した。

2. DNA 抽出・DNA 量確認

唾液サンプルを 50°Cの恒温槽にて 60 分間プレインキュベーションし、新たな 1.5mL チューブに 500μL 分注後、精製溶液 20μL を加え攪拌した。10 分間、氷の上で冷却後、遠心分離（25°C、13,000rpm、2min）し、上清のみ新しい 1.5mL に分注し、沈殿物は廃棄した。つぎに 100%エタノール 600μL を添加し、静かに 10 回程度転倒混和し、室温にて１０分間静置し、DNA を沈殿させた。再度、遠心分離にかけ（25°C、13,000rpm、2min）、上清を廃棄し、沈殿物のみを確保した。それに 70%エタノールを 250μL 静かに添加し、室温にて 1 分間静置した。再び、上清を廃棄し TE Buffer を 100μL 添加し、攪拌後、50°Cの恒温槽で 1 時間インキュベートした。その間、数回攪拌をおこなった。これを DNA 抽出のサンプルとした。DNA 量の確認にはナノドロップ（NANODROP LITE spectrophotometer Thermo Fisher Scientific K.K., Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan）を使用し、DNA 量を各サンプルで２回確認した。その後、各 DNA サンプルの DNA 量の平均値を求めた。

3. PCR（DNA の増幅）

各サンプルの DNA 量の平均値から 100ng 相当量（μL）を計算し、Sterile water 量を算出した。Sterile water（Fill to 20μL）、25μM Primer（1μM）、DNA template（1000 ng of equivalance）、DNA polymerase（10μL）の順番で PCR チューブ（0.2 mL）に入れ、PCR 機器（Biometra, Tersonal thermocycler, BM Equipment Co.,Ltd., Tokyo, Japan）にセットし、反応させた。反応条件は Table2-3 に示したとおりである。MTHFR C677T プライマーは S; 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' および MTHFR C677T Primer-AS; 5'-

CCTCACCTGGATGGGAAAGATCC-3'、DNA ポリメラーゼは Premix Taq ™ Version 2.0（TAKARA BIO INC. Japan）を用いて増幅した。

Table 2-3. The DNA amplification program

	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	94°C	5 min	repeated for 50 cycles
Denaturation	94°C	30 sec	
Annealing	60°C	60 sec	
Extension	72°C	60 sec	
Final extension	72°C	60 sec	
Incubation	4°C	(forever)	

The procedure for amplifying DNA by the PCR method is shown. DNA was amplified at the temperatures and times shown in order from the top of the table.

4. DNA 量確認

DNA 量の確認にはナノドロップを使用し、DNA 量を各サンプルで 2 回確認した。その後、各 DNA サンプルの DNA 量の平均値を求めた。ここでは TE buffer ではなく、MilliQ を用いた。

5. DNA の切断（制限酵素反応）

1.5mL チューブに Sterile water（Full to 25µL）、DNA template （1000ng of equivalence）、Buffer（2.5 µL）、Enzyme（HinfI; 0.1 µL New England Biolabs, USA）の順に入れた。スピンダウン後、溶液を回収し、37℃で振盪しながら C677T を 2 時間インキュベートした。

6. 電気泳動

C677T の SNP 型を分析するために、3%のアガロースゲルを作成した。Agarose 0.6g に対し 1×TAE buffer 20mL、SYBR Green を 2µL で調整後に加熱処理し、完全に溶解させた。ゲル溶解後、40℃程度に冷却し Nucleic Acid Gel を加え、色を均一になるまで混ぜた。その後、ただちにゲルトレイに流し、遮光状態で 20~30 分放置し、室温でゲルを固めた。ゲルが固まったことを確認し、分子量マーカーを 5 µL をアプライした。各 PCR サンプル 10µL を 2µL の Loading Buffer と懸濁し、そのうち 10µL をゲルにアプライした。電気泳動槽は遮光状態で 50V・90 分の条件とした。その後、UV 下（Alpha Innotech, Alpha imager Mini バイオスピード株式会社、東京、日本）で結果判定を行った。

2.2.9 HPLC 法による血漿 HCY の測定

1. 血漿 HCY サンプル作成

25µL の血漿サンプルを 1.5mL チューブに移し、0.3M PBS（pH7.4）を 205µL、10µM NAC: Nacetyl-L-cysteine（Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan）を 25µ 添加し攪拌した。次に、60mM TCEP: Tris (2-carboxyethl) phosphine Hydrochloride （NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan）を 10µL 添加し、攪拌後、震盪器にて室温に 30 分放置した。この際、スタンダードは遮光した。さらに、1mM EDTA-2Na（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を含む 100g/L TAC: Trichloroacetic acid（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を 90µL 添加し、攪拌後に遠心分離を実施した（20℃、13000 G、10min）。上清 90µL をオートサンプラー用バイアルに移し、1.55M NaOH を 7.5µL 添加後に再度攪拌した。これを HPLC 用分析サンプルとした。

2. HCY 測定用移動相作成

MilliQ 1000mL に対し NaH_2PO_4 を 12g 入れ攪拌した。2 倍に希釈した Phosphoric Acid を添加し、pH2.5 のリン酸溶液を作成した。その後、10 %Methanol 10mL、SOS: sodium dihydrogen

phosphate anhydrous（Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan）170mg、EDTA-2Na 5mg を加えた。気泡の発生を避けるためオーバーナイト後に使用した。

3. HCY の標準試薬調製および HPLC 分析条件

1）HCY 標準試薬の調製

HCY の分析用スタンダードおよび 10μM NAC は Table2-4、Table2-5 に示すように調製し作成した。作成後は遮光保存した。検量線には 0、1、3、15、30 µM を用いた。0.3 M PBS は PBS を 3 mL と MilliQ を 7 mL 合わせた。60 mM TCEP は TCEP を 0.0172 g と MilliQ を 1 mL 合わせた。100 g/L TCA（1 mM EDTA-2Na を含む）を 2.0 g、EDTA-2Na 0.0074 g を MilliQ で 20 mL にメスアップした。1.55 M NaOH は NaOH を 0.6200 g と MilliQ を 10 mL 合わせた。

Table 2-4. Preparation of Standard samples

Standard Tubes	Concentrations	DL-Homocysteine	MilliQ (μL)
#1	＜10-1 M＞	0.0135 g	1000
#2	＜10-2 M＞	100 μL of Tube#1	900
#3	＜10-4 M＞	10 μL of Tube#2	990
#4	＜30 μM＞	300 μL of Tube#3	700
#5	＜15 μM＞	400 μL of Tube#4	400
#6	＜3 μM＞	200 μL of Tube#5	800
#7	＜1 μM＞	250 μL of Tube#6	500

Seven concentrations of tubes were prepared as standard reagents. 0.0135 g of homocysteine was weighed into standard tube # 1, 1000 μL of MilliQ was added, and then standard reagents of each concentration was diluted from the previous standard tube and prepared.

Table 2-5. Preparation of 10 μL NAC

Standard Tubes	Concentrations	NAC	MilliQ (μL)
#1	＜10-1 M＞	0.0163 g	1000
#2	＜10-3 M＞	10 μL of Tube#1	990
#3	＜10-4 M＞	10 μL of Tube#2	990

Three concentrations of tubes were prepared as standard reagents. 0.0163 g of NAC was weighed into standard tube # 1, 1000 μL of MilliQ was added, and then standard reagents of each concentration was diluted from the previous standard tube and prepared.

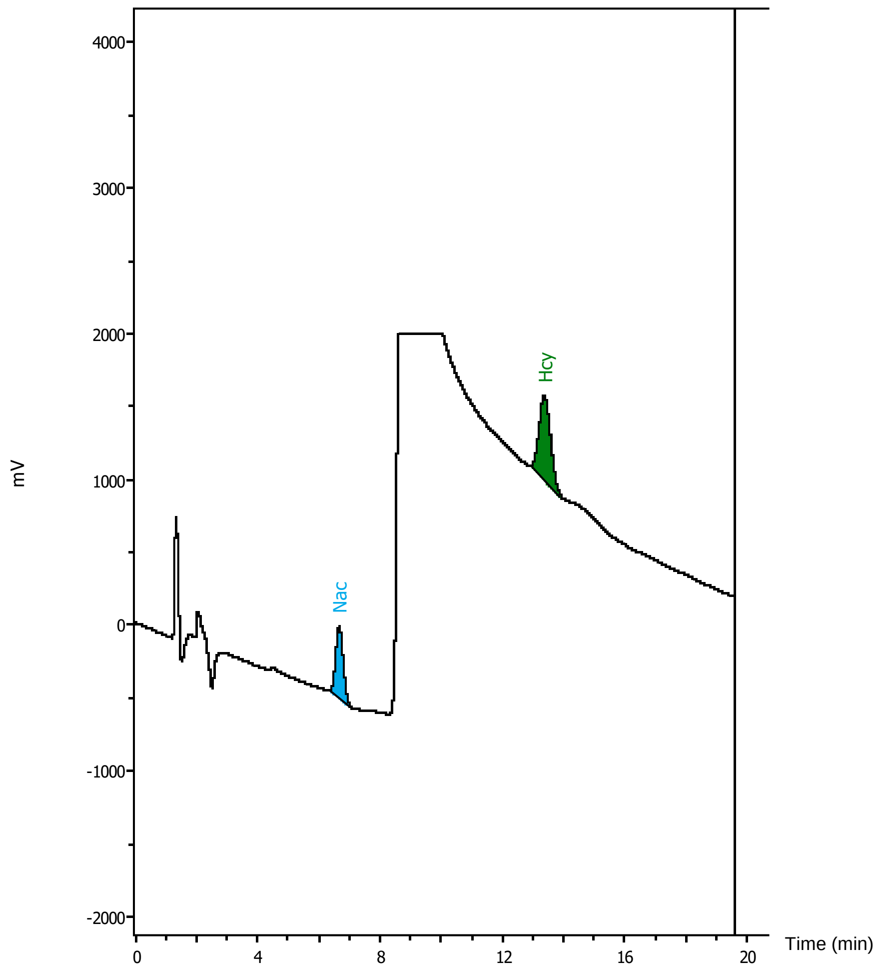
2）HPLC の HCY 分析条件

血清サンプルは HPLC（JASCO Corporation, Tokyo, Japan）を用いて分析した。HPLC による血漿 HCY 分析の条件を Table 2-6 に示した。また、クロマトグラム上の HCY のピークを Figure 2-2 に示した。

Table 2-6. Conditions for plasma HCY analysis by HPLC

Items	Equipment, Reagents and conditions
Pump	EP-700（LIQUID CHROMATOGRAPH PUMP/Eicom）
Auto sampler	M-504（Eicom）
Detector	Eicom ECD-700
Working electrode	Eicom WE-AU
Pre-column	Eicom PC-04 4.0mmφ×5mm
Column	Eicom-3ODS（3.0 φ×150 mm）
Column temperature	25 ℃
Buffer	99 % 0.1 M Sodium phosphate buffer（pH2.5）,1 % Methanol, 170 mg/L Sodium Octansulfornate, 5 mg/L EDTA-2Na
Flow rate	500 µL/min
Injection volume	10 µL

Figure 2-2. Separation of Homocysteine in Human Plasma by HPLC



This is a chromatogram of a standard reagent used when HCY of human serum was analyzed by the HPLC method. The NAC appears around 7 minutes and the HCY appears around 13 minutes.

2.2.10 HPLC 法による血漿 α-TP の測定

1. 血漿 α-TP サンプル作成

血漿 100μL に 100％ Ethanol を 390μL、内部標準の 100μM dl-Tocol（Tama Biochemical Co., Ltd., Tokyo, Japan）を 10μL 加え、遠心分離を（4°C、15.000 rpm、15min）した。遠心分離後に上清を 1mL 容シリンジで採取し、0.2μm フィルターを通して新しい 1.5mL チューブに移した。沈殿物は廃棄した。その後、チューブ内が半量（約 250μL）になるまで、濃縮遠心機にて揮発させた。その後 HPLC 用バイアルに 100μL 分注し、アルゴン置換した。それを血漿 α-TP サンプルとした。

2. α-TP 測定用移動相の作成

HPLC 用 Methanol と MilliQ にて 90% Methanol（prepared using HPLC grade methanol and MilliQ water）を作成し、移動相とした。

3. 標準試薬調製および分析条件

1）標準試薬の調製

α-TP 分析用スタンダードは Table2-7 a), b) に示すように検量線に 0、10、20、30、40、50、100μM の 7 種類を調製した。標準試薬にはビタミン E 定量用標準試薬（三菱ケミカルフーズ株式会社、東京、日本）、内部標準試薬に dl-トコール 100mg（タマ生化学株式会社、東京、日本）を用いた。

Table 2-7 a). 100μM Standard preparation for analyzing plasma vitamin E by HPLC

100μMα,β,γ,δ-Tocopherol Mixed liquid and Internal standard preparation						
Step	Procedure	Standard reagent				Internal Standard
		α-Tocopherol	β-Tocopherol	γ-Tocopherol	δ-Tocopherol	Tocol
1	Weighed out	5.00mg	4.20mg	4.20mg	4.00mg	4.00mg
2	Add 100% Ethanol 1000μL to each tocopherol and tocol in each tube.					
3	Agitation (concentration/Volume)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)
4	dispensing	200μL	200μL	200μL	200μL	100μL
5	Mix each 200μL tocopherol and add 200μL of 100% methanol in a new 1.5 mL tube					Add 100% Ethanol 900mL in a new 1.5 mL tube
6	Agitation (concentration/Volume)	α,β,γ,δ-Tocopherol Mixed liquid (2mM/1000μL)				(1mM/1000μL)
7	Dispensing	100μL to new 1.5mL tube				100μL to new 1.5mL tube
8	Add 100% Ethanol 900μL to each tocopherol and tocol in each step #7 tube					
9	Agitation (concentration/Volume)	α,β,γ,δ-Tocopherol Mixed liquid (200μL/1000μL)				(100μM/1000μL)
10	Dispensing	500μL to new 1.5mL tube				↓
11	Add 100% Ethanol 500μL to step #10 tube					↓
12	Agitation (concentration/Volume)	α,β,γ,δ-Tocopherol Mixed liquid (100μM/1000μL)				↓
13	Complete					

Table 2-7 b). 0 to 100μM Standard preparation for analyzing plasma vitamin E by HPLC

0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μM Standard samples								
Step	Procedure	Standard concentrations						
		Std_0μM	Std_10μM	Std_20μM	Std_30μM	Std_40μM	Std_50μM	Std_100μM
1	Dispensing from a) #12 to each new tube	↓	100μL	100μL	150μL	200μL	200μL	↓
2	Add 100% Ethanol		900μL	400μL	350μL	300μL	200μL	
3	Agitation		(10μM/500μL)	(20μM/500μL)	(30μM/500μL)	(40μM/500μL)	(50μM/500μL)	
4	Dispensing from b) #3 to each new tube		100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	Dispensing 100μL from a)#12 to a new tube
5	Add 10μL from 100μM Tocol (#9) to each standard concentration tube (#16)							
6	Add 100% Ethanol	490μL	390μL	390μL	390μL	390μL	390μL	390μL
7	Agitation							
8	Concentrate to about half (Tomy, Micro Vac TM MV-100, Tomy medico co., LID. Tokyo, Japan)							
9	Dispense 100μL into a vial for HPCL.							
10	Complete	Std_0μM	Std_10μM	Std_20μM	Std_30μM	Std_40μM	Std_50μM	Std_100μM

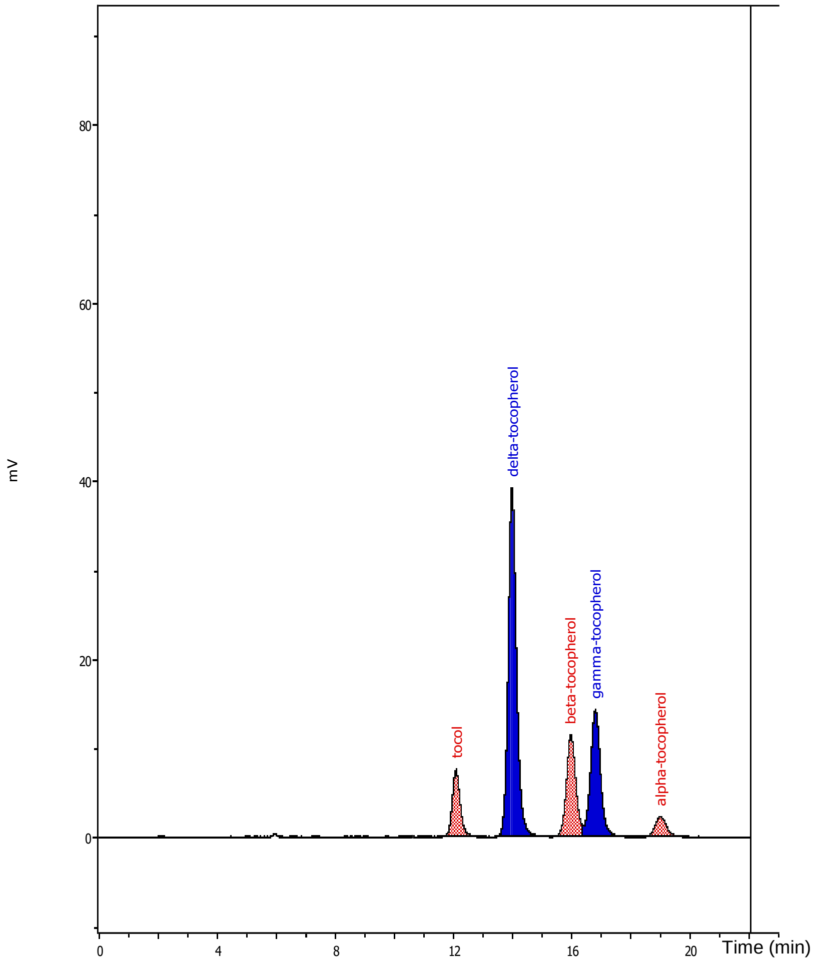
2）HPLC の α-TP 分析条件

血清サンプルは HPLC (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)を用いて分析した。HPLC による血漿 HCY 分析の条件を Table 2-8 に示した。また、クロマトグラム上の HCY のピークを Figure2-3 に示した。

Table 2-8. Conditions for plasma α-TP analysis by HPLC

Items	Equipment, Reagents and conditions
Pump	EP-700（LIQUID CHROMATOGRAPH PUMP/Eicom）
Auto sampler	AS-4050（Jasco）
Detector	FP-2025 Plus Intelligent Fluorescence Detector　（Jasco）
Pre-column	Eicom PC-04 4.0mmφ×5mm
Column	COSMOSIL Packed column 5PFP 4.6mm I.D.×250 mm
Column temperature	40 ℃
Wave length	EX 292 nm/EM 325 nm
Buffer	Methanol：MilliQ（v/v）＝9：1
Flow rate	700 μL/min
Injection volume	20 μL

Figure 2-3. Separation of Vitamin E (α-tocopherol) in Human Plasma by HPLC



This is a chromatogram of a standard reagent used when tocopherols of human serum was analyzed by the HPLC method. The tocol appears around 12 minutes, delta-tocopherol appears around14 minutes, beta-tocopherol appears around 16 minutes, gamma-tocopherol appears 18minutes and alpha-tocopherol appears around 19 minutes.

2.2.11 葉酸（ELISA 法）

血漿葉酸濃度の分析には、葉酸定量測定のための競合 ELISA キット Folic Acid ELISA Kit（Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA）を用いた。操作手順はこのキットで指示されたとおりに行った。酵素反応終了後、分光光度計（Sunrise™, Tecan Japan Co., Ltd., Kawasaki, Japan）にて波長 450nm で各マイクロウェルの吸光度を読み取り、葉酸標準曲線との比較にて算出した。

2.2.12 統計解析

得られたデータは統計ソフト SPSS（Statistical Packed for the Social Ver. 26）を用いた。数値は平均±標準偏差（Mean ± SD）で示した。介入試験の前後比較は、正規性の検定（Shapiro-Wilk）を実施後、正規性が確認されたものは対応のある t-test を、正規性が認められなかったものには Wilcoxon の符号付き順位検定を行った。濃度変化量については、正規性の検定（Shapiro-Wilk）実施後に有意確率の結果から、一元配置分散分析（kruskal-wallis 検定 一元配置のノンパラメトリック）を行った。検定はすべて両側検定で、有意水準は 5 %未満とした。

第 3 節　結果

2.3.1 被験者の C677T 多型の状態と身体的特徴

健康な 17 名の被験者のうち、11 名が C677T 多型を示し、本研究での解析のために募集した。これら 11 名の被験者の年齢は 19 歳から 21 歳であり、平均競技歴は 7.5 年であった。これらの被験者のその他の身体的特徴を Table 2-1 に示した。

2.3.2 栄養素摂取状況

BDHQ の結果は、摂取エネルギー：2,145 ± 572kcal、PFC 比率は、タンパク質：18.6 ± 2.4%、脂質：28.5 ± 6.0%、炭水化物：52.1 ± 7.6%、$V.B_2$：0.9 ± 0.2 mg/1000kcal、$V.B_6$：1.0 ± 0.2 mg/1000kcal、$V.B_{12}$：9.1 ± 2.5µg/1000kcal、Folic acid：252 ± 78µg/1000kcal、V.C：95 ± 38 mg/1000kcal、V.A：825 ± 310µgRAE/1000kcal、V.E：5.2 ± 1.4 mg/1000kcal であった。いずれの栄養素も日本人の食事摂取基準 2020 年版の推奨量の数値を満たしていた[32]。エネルギー摂取、栄養素摂取量を Table 2-9 に示した。

Table 2-9. Dietary energy and nutrient intake of female athletes

Calculated values (Mean ± S.D.)			DRIs	
Energy	kcal	2,145 ± 572		
Protein	(%)	18.6 ± 2.4	13~20%	PFC energy ratio
Lipid		28.5 ± 6.0	20~30%	
Carbo		52.1 ± 7.6	50~65%	
$V.B_2$	mg/1000kcal	0.9 ± 0.2	0.6	RDA
$V.B_6$		1.0 ± 0.2	0.55	RDA
$V.B_{12}$	μg/1000kcal	9.1 ± 2.5	1.2	RDA
Folic acid		252 ± 78	120	RDA
V.C	mg/1000kcal	95 ± 38	50	RDA
V.A	μgRAE/1000kcal	825 ± 310	325	RDA
V.E	mg/1000kcal	5.2 ± 1.4	2.5	RDA

Dietary protein, fat, and carbohydrates intakes were shown by the PFC Energy ratio. $V.B_2$ and V.E are shown as intake per 1,000 kcal of energy.

2.3.3 血清 V.B$_2$ 濃度

V.B$_2$+α-TP 期、V.B$_2$ 期、α-TP 期では、摂取前と比較して摂取後の血清 V.B$_2$ 濃度が有意に上昇した(before versus after supplementation [µg/dL]: V.B$_2$+α-TP period, 20.3 ± 3.4 versus 24.0 ± 2.6, $p < 0.01$; V.B$_2$ period, 17.4 ± 4.1 versus 22.4 ± 2.4, $p < 0.001$; α-TP period, 23.5 ± 4.5 versus 19.5 ± 2.5 $p < 0.05$)（Table 2-10）。

2.3.4 血漿中 α-TP 濃度

V.B$_2$+α-TP 期、V.B$_2$ 期、α-TP 期では、摂取前と比較して摂取後の血漿中 α-TP 濃度が有意に上昇した(before versus after supplementation [µg/mL]: V.B$_2$+α-TP period: 18.1 ± 3.1 versus 20.7 ± 1.5, $p < 0.05$; V.B$_2$ period: 25.2 ± 4.4 versus 20.6 ± 3.9, $p < 0.001$; α-TP period: 19.5 ± 4.1 versus 23.6 ± 4.0, $p < 0.05$)（Table 2-10）。

2.3.5 血漿中葉酸濃度

V.B$_2$+α-TP 期、V.B$_2$ 期、α-TP 期では、摂取前と比較していずれも摂取後との間に有意な差は認められなかった。（Table 2-10）。

Table 2-10. Serum V. B_2, plasma α-TP and folate concentrations before and after V. B_2 and/or α-TP supplementation

(n= 11)	V.B_2+ α -TP supplementation		V.B_2 supplementation		α -TP supplementation	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Serum V. B_2 (μg/dL)	20.3 ± 3.4	24.0 ± 2.6**	17.4 ± 4.1	22.4 ± 2.4***	23.5 ± 4.5	19.5 ± 2.5*
Plasma α -TP (μmol/L)	18.1 ± 3.1	20.7 ± 1.5*	25.2 ± 4.4	20.6 ± 3.9***	19.5 ± 4.1	23.6 ± 4.0*
Plasma folic acid (ng/mL)	9.5 ± 5.0	10.7 ± 3.7	8.0 ± 4.1	6.8 ± 3.8	7.7 ± 4.7	7.2 ± 4.2

Values represent the mean ± standard deviation of fasting blood samples, taken in 14 days each, before and after vitamin supplementation. Number of asterisks in a row indicate the significant difference between the pre- and post-supplementation data, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$. Reference ranges for blood tests are serum V. B_2: 12.8-27.6 μg/dL, plasma α-TP: 17.4-32.7 μmol/L, plasma folic acid: 3.6-12.9 ng/mL. All blood data were within the reference ranges. One of the plasma folic acid data in the α-TP period was hemolyzed, so it was excluded from the data and is not shown in the table.

2.3.6 血漿中 HCY 濃度

血漿中 HCY 濃度は全期で有意に低下した(before versus after supplementation [μmol/L]: $V.B_2$＋α-TP period: 6.4 ± 1.0 versus 4.2 ± 1.1, $p < 0.001$; $V.B_2$ period: 10.1 ± 0.7 versus 8.1 ± 1.0, $p < 0.001$; α-TP period: 8.7 ± 1.1 versus 7.7 ± 1.2, $p < 0.05$; Table 2-11.)。さらに、$V.B_2$＋α-TP 期と α-TP 期の血漿 HCY 濃度の低下量を比較したところ、$V.B_2$＋α-TP 期と α-TP 期の間で有意な血漿 HCY 濃度の低下が認められた（$V.B_2$＋α-TP 期対 α-TP 期：$p < 0.05$；Figure 2-4）。

Table 2-11. Plasma HCY concentrations before and after V.B_2 and/or α-TP supplementation

(n= 11)	V.B_2 + α-TP supplementation		V.B_2 supplementation		α-TP supplementation	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Plasma HCY (μmol/L)	6.4 ± 1.0	4.2 ± 1.1***	10.1 ± 0.7	8.1 ± 1.0***	8.7 ± 1.1	7.7 ± 1.2*

Values represent the mean ± standard deviation of fasting blood samples, taken 14 days each vitamin before and after vitamin supplementation. Number of asterisks in a row indicate significantly different from the respective before supplementation, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

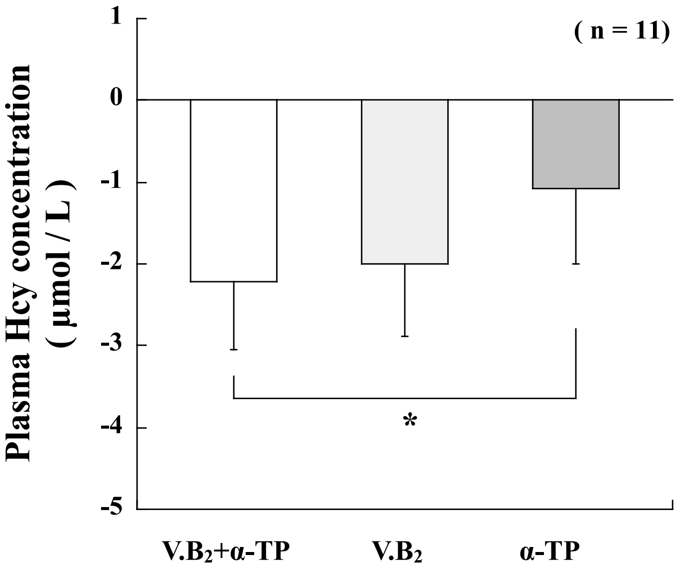


Figure 2-4. Comparison of reduction of plasma HCY concentration after V.B_2 and/or α-TP supplementation There was a significant difference between the V. B_2+α-TP period and the α-TP period. The lowest plasma HCY concentration was in the V. B_2+α-TP period.

第 4 節　考察

本研究は、疲労骨折関連因子である HCY の上昇に関連する C677T の一塩基多型を有する女子陸上長距離選手を対象とした。本研究では、$V.B_2$ と抗酸化物質 α-TP の補給が HCY の血漿レベルに及ぼす効果を報告している。本研究の結果は、$V.B_2$ と α-TP の投与が、血漿 HCY のレベルを減少させ、FAT 障害の一つである疲労骨折を予防する可能性があることを示した。したがって、$V.B_2$ と抗酸化物質である α-TP の補給は疲労骨折のリスク因子軽減を目的とした女子陸上選手の QOL を向上させる可能性がある。

過去 40 年、女性のスポーツ参加率は急激に上昇しており[33]、スポーツに関連する女性の健康問題も憂慮すべきものになっている。特にアスリートは日常的に高強度の運動を行うため、運動によって誘発される酸化ストレスは骨組織にも影響を与える[34]。近年、HCY は骨コラーゲンマトリックスのコラーゲン架橋を阻害し、骨質を低下させ骨折を誘発することから、骨折の独立した危険因子とされている[35]。したがって、アスリートの疲労骨折を予防する方法を確立することが重要である。本研究は、$V.B_2$ と α-TP による血中 HCY 濃度低下効果を評価することを目的としたもので、14 日間の各ビタミン摂取後、すべての期間において血漿 HCY 濃度が有意に低下した。特に各期間の中で $V.B_2$+α-TP 期の血漿 HCY 濃度に最大の低下が認められた。血中 HCY 濃度は HCY 代謝に関与する酵素の活性に影響されることや、HCY 代謝に関与する $V.B_6$、$V.B_{12}$、葉酸を摂取することで血中 HCY 濃度が低下することが示されている[36-38]。特に葉酸は FAD（MTHFR の補因子）と MTHFR の結合を安定化させるようであり[39]、葉酸が良好な状態であれば C677T 多型でも血中 HCY 濃度が上昇しないことも報告されている[40-42]。本研究においても、被験者の葉酸、$V.B_6$、$V.B_{12}$ の摂取量は極めて良好であり、いずれも日本人の食事摂取基準値[32]をはるかに上回る摂取量であった。これらのビタミンが十分に摂取されていても、本研究において $V.B_2$ と α-TP は血漿 HCY 濃度を有意に低下させた。

FAD の前駆体である $V.B_2$ は、血漿 HCY 値に影響を与えることが報告されている[43, 44]。Moat らは、葉酸と $V.B_2$ の摂取が血中 HCY 値を低下させ、$V.B_2$ の低値が血中 HCY 値の上昇と関連していることを報告している[45]。別の研究では、葉酸のステータスが低く、MTHFR T677T 遺伝子型を持つ参加者に限定されている場合でも、$V.B_2$ の補給は HCY 値の低下につながったと報告されている[46]。本研究では、$V.B_2$ の投与が MTHFR C677T の血漿 HCY 濃度を低下させる可能性があると推測し、28mg/d の $V.B_2$ を 14 日間継続投与した結果、MTHFR の触媒活性が活性化したことで血漿 HCY 濃度が低下したと考えた。一方で、1.6mg/d の $V.B_2$ を 12 週間投与しても血中 HCY 値に影響を与えなかったという研究結果が報告されている[18]。したがって、$V.B_2$ の血漿中 HCY 濃度の低減効果を明らかにするためには、MTHFR 遺伝子多型を保有していることが必要であると考えた。MTHFR 遺伝子多型のみを保有していた被験者を対象とした本研究では、$V.B_2$ の効果を明らかにすることができた。

抗酸化作用を持つビタミンは、葉酸の利用効率を高め、HCY のメチオニンへの変換を促進し、細胞内酸化ストレスを軽減させ、血中 HCY 濃度を低下させることが示唆されている[19, 21, 47]。本研究では、α-TP が血漿 HCY 濃度を低下させることを見出した。メタ解析に含まれる V.E 補給研究を対象に実施されたサブグループ解析では血漿 V.E 濃度が 20μmol/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、さらに、血漿 V.E 濃度が 21μmol/L 以上の群に V.E を投与しても血管機能改善の効果は認められなかった[48]。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、抗酸化ビタミンを日常的に充分に摂取していた。しかし、食事で V.E を十分に摂取していたにもかかわらず、血漿 V.E 濃度が補給前の不均一性の境界線である 20uM 未満であったケースもあった。これらの結果から、1 日の食事摂取量の範囲内では、女性アスリートの場合、日々の食事から十分量の V.E を摂取することが難しい可能性があることが示唆された。したがって、1 日の食事に 60mg の α-TP を追加で摂取することで、月間 400km の走行距離で運動を行っている女子陸上長距離選手において、血漿中 α-TP 濃度 20μM 以上を維持することが可能となった。このことから、α-TP の補給は、トレーニング後の酸化ストレス[49, 50]を軽減し、女子陸上長距離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。

本研究では、MTHFR 遺伝子の C677T に CT および TT 型を有する女子陸上長距離競技選手を対象に、$V.B_2$ と α-TP の補給が血中 HCY 濃度に及ぼす影響を評価した。その結果、$V.B_2$（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、$V.B_2$+α-TP 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。$V.B_2$ 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 濃度が低下したと結論づけた。したがって本研究は女子陸上競技長距離選手に $V.B_2$ と α-TP を補給することで疲労骨折を予防できる可能性を示した。本研究の限界点は、C677T の TT 型保有者が少ないため、CT 型および TT 型の比較検討が実施できなかったことである。今後は、C677T 多型のうち、CT 型と TT 型の差異を把握するために、TT 型の被験者数を増やす必要がある。また、本研究において HCY 濃度のベースラインは一致していないが、いずれも基準値内（5-15μmol/L）での変動であった。HCY[51, 52]や骨代謝[53]は女性ホルモンとの関連も示唆されており、被験者の性周期が血漿 HCY 濃度に影響を及ぼした可能性も否定できない。

今後、女性を被験者とした介入試験を行う場合は、性周期について詳細に把握し検討する必要がある。また、本研究の集団は女子陸上長距離選手であるため、BMI の値は、日本肥満学会の定めている「普通体重 BMI 18.5 以上 25 未満」よりも低い値となった。今後は BMI と HCY レベルとの関係も精査することが求められる。本研究では、女子陸上長距離選手の疲労骨折予防に対し、これまであまり注目されていない $V.B_2$ と α-TP の併用摂取という新しい手法を提案することができ、その効果として、C677T の遺伝子多型を保有する女子陸上長距離選手の血漿中 HCY 濃度を低下させた。また、今回の知見は、遺伝子多型を考慮した女子陸上長距離選手の健康管理を行うにあたり、栄養管理支援の開発に向けた科学的根拠の一端を提供する可能性を有している。ただし、選手に必要な栄養素の特定の用量を決定するには、さらなる検討が必要である。

参考文献

[1] The female athlete triad. Med Sci Sports Exerc. 2007;39:1867-1882 doi: 10.1249/mss.0b013e318149f111.

[2] Hame SL, LaFemina JM, McAllister DR, Schaadt GW, Dorey FJ. Fractures in the collegiate athlete. Am J Sports Med. 2004;32:446-451 doi: 10.1177/0363546503261708.

[3] Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of Mineralization-related Collagen Crosslinking in the Femoral Neck Cancellous Bone in Cases of Hip Fracture and Controls. Calcif Tissue Int. 2006;79:160-168 doi: 10.1007/s00223-006-0035-1.

[4] Blouin S, Thaler HW, Korninger C, Schmid R, Hofstaetter JG, Zoehrer R, et al. Bone matrix quality and plasma homocysteine levels. Bone. 2009;44:959-964 doi: 10.1016/j.bone.2008.12.023.

[5] McLean RR, Hannan MT. B vitamins, homocysteine, and bone disease: epidemiology and pathophysiology. Curr Osteoporos Rep. 2007;5:112-119 doi: 10.1007/s11914-007-0026-9.

[6] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. Osteoporos Int. 2010;21:195-214 doi: 10.1007/s00198-009-1066-z.

[7] Saito M, Marumo K, Soshi S, Kida Y, Ushiku C, Shinohara A. Raloxifene ameliorates detrimental enzymatic and nonenzymatic collagen cross-links and bone strength in rabbits with hyperhomocysteinemia. Osteoporos Int. 2010;21:655-666 doi: 10.1007/s00198-009-0980-4.

[8] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. Endocr Rev. 2010;31:266-300 doi: 10.1210/er.2009-0024.

[9] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 1995;10:111-113 doi: 10.1038/ng0595-111.

[10] Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Thromb Haemost. 1997;78:523-526 doi.

[11] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA. 1995;274:1049-1057 doi: 10.1001/jama.1995.03530130055028.

[12] Morita H, Taguchi J-i, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) as a Risk Factor for Coronary Artery Disease. Circulation. 1997;95:2032-2036 doi: doi:10.1161/01.CIR.95.8.2032.

[13] Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, et al. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. Jpn J Hum Genet. 1996;41:247-251 doi: 10.1007/BF01875985.

[14] Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. Neurology. 2000;55:437-440 doi:

10.1212/wnl.55.3.437.
[15] Shiraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao-Koshizuka M, et al. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. J Bone Miner Metab. 2008;26:595-602 doi: 10.1007/s00774-008-0878-9.
[16] Yang J, Hu X, Zhang Q, Cao H, Wang J, Liu B. Homocysteine level and risk of fracture: A meta-analysis and systematic review. Bone. 2012;51:376-382 doi: 10.1016/j.bone.2012.05.024.
[17] Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: Effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. Clin Chem. 2000;46:1065-1071 doi.
[18] McKinley MC, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Scott JM. Effect of riboflavin supplementation on plasma homocysteine in elderly people with low riboflavin status. Eur J Clin Nutr. 2002;56:850-856 doi: 10.1038/sj.ejcn.1601402.
[19] Cafolla A, Dragoni F, Girelli G, Tosti ME, Costante A, De Luca AM, et al. Effect of folic acid and vitamin C supplementation on folate status and homocysteine level: a randomised controlled trial in Italian smoker-blood donors. Atherosclerosis. 2002;163:105-111 doi: 10.1016/s0021-9150(01)00745-6.
[20] Lucock M, Yates Z, Boyd L, Naylor C, Choi JH, Ng X, et al. Vitamin C-related nutrient-nutrient and nutrient-gene interactions that modify folate status. Eur J Nutr. 2013;52:569-582 doi: 10.1007/s00394-012-0359-8.
[21] Bunout D, Garrido A, Suazo M, Kauffman R, Venegas P, de la Maza P, et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. Nutrition. 2000;16:107-110 doi: Doi 10.1016/S0899-9007(99)00248-8.
[22] Breilmann J, Pons-Kuhnemann J, Brunner C, Richter M, Neuhauser-Berthold M. Effect of Antioxidant Vitamins on the Plasma Homocysteine Level in a Free-Living Elderly Population. Ann Nutr Metab. 2011;57:177-182 doi: 10.1159/000321538.
[23] Miki SEKINE KK, Keiko MATSUYA, Ryosuke SUGAHARA, Yuichi MIYAKOSHI, Tomohiro YANO, Masako OTA. Screening Parameters to Evaluate Risk for Stress Fracture in Female Long-Distance Runners. Clinical and functional nutriology. 2015;7:42-46 doi.
[24] Ministry of Health LaWM. Dietary Reference Intakes for Japanese (2015): DAI-ICHI SHUPPAN Co.Ltd.; 2015.
[25] Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. The American Journal of Clinical Nutrition. 1996;63:54-66 doi: 10.1093/ajcn/63.1.54.
[26] Heinonen OP, Koss L, Albanes D, Taylor PR, Hartman AM, Edwards BK, et al. Prostate Cancer and Supplementation With α-Tocopherol and β-Carotene: Incidence and Mortality in a Controlled Trial. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1998;90:440-446 doi: 10.1093/jnci/90.6.440.

[27] Mabile L, Bruckdorfer KR, Rice-Evans C. Moderate supplementation with natural α-tocopherol decreases platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation. Atherosclerosis. 1999;147:177-185 doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00169-0.

[28] 糸川 嘉, 竹内 亨, 西野 幸, 松岡 昌, 大塚 紘. ビタミン製剤経口投与時のビタミンB_1 及び B_2 の血中濃度・尿中排泄. ビタミン. 1989;63:503-511 doi: 10.20632/vso.63.10_503.

[29] 下村 昌, 宮本 裕. ヒトにおける酢酸d-α-トコフェロールの乳化粉末の生物学的利用率の検討. ビタミン. 2008;82:441-447 doi: 10.20632/vso.82.8_441.

[30] Kobayashi S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, Notsu A, et al. Comparison of relative validity of food group intakes estimated by comprehensive and brief-type self-administered diet history questionnaires against 16 d dietary records in Japanese adults. Public Health Nutr. 2011;14:1200-1211 doi: 10.1017/s1368980011000504.

[31] Kobayashi S, Honda S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, et al. Both comprehensive and brief self-administered diet history questionnaires satisfactorily rank nutrient intakes in Japanese adults. J Epidemiol. 2012;22:151-159 doi: 10.2188/jea.je20110075.

[32] Ministry of Health LaW. Dietary Reference Intakes for Japanese (2020): DAI-ICHI SHUPPAN Co.Ltd.; 2020.

[33] Matzkin E, Curry EJ, Whitlock K. Female Athlete Triad: Past, Present, and Future. J Am Acad Orthop Surg. 2015;23:424-432 doi: 10.5435/Jaaos-D-14-00168.

[34] Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. J Sports Sci. 1997;15:353-363 doi: 10.1080/026404197367362.

[35] Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W. Increased Osteoclast Activity in the Presence of Increased Homocysteine Concentrations. Clin Chem. 2005;51:2348-2353 doi: 10.1373/clinchem.2005.053363.

[36] Mashavi M, Hanah R, Boaz M, Gavish D, Matas Z, Fux A, et al. Effect of homocysteine-lowering therapy on arterial elasticity and metabolic parameters in metformin-treated diabetic patients. Atherosclerosis. 2008;199:362-367 doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.037.

[37] Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. N Engl J Med. 2006;354:1567-1577 doi: 10.1056/NEJMoa060900.

[38] Collaboration HLT. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. BMJ (Clinical research ed). 1998;316:894-898 doi.

[39] Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. Nat Struct Biol. 1999;6:359-365 doi: 10.1038/7594.

[40] Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al.

Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Plasma Folate, Homocysteine, and Risk of Myocardial Infarction in US Physicians. Circulation. 1996;94:2410-2416 doi: doi:10.1161/01.CIR.94.10.2410.
[41] Yang QH, Botto LD, Gallagher M, Friedman JM, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. Am J Clin Nutr. 2008;88:232-246 doi: 10.1093/ajcn/88.1.232.
[42] Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. Lancet. 2011;378:584-594 doi: 10.1016/s0140-6736(11)60872-6.
[43] Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. The American Journal of Clinical Nutrition. 2001;73:613-621 doi: 10.1093/ajcn/73.3.613.
[44] Lakshmi R, Lakshmi AV, Bamji MS. Mechanism of impaired skin collagen maturity in riboflavin or pyridoxine deficiency. J Biosci. 1990;15:289-295 doi: 10.1007/BF02702670.
[45] Boehnke C, Reuter U, Flach U, Schuh-Hofer S, Einhäupl KM, Arnold G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. Eur J Neurol. 2004;11:475-477 doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.00813.x.
[46] McNulty H, Dowey LRC, Strain JJ, Dunne A, Ward M, Molloy AM, et al. Riboflavin Lowers Homocysteine in Individuals Homozygous for the MTHFR 677C→T Polymorphism. Circulation. 2006;113:74-80 doi: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.580332.
[47] Magana AA, Reed RL, Koluda R, Miranda CL, Maier CS, Stevens JF. Vitamin C Activates the Folate-Mediated One-Carbon Cycle in C2C12 Myoblasts. Antioxidants (Basel). 2020;9:217 doi: 10.3390/antiox9030217.
[48] Ashor AW, Siervo M, Lara J, Oggioni C, Afshar S, Mathers JC. Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Br J Nutr. 2015;113:1182-1194 doi: 10.1017/s0007114515000227.
[49] Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, et al. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. Am J Physiol. 1993;264:R992-998 doi: 10.1152/ajpregu.1993.264.5.R992.
[50] Sacheck JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. Free Radic Biol Med. 2003;34:1575-1588 doi: 10.1016/s0891-5849(03)00187-4.
[51] Elhadd TA, Neary R, Abdu TA, Kennedy G, Hill A, McLaren M, et al. Influence of the hormonal changes during the normal menstrual cycle in healthy young women on soluble adhesion molecules,

plasma homocysteine, free radical markers and lipoprotein fractions. Int Angiol. 2003;22:222-228 doi.
[52] Michels KA, Wactawski-Wende J, Mills JL, Schliep KC, Gaskins AJ, Yeung EH, et al. Folate, homocysteine and the ovarian cycle among healthy regularly menstruating women. Hum Reprod. 2017;32:1743-1750 doi: 10.1093/humrep/dex233.
[53] 鈴木 な, 相澤 勝, 銘苅 瑛, 朱 美, 村井 文, 向井 直, et al. 月経周期における一過性レジスタンス運動時の骨代謝応答. 体力科学. 2007;56:215-222 doi: 10.7600/jspfsm.56.215.

第 3 章　α-トコフェロール・δ-トコトリエノールの短期摂取による血中動態と脂質代謝および骨代謝改善の検討

第 1 節　緒言

厚生労働省は生活習慣病を「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒などの生活習慣が、その発症・進行に関与する疾患群」と示している。日本人の死因の上位にある心疾患・脳血管疾患は生活習慣病のエンドポイントであるといわれており、これらの疾患は動脈硬化が発症機序の一要因である[1]。血管内皮細胞に障害が起こると、酸化された LDL コレステロールが血管内皮下でプラークを形成し、それが進行すると動脈硬化となる。この時、血管内皮へ傷をつける物質の一つがホモシステイン（HCY）とされている。HCY とタンパク質との結合で酸化ストレスが生じ血管内皮細胞を障害し、血栓形成の要因となる[2-4]。また、骨質の劣化は骨リモデリングとは独立した形で、酸化ストレスが骨コラーゲンに異常をもたらす場合がある[5, 6]。一方、ビタミン E（V.E）は、主に血漿中のリポタンパク質と結合しており、血管壁に取り込まれることで動脈硬化の初期段階での内皮機能障害を防ぐことができる[7]。実際に Suzukawa らは、8 人の健常者に α-トコフェロール（α-TP）を服用させ、LDL だけではなく HDL の被酸化性も低下し、動脈硬化を抑制的に変化させることを明らかにした[8]。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[9]。また、正常動物モデルを用いた研究において、抗酸化作用を有する V. E（α-TP）が骨の健康に有用であることを示した論文は多い[10-12]。さらに、ヒト介入研究では、α-TP が骨粗鬆症の予防に有効的であることが示されている[13-16]。したがって、抗酸化作用を持つ α-TP 摂取は HCY の酸化を防ぎ、動脈硬化や骨粗鬆症を予防し、日本人の死因の上位である心疾患や脳血管疾患を防ぐことに繋がる。この抗酸化作用について V.E の同族体のうち TP よりトコトリエノール（T3）のほうが強く[17]、40 から 60 倍も強力な抗酸化活性があるといわれている[18]。さらに TRF（α-, β-, γ-, δ-T3 の混合）は、コレステロール合成酵素の 3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル補酵素（HMG-CoA）還元酵素を抑制し、体内のコレステロール産生を阻害することが多数報告されている[19-22]。その中でも、特に δ-T3 は α-T3 よりも HMG-CoA 還元酵素への阻害作用が大きく、T3 の中でも血管内皮に対する細胞接着分子の発現を抑制し、単球細胞の接着性を低下させる効果がある[23]。また近年、α-TP と比較し、T3 がフリーラジカルによる骨代謝改善を示し[24]、δ-T3 が高齢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た[25]。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、一貫性がないことが報告されている[26]。これまでに、高血圧患者に δ-T3 を 125 から 750mg/d のレベルで 4 週間摂取した場合の、炎症性マーカー変化に関する報告や[27]、健康なヒトに対する δ-T3 摂取による 10 時間後までの経時的血中 δ-T3 動態の報告[28]、一日当たり 1600mg の δ-T3 を 2 週間にわたり摂取した場合の安全性を証明した報告がある[29]。

しかし、健康なヒトが連続的に δ-T3 を摂取した場合の具体的な血中δ-T3 濃度を示した報告はほとんどない。

動脈硬化や骨粗鬆症など、壮年期以降に発症することの多い疾患は、若年期からの予防が重要である。そこで、本研究では、α-TP よりも抗酸化作用の強い δ-T3 を健康なヒトが摂取した場合のδ-T3 の血中動態を明らかにすることを目的とした。また、α-TP、δ-T3 を摂取した場合の脂質代謝マーカーおよび骨代謝マーカーに及ぼす影響についても検討する。

第 2 節　方法

3.2.1 研究デザイン

本研究は、無作為化、プラセボ対照、単盲検によるクロスオーバー比較試験法を用いた研究デザインである。本研究を実施するにあたり、ヘルシンキ宣言に定められたヒトを対象とした研究に関するガイドラインに準拠して実施され、「東洋大学における人を対象とする医学系研究に関する倫理規程に則り、東洋大学倫理研究委員会（承認番号：TU2019-023　承認日 2019 年 10 月 21 日、承認番号 TU2020-016 承認番号 2020 年 11 月 9 日）の承認を得た。本研究遂行に際し、倫理運営委員会規定に従い、被験者個人の権利を守り、不利益が生じないよう十分に配慮した。被験者全員に本研究目的、内容、本研究のリスク、不快感、有益性、途中離脱に際し不利益がないことを書面および口頭にて説明を行い、被験者の同意を文書にて得た上で実施した。実験期間は 2020 年 1 月から 10 月までの 9 か月で、ビタミン摂取期間 14 日間を 1 期間とし、3 期間実施した。

3.2.2 被験者特性

参加者は 21 名で、すべての実験期間に参加した被験者は男性 6 名、女性 4 名の計 10 名であった。サンプルサイズは $\alpha = 0.05$、検出力＝0.8、効果量は過去の報告の数値から[30, 31]算出した。実験参加者全員の身体特性および Table 3-1 a), b)に示した。

Table 3-1 a). Characteristic of subjects (Male)

ID	Sex	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI
A	M	21	174.4	63.6	20.9
B	M	23	174.8	66.9	21.9
C	M	28	175.2	56.4	18.4
D	M	25	175.8	63.3	20.5
E	M	25	180.4	73.4	22.6
F	M	20	166.3	54.8	19.8
G	M	19	168.7	53.5	18.8
H	M	23	168.7	68.7	24.1
I	M	23	176.0	70.7	22.8
J	M	23	164.6	52.3	19.3
K	M	22	174.2	61.2	20.2
(Mean ± S.D.)		22.9 ± 2.4	172.6 ± 4.6	62.3 ± 6.9	20.8 ± 1.7

Table 3-1 b). Characteristic of subjects (Female)

ID	Sex	Age (yr)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI
L	F	22	163.3	53.3	20.0
M	F	22	160.3	48.8	18.4
N	F	29	160.4	46.9	18.2
O	F	20	155.6	48.5	20.0
P	F	23	151.7	44.9	19.5
Q	F	22	156.3	50.2	20.5
R	F	22	163.2	54.9	20.6
S	F	25	161.5	53.0	20.3
T	F	22	166.4	60.4	21.8
U	F	21	158.0	50.3	20.1
(Mean ± S.D.)		22.8 ± 2.4	159.7 ± 4.1	51.1 ± 4.2	19.9 ± 1.0

3.2.3 実験期間

実験期間のうち、コントロール期 （C 期）・α-TP 摂取期（α-TP 期）・δ-T3 摂取期（δ-T3 期）をそれぞれ 14 日間とし、その前後に採血を実施した。排尿排泄後、身体計測を実施した。身体計測、採血は東洋大学 板倉キャンパス内で実施した。C 期および α-TP、δ-T3 期の間には 28 日以上の wash-out 期間を設けた。実験プロトコルを Figure 3-1 に示した。

(n = 11)	STEP1			Wash-out	STEP2			Wash-out	STEP3		
Days	1	→	15	≧ 28days	1	→	15	≧ 28days	1	→	15
	14days		Next day		14days		Next day		14days		Next day
Collecting blood	○		○		○		○		○		○
Questionnaire			○				○				○
Group 1	Control				α-TP				δ-T3		
Group 2	α-TP				δ-T3				Control		
Group 3	δ-T3				Control				α-TP		

Figure 3-1. Experiment protocol　Subjects were randomly divided into 3 groups. The experimental period was divided into three periods, Steps 1 to 3, a Control period, an α-TP intake period, and a δ-T3 intake period, respectively. Early morning fasting blood was collected in the early morning of the first day of each period and in the early morning of the following day of the last day (CB: Collecting blood). Q: Questionnaire [BDHQ])

3.2.4 被験者の実験期間中の生活

被験者は実験期間中、各自の生活場所で過ごした。食事や飲水は基本的に自由摂取とした。しかし、被験者はC期、α-TP期、δ-T3期およびその前日に関しては、アルコール摂取、過食、過度な運動を避け安静に通常の生活を送った。被験者に喫煙者はいなかった。

3.2.5 サプリメント摂取

ビタミン摂取期間に被験者に摂取してもらうサプリメントは一日当たりα-TP: 268mg/d（Allergy Reseach Group, Vitamin E［d-alpha-tocopherol acid succinicinate］)、δ-T3: 250mg/d（Allergy Research Group, Delta-Fraction Tocotrienols; Tocotrienols ［as DeltaGOLDR containing 90% Delta-Tocotrienols and 10% Gamma-Tocotrienols］）であり、それらは食事摂取基準（2020年版）およびこれまでの先行研究などを考慮した範囲内の量とした[27, 32]。ビタミン摂取期間中、被験者は朝食後、夕食後にサプリメントを1錠（一日当たり2錠）摂取することとした。

3.2.6 試料およびデータ採取

1. 身長および体重

被験者の身長及び体重は体成分分析装置（ボディーコンポジションアナライザー Inbody 770、株式会社インボディ・ジャパン、東京、日本）にて測定した。体重測定に際しては、排尿排泄後、上半身はTシャツ、下半身はトレーニングウエアを着用し測定した。体重測定時には、毎回同じ服装での測定を依頼した。衣服の風袋重量を考慮し、500g を差し引いて測定した。

2. 採血

1） 採取条件

各ビタミン摂取期間の前後およびC期の前後に空腹時採血を行った（Figure 3-1)。各ビタミン摂取開始当日の朝（サプリメント摂取直前）と、摂取終了後の翌日の朝である。被験者は、採血日に学内に設けた採血会場に集合した。およそ12時間絶食の早朝空腹時の採血のため、被験者には朝食の摂食なしの条件で、(水のみ摂取可能)、血液を採取した。血液の採取は上腕の静脈血採取法により実施した。採血は医師の指示および監督のもと、採血業者（医療法人クレモナ会 TMクリニック、一般社団法人 日本健康倶楽部）に依頼し、看護師および臨床検査技師により被験者の採血が実施された。

2） 血液保管

試料を採取する採血管は生化学管と EDTA-２K 管を用意した。事前に採血管には ID を記し試料に混合がないようにした。一回の採血量は 20mL/人以下とした。通常の健康診断および献血量から鑑みて、採血量は少量であり適切量である。採血後に静置した採血管を遠心機（As one Hsiang Tai Centrifuge、アズワン株式会社、大阪、日本）で 3000rpm・10 分間遠心分離し、血漿および血球、血清および血球に分離した。採血当日中に、学内で分析する血漿・血清を 1.5mL チューブにそれぞれ分注し、分析まで-80℃で保管した（SANYO ULTRA LOW、三洋電機株式会社、大阪、日本）。

3. 食事記録

C 期、α-TP 期、δ-T3 期の食事記録を自記式食事歴法質問票（BDHQ：brief-type self-administered diet history questionnaire）で調査し、栄養素や食品摂取状況を把握した。BDHQ のデータ分析について、DHQ サポートセンターに依頼した。BDHQ は類似の質問票とほぼ同じか、またはわずかに高い妥当性を持つ食事摂取量の質問票として信頼性が高い[33, 34]。

3.2.7 血液分析

1. 測定項目

測定項目は、α-TP、δ-T3、ホモシステイン（HCY）、クレアチニン（Cre）、総コレステロール（T-Cho）、中性脂肪（TG）、遊離コレステロール（F-Cho）、HDL-コレステロール（HDL）、LDL-コレステロール（LDL）、I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド（NTx）、I型プロコラーゲン-N-プロペプチド（total P1NP）であった。

2. 測定方法

分析項目のうち、Cre（酵素法）、T-Cho（酵素法）、TG（酵素法）、F-Cho（酵素法）、HDL（酵素法-直接法）、LDL（酵素法-直接法）、NTx（EIA 法）、total P1NP（ELISA 法）は株式会社 LSI メディエンスに業務委託し、分析測定した。α-TP、δ-T3、HCY はそれぞれ学内にて液体クロマトグラフィー：High performance liquid chromatography（HPLC）で分析測定した。

3.2.8 HPLC 法による血漿 α-TP、δ-T3 の測定

1. 血漿 α-TP、δ-T3 サンプル作成

血漿 100μL に 100% Ethanol を 390μL、内部標準の 100μM dl-トコール 100mg（Tocol タマ生化学株式会社、東京、日本）を 10μL 加え、遠心分離（4℃、15.000 rpm、15min）した。遠心分離後に上清を 1mL 容シリンジで採取し、0.2μm フィルターを通して新しい 1.5mL チ

ューブに移した。沈殿物は廃棄した。その後、チューブ内が半量（約 250µL）になるまで、濃縮遠心機にて揮発させた。その後 HPLC 用バイアルに 100µL 分注し、アルゴン置換した。それを血漿 V.E サンプルとした。

2. α-TP、δ-T3 測定用移動相の作成

HPLC 用 Methanol と MilliQ にて 90% Methanol を作成し、移動相とした。

3. 標準試薬調製および HPLC 分析条件

1） α-TP、δ-T3 標準試薬の調製

標準試薬にはビタミン E 定量用標準試薬（三菱ケミカルフーズ株式会社、東京、日本）の、*d*-α-トコフェロール 250mg、*d*-δ-トコトリエノール 100mg（タマ生化学株式会社、東京、日本）、dl-トコール 100mg を用いた。α-TP、δ-T3 分析用スタンダードは Table 2-7 示すように 0、10、20、30、40、50、100µM の 7 種類に調製し検量線に用いた。標準試薬の調製を Table 3-2a), b) に示した。

Table 3-2 a). 100μM Standard preparation for analyzing plasma vitamin E by HPLC

100μM α-Tocopherol and δ-Tocotrienol Mixed liquid and Internal standard preparation				
Step	Procedure	Standard reagent		Internal Standard
		α-Tocopherol	δ-Tocotrienol	Tocol
1	Weighed out	5.00mg	4.00mg	4.00mg
2	Add 100% Ethanol 1000μL to each tocopherol and tocol in each tube.			
3	Agitation (concentration/Volume)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)	(10mM /1000μL)
4	dispensing	200μL	200μL	100μL
5	Mix each 200μLα-tocopherol and δ-tocotrienol add 600μL of 100% methanol in a new 1.5 mL tube			Add 100% Ethanol 900mL in a new 1.5 mL tube
6	Agitation (concentration/Volume)	α -Tocopherol and δ-Tocotrienol Mixed liquid (2mM/1000μL)		(1mM/1000μL)
7	Dispensing	100μL to new 1.5mL tube		100μL to new 1.5mL tube
8	Add 100% Ethanol 900μL to each tocopherol and tocol in each step #7 tube			
9	Agitation (concentration/Volume)	α -Tocopherol and δ-Tocotrienol Mixed liquid Mixed liquid (200μL/1000μL)		(100μM/1000μL)
10	Dispensing	500μL to new 1.5mL tube		↓
11	Add 100% Ethanol 500μL to step #10 tube			↓
12	Agitation (concentration/Volume)	α, β, γ, δ-Tocopherol Mixed liquid (100μM/1000μL)		↓
13	Complete			

Table 3-2 b). 0 to100μM Standard preparation for analyzing plasma vitamin E by HPLC

	0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μM Standard samples							
Step	Procedure	Standard concentrations						
		Std_0μM	Std_10μM	Std_20μM	Std_30μM	Std_40μM	Std_50μM	Std_100μM
1	Dispensing from a) #12 to each new tube		100μL	100μL	150μL	200μL	200μL	
2	Add 100% Ethanol		900μL	400μL	350μL	300μL	200μL	
3	Agitation		(10μM/500μL)	(20μM/500μL)	(30μM/500μL)	(40μM/500μL)	(50μM/500μL)	
4	Dispensing from b)#3 to each new tube		100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	Dispensing 100μL from a)#12 to a new tube
5	Add 10μL from 100μM Tocol (#9) to each standard concentration tube (#16)							
6	Add 100% Ethanol	490μL	390μL	390μL	390μL	390μL	390μL	390μL
7	Agitation							
8	Concentrate to about half by centrifugal concentrator (Tomy, Micro Vac TM MV-100, Tomy medico co., LID)							
9	Dispense 100μL into a vial for HPCL.							
10	completion	Std_0μM	Std_10μM	Std_20μM	Std_30μM	Std_40μM	Std_50μM	Std_100μM

2）HPLC の α-TP、δ-T3 分析条件

血清サンプルは HPLC（JASCO Corporation, Tokyo, Japan）を用いて分析した。HPLC による血漿 α-TP、δ-T3 分析の条件を Table 3-3 に示した。また、クロマトグラム上の HCY のピークを Figure 3-2 に示した。

Table 3-3. Conditions for plasma V.E analysis by HPLC

Items	Equipment, Reagents and conditions
Pump	EP-700（LIQUID CHROMATOGRAPH PUMP/Eicom）
Auto sampler	AS-4050（Jasco）
Detector	FP-2025 Plus Intelligent Fluorescence Detector　（Jasco）
Pre-column	Eicom PC-04 4.0mmφ×5mm
Column	COSMOSIL Packed column 5PFP 4.6mm I.D.×250 mm
Column temperature	40 ℃
Wave length	EX 292 nm/EM 325 nm
Buffer	Methanol：MilliQ（v/v）＝9：1
Flow rate	700 µL/min
Injection volume	20 µL

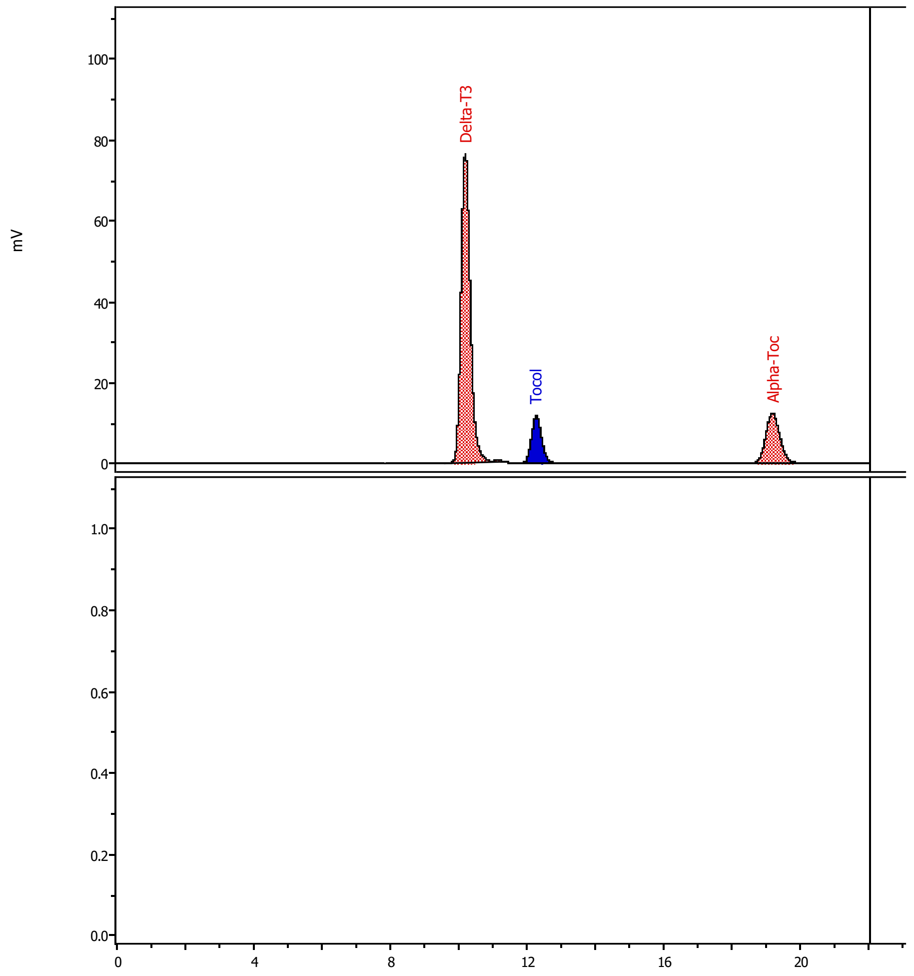


Figure 3-2. Separation of α-TP and δ-T3 in Human Plasma by HPLC

This is a chromatogram of a standard reagent used when α-TP and δ-T3 of human serum was analyzed by the HPLC method. The tocol appears around 12 minutes, δ-T3 appears around10 minutes, and α-TP appears around 19 minutes.

3.2.9 HPLC 法による血漿 HCY の測定

1. 血漿 HCY サンプル作成

25µL の血漿サンプルを 1.5mL チューブに移し、0.3M PBS（pH7.4）を 205µL、10µM NAC: N-Acetyl-L-cysteine（Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan）を 25µ 添加し攪拌した。次に、60mM TCEP: Tris（2-carboxyethl） phosphine Hydrochloride （NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan）を 10µL 添加し、攪拌後、震盪器にて室温に 30 分放置した。この際、スタンダードは遮光した。さらに、1mM EDTA-2Na（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を含む 100g/L TAC: Trichloroacetic acid（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を 90µL 添加し、攪拌後に遠心分離を実施した（20°C、13000 G、10min）。上清 90µL をオートサンプラー用バイアルに移し、1.55M NaOH を 7.5µL 添加後に再度攪拌した。これを HPLC 用分析サンプルとした。

2. HCY 測定用移動相作成

MillQ 1000mL に対し NaH_2PO_4 を 12g 入れ攪拌した。2 倍に希釈した Phosphoric Acid を添加し、pH2.5 のリン酸溶液を作成した。その後、10%Methanol 10mL、SOS: sodium dihydrogen phosphate anhydrous（Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan）170mg、EDTA-2Na 5mg を加えた。気泡の発生を避けるためオーバーナイト後に使用した。

3. HCY の標準試薬調製および HPLC 分析条件

1）HCY 標準試薬の調製

HCY の分析用スタンダードおよび 10µM NAC は Table 3-4、Table 3-5 に示すように作成した。作成後は遮光保存した。検量線には 0、1、3、15、30 µM を用いた。0.3 M PBS は PBS を 3 mL と MilliQ を 7 mL 合わせた。60 mM TCEP は TCEP を 0.0172 g と MilliQ を 1 mL 合わせた。100 g/L　TCA（1 mM EDTA-2Na を含む）を 2.0 g、EDTA-2Na 0.0074 g を MilliQ で 20 mL にメスアップした。1.55 M NaOH は NaOH を 0.6200 g と MilliQ を 10 mL 合わせた。

Table 3-4. Preparation of Standard samples

Standard Tubes	Concentrations	DL-Homocysteine	MilliQ (μL)
#1	＜10-1 M＞	0.0135 g	1000
#2	＜10-2 M＞	100 μL of Tube#1	900
#3	＜10-4 M＞	10 μL of Tube#2	990
#4	＜30 μM＞	300 μL of Tube#3	700
#5	＜15 μM＞	400 μL of Tube#4	400
#6	＜3 μM＞	200 μL of Tube#5	800
#7	＜1 μM＞	250 μL of Tube#6	500

Seven concentrations of tubes were prepared as standard reagents. 0.0135 g of homocysteine was weighed into standard tube # 1, 1000 μL of MillQ was added, and then standard reagents of each concentration was diluted from the previous standard tube and prepared.

Table 3-5. Preparation of 10 μL NAC

Standard Tubes	Concentrations	NAC	MilliQ (μL)
#1	＜10-1 M＞	0.0163 g	1000
#2	＜10-3 M＞	10 μL of Tube#1	990
#3	＜10-4 M＞	10 μL of Tube#2	990

Three concentrations of tubes were prepared as standard reagents. 0.0163 g of NAC was weighed into standard tube # 1, 1000 μL of MillQ was added, and then standard reagents of each concentration was diluted from the previous standard tube and prepared.

2）HPLC の HCY 分析条件

血清サンプルは HPLC（JASCO Corporation, Tokyo, Japan）を用いて分析した。HPLC による血漿 HCY 分析の条件を Table 3-6 に示した。また、クロマトグラム上の HCY のピークを Figure3-3 に示した。

Table 3-6. Conditions for plasma HCY analysis by HPLC

Items	Equipment, Reagents and conditions
Pump	EP-700（LIQUID CHROMATOGRAPH PUMP/Eicom）
Auto sampler	M-514（Eicom）
Detector	Eicom ECD-700
Working electrode	Eicom WE-AU
Pre-column	Eicom PC-04 4.0mmφ×5mm
Column	Eicom-3ODS（3.0 φ×150 mm）
Column temperature	25 ℃
Buffer	99 % 0.1 M Sodium phosphate buffer（pH2.5）,1 % Methanol, 170 mg/L Sodium Octansulfornate, 5 mg/L EDTA-2Na
Flow rate	500 µL/min
Injection volume	10 µL

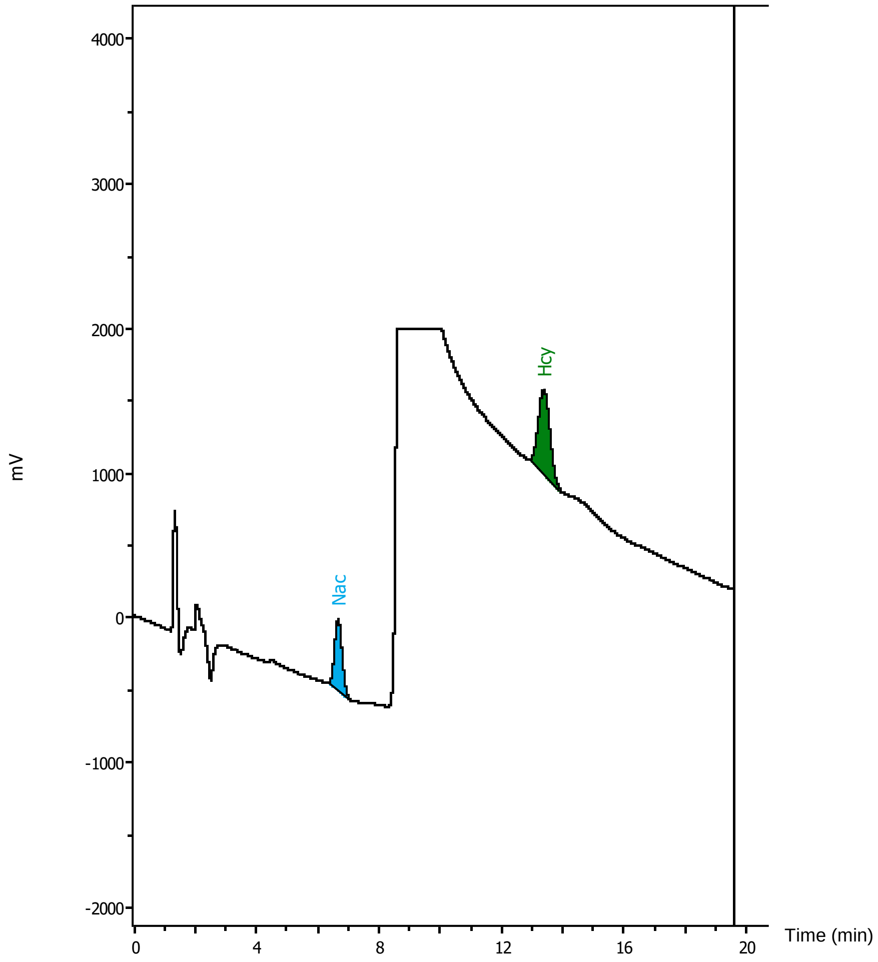


Figure 3-3. Separation of Homocysteine in Human Plasma by HPLC

This is a chromatogram of a standard reagent used when HCY of human serum was analyzed by the HPLC method. The NAC appears around 7 minutes and the HCY appears around 13 minutes.

3.2.10 統計解析

得られたデータは統計ソフト SPSS（Statistical Packed for the Social Ver. 26）を用い統計解析をおこなった。数値は平均 ± 標準偏差（Mean ± S.D.）で示した。介入試験の前後比較は、正規性の検定（Shapiro-Wilk）を実施後、正規性が確認されたものは対応のある t-test を、正規性が認められなかったものには Wilcoxon の符号付き順位検定を行った。濃度変化量については、正規性の検定（Shapiro-Wilk）実施後に有意確率の結果から、一元配置分散分析（kruskal-wallis 検定 一元配置のノンパラメトリック）を行った。検定はすべて両側検定で、有意水準は５％未満とした。

第 3 節　結果

3.3.1 身体特性

各期間の被験者の身長・体重の変化を示した（Table 3-7）。すべての期間に参加できた被験者は男性 6 名、女性 4 名で、各期間の前後および 3 期間のいずれの間にも有意な変動はなかった。被験者の BMI は日本肥満学会が定めている 18.5 以上 25 未満の「普通体重」の範囲内であった。

Table 3-7. Weight and Height change of subjects

(n= 10)	Control		α-TP		δ-T3	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Height (cm)	169.3 ± 8.0	169.4 ± 8.1	169.5 ± 8.1	169.5 ± 8.1	169.4 ± 8.2	169.5 ± 8.2
Weight (kg)	58.9 ± 9.8	58.8 ± 10.1	59.4 ± 9.7	59.2 ± 10.2	59.3 ± 10.2	59.2 ± 10.3
BMI	20.4 ± 2.0	20.3 ± 2.1	20.6 ± 2.1	20.5 ± 2.2	20.5 ± 2.2	20.5 ± 2.2

3.3.2 食事記録調査

被験者の摂取エネルギー量は、C 期、α-TP 期、δ-T3 期において 1861±769kcal、1812±441 kcal、1947 ± 487 kcal で PFC 比率はすべての期間において、P：13~20%、F: 20~30%、C：50~65%の範囲内であった。V.E の摂取量は、推奨量（RDA）の数値を満たしていた[35]。V.E の摂取量は、α-TP、δ-T3 サプリメントの摂取量は含んでいない。脂質代謝や骨組織、HCY に関連する栄養素は、いずれの期間でも有意な差は認められなかった。エネルギー摂取量、栄養素摂取量について Table 3-8 に示した。

Table 3-8. Dietary energy and nutrition intake

	Calculated values (Mean ± S.D.) (n= 10)				
	Control	α-TP	δ-T3	DRIs	
Energy (kcal)	1861 ± 769	1812 ± 441	1947 ± 487	M) 2650 F) 2000	
Protein (%)	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 3	13~20%	PFC energy ratio
Lipid (%)	28 ± 6	29 ± 6	28 ± 8	20~30%	
Carbo (%)	56 ± 6	55 ± 6.5	54 ± 9.5	50~65%	
n-3 (g)	2.2 ± 1.2	2.1 ± 0.5	2.2 ± 0.9	M) 2.0 F) 1.6	AI
n-6 (g)	11.6 ± 6.3	10.5 ± 2.7	11.5 ±4.3	M) 11 F) 8	AI
Cholesterol (mg)	277 ± 135	277 ±120	338 ± 150	----------	
Fiber (g)	10.4 ± 6.1	9.3 ± 2.7	9.9 ± 3.8	M) 21 F) 18	DG
Na (mg)	4196 ± 1957	3468 ± 1391	3975 ± 1694	M) 3000↓ F) 2600↓	DG
Ca (mg)	383 ± 177	375 ± 136	429 ± 163	M) 800 F) 650	RDA
Mg (mg)	205 ± 88	197 ± 60	204 ± 60	M) 340 F) 270	RDA
P (mg)	848 ± 383	863 ± 269	922 ± 259	M) 1000 F) 800	AI
Zn (mg)	8 ± 3	8 ± 2	8 ± 2	M) 11 F) 8	RDA
V.B2 (mg)	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.3	M) 1.6 F) 1.2	RDA
V.B6 (mg)	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	M) 1.4 F) 1.1	RDA
V.B12 (μg)	4.8 ± 2.2	5.6 ± 2.0	5.4 ± 1.6	2.4	RDA
Folate (μg)	200 ± 100	207 ± 81	202 ± 67	240	RDA
V.D (μg)	5 ± 3	5 ± 2	6 ± 3	8.5	AI
V.E (mg)	6.5 ± 4.0	6.2 ± 2.2	6.6 ± 2.6	5~6	
----------------				-------------	RDA
Male (n= 6)	3.5 ± 1.9	3.2 ± 1.3	3.3 ± 1.3	2.26	(mg/1,000 kcal)
Female (n= 4)	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.7	3.5 ± 0.6	2.5	

3.3.3 血液項目

1. 血漿 α-TP、δ-T3 の変化

各期間の血液項目において、α-TP 摂取により、血漿 α-TP 濃度は、15.7 ± 2.7 μmol/L から 31.8 ± 9.6μmol/L に有意に増加し（$p < 0.001$）、さらに、血漿 δ-T3 濃度も 0.09 ± 0.02 μmol/L から 0.15 ±0.05 μmol/L に有意な増加が認められた（$p < 0.01$）。δ-T3 摂取により、血漿 δ-T3 濃度は 0.11 ± 0.03 μmol/L から 0.40 ± 0.19μmol/L に有意に増加した（$p < 0.01$）。サプリメント摂取の前後差の数値において、血漿 α-TP 濃度は、α-TP 期（16.1 ± 7.1 μmol/L）と C 期（0.4 ± 5.5μmol/L）および δ-T3 期（- 0.4 ± 3.1 μmol/L）と比較し、それぞれ有意な差が認められた（$p<0.001$, $p<0.001$）。また、血漿 δ-T3 濃度の変化量も、δ-T3 期（0.29 ± 0.19 μmol/L）と、C 期（0.00 ± 0.06μmol/L）および α-TP 期（0.06 ± 0.04 μmol/L）と比較し、それぞれ有意な差が認められた（$p<0.001$, $p<0.01$）。結果を Table 3-9 に示した。

Table 3-9. Comparison of variations of concentration in blood analysis items. after α-Tocopherol and δ-Tocotrienol supplementation

(n= 10)	Control	α-Tocopherol (α-TP)	δ-Tocotrienol (δ-T3)	Standard value
Plasma α-TP (μmol/L)				
Pre	15.6 ± 2.8	15.7 ± 2.7	17.2 ± 3.0	17.4 to 32.7
Post	16.0 ± 5.4	31.8 ± 9.6[a]	16.7 ±3.5	
Variations	0.4 ± 5.5	16.1 ± 7.1[c]	- 0.5 ± 3.3	
Plasma δ-T3 (μmol/L)				
Pre	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03	
Post	0.10 ± 0.05	0.15 ±0.05[b]	0.40 ± 0.19[b]	
Variations	0.00 ± 0.06	0.06 ± 0.04	0.29 ± 0.19 [d]	

The table shows changes and increases / decreases in blood items due to supplement intake. In addition, a comparative study of pre and post by supplement intake and a comparison between the three groups were shown. Those with significant differences are shown using the following alphabet. a: Significant difference was observed before and after supplement intake ($p < 0.001$), b: Significant difference was observed before and after supplement intake ($p < 0.01$), c: Significant difference was observed in comparison with C period and δ-T3 period ($p<0.001$). d: Significant difference was observed in comparison with C period and α-TP period ($p<0.001$, $p<0.01$).

２. 脂質代謝に関する項目

各期間の血液項目において、α-TP 摂取により、総コレステロール濃度は、171 ± 31 mg/dL から 181 ± 26 mg/dL に有意に増加し（$p < 0.05$）、さらに、LDL 濃度も 95 ± 23 µmol/L から 101 ± 23 µmol/L に有意な増加が認められた（$p < 0.05$）。また、δ-T3 摂取により HDL の上昇傾向を確認した（$p = 0.063$）。結果を Table 3-10 に示す。

3. 骨代謝に関する項目

各期間の血液項目について、いずれも有意な差は認められなかった（Table 3-11）。

Table 3-10. Comparison of changes in blood lipid items after supplementation of α-tocopherol and δ-tocotrienol.

(n= 10)	Control	α-Tocopherol (α-TP)	δ-Tocotrienol (δ-T3)	Standard value
Total-cho (mg/dL)				
Pre	175 ± 26	171 ± 31	176 ± 30	120 to 219
Post	180 ± 32	181 ± 26[a]	179 ± 30	
Variations	5.2 ± 19.8	10.8 ± 11.9	2.8 ± 10.9	
TG (mg/dL)				
Pre	60 ± 19	62 ± 29	76 ± 25	30 to 149
Post	62 ± 22	71 ± 29	69 ± 29	
Variations	2.5 ± 18.0	9.9 ± 15.3	- 6.8 ± 22.9	
F-cho (mg/dL)				
Pre	43 ± 7	41 ± 8	42 ± 7	34 to 66
Post	42 ± 8	43 ± 7	44 ± 8	
Variations	-0.2 ± 3.9	1.9 ± 2.9	1.7 ± 3.5	
HDL (mg/dL)				
Pre	61 ± 17	60 ± 16	59 ± 17	M 40 to 85
Post	64 ± 16	63 ± 15	64 ± 20	F 40 to 95
Variations	2.7 ± 4.0	2.5 ± 5.8	4.3 ± 6.4	
LDL (mg/dL)				
Pre	98 ± 16	95 ± 23	98 ± 21	65 to 139
Post	101 ± 24	101 ± 23[a]	101 ± 18	
Variations	2.8 ± 16.3	6.6 ± 9.0	2.7 ± 10.1	

The table shows changes and increases / decreases in blood items due to supplement intake. In addition, a comparative study of pre and post by supplement intake and a comparison between the three groups were shown. Those with significant differences are shown using the following alphabet.

a: Significant difference was observed before and after supplement intake ($p < 0.05$).

Table 3-11. Comparison of changes in blood lipid items after supplementation of α-tocopherol and δ-tocotrienol.

(n= 10)	Control	α-Tocopherol (α-TP)	δ-Tocotrienol (δ-T3)	Standard value
HCY (μmol/L)				
Pre	9.9 ± 2.6	10.7 ± 2.9	10.8 ± 3.7	M 7.0 to 17.8
Post	10.1 ± 3.1	10.7 ± 3.1	11.2 ± 4.2	F 5.3 to 15.2
Variations	0.3 ± 1.5	0.0 ± 1.7	0.4 ± 2.0	
NTx (nM BCE/L)				
Pre	22.3 ± 5.4	22.1 ± 5.3	22.3 ± 5.3	M 9.5 to 17.7
Post	21.7 ± 4.8	21.1 ± 5.8	21.7 ± 6.5	F 7.5 to 16.5
Variations	- 0.7 ± 2.9	- 1.0 ± 2.5	- 0.6 ± 2.5	
Total P1NP (ng/mL)				
Pre	67.1 ± 35.4	66.4 ± 18.9	64.2 ± 24.2	M 18.1 to 74.1
Post	68.0 ± 32.1	60.8 ± 22.3	62.2 ± 25.6	F 16.8t o 70.1
Variations	0.9 ± 8.1	- 5.7 ± 8.7	- 2.0 ± 8.6	

The table shows changes and increases / decreases in blood items due to supplement intake. In addition, a comparative study of pre and post by supplement intake and a comparison between the three groups were shown. There is no significant difference.

第4節　考察

3.4.1 α-TP および δ-T3 摂取による血中動態について

本研究では、δ-T3 を健康なヒト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研究を実施した。δ-T3 摂取により、血漿 δ-T3 濃度は 14 日間の δ-T3 の短期摂取で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 摂取により、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。それは、T3 よりも α-TP の方が肝臓の α-トコフェロール転移タンパク質（αTTP）への親和性が高く、その結果、α-TP が血流に優先的に放出され、T3 の分泌が抑制されていることに起因することや[36]、T3 が TP に変換されるためである[37]。実際に、健康なボランティアに 300mg の混合 T3（α-T3 29%、γ-T3 55%、δ-T3 14%）を経口投与した場合の α-T3、γ-T3、δ-T3 の平均見かけ上の排泄半減期（T1/2）値はそれぞれ 4.4、4.3、2.3 時間であり、α-TP の 4.5～8.7 倍の短さである[38]。しかしながら、本研究では 250mg/d の 1 日 2 回の複数回摂取で摂取前の約 4 倍（0.40±0.19μmol/L）増加させた。これまでに、δ-T3 を摂取させた場合の血中 δ-T3 濃度が示された報告はいくつかあるが、いずれも、摂取後の数値に大きなばらつきがみられる。36 人の男性（21-30 歳）に T3 混合サプリメントを 320 mg/d を（δ-T3 として 50mg/d)、2 か月間投与したところ、血中 δ-T3 濃度は約 100ng/dL 増加した（0.25μmol/L）[39]。また、250mg の δ-T3 サプリメントを高コレステロール症の被験者に 8 週間摂取させた研究ではプラセボと比較し、δ-T3 の血中濃度は 0.096 ± 0.068μmol/L 増加した[30]。さらに、閉経後の女性に 12 週間 300mg あるいは 600mg の δ-T3 を摂取させた結果では、12 週間後の血中 δ-T3 レベルはいずれの摂取量の場合も、血中 δ-T3 濃度は 3μmol/L 前後の値を示し[40]、δ-T3 の血中レベルは摂取量に依存しないことが示唆された。高用量の T3 摂取では T3 が TP に変化し、HMG-CoA 還元酵素の活性を誘導し、コレステロールを上昇させると言われているため[41]、δ-T3 の血中レベル維持には、摂取期間や摂取量だけではなく、一日の摂取回数に影響を受けている可能性がある[29, 38, 42]。

これまでに、高コレステロール血症患者に AHA 食とともに、段階的に 125, 250, 500,750 mg/d の δ-T3 を 4 週間ごとに摂取させた結果、250mg/d の δ-T3 摂取が最も血中の LDL を低下させた[43]。さらに、4 段階（125, 250, 500, 750mg/d）の δ-T3 を 4 週間にわたり投与すると、250 mg/d の投与量が、最も酸化ストレスパラメーターの低下に最も効果的であり、心血管疾患に関連する炎症性バイオマーカー（レジスチン、IL-1α、IL-12、FGF-b、PDGF）を低下させた[27]。本研究での 14 日間の δ-T3（250mg/d）摂取はヒト体内において、酸化ストレスマーカー低下や炎症性サイトカインの抑制作用が発動していた可能性がある。今後は、δ-T3 を摂取した場合の血中 δ-T3 濃度と共に、δ -T3 上昇に関連する因子の定量が求められる。

α-TP 摂取は多くの研究で実施され、その効果はがん疾患、心疾患、脳・神経疾患、免疫系、肝臓疾患、運動機能改善と幅広い[44, 45]。本研究においては、α-TP を 268mg（400IU）摂取した結果、摂取前と比較して約 2 倍（Pre:15.7 ± 2.7 to Post: 31.8 ± 9.6μmol/L, Variations:

16.1±7.1μmol 増加）の濃度に増加した。これまでに、健康な男女 45 名に、400IU/d を 2 か月投与した結果、血中の α-TP 濃度はベースラインと比較し、15.0±2.2μmol/L 増加した[46]。また、喫煙者ではあるが、64 名の男性に、400IU の α-TP を 2 年間摂取させたところ 5.48 ± 1.33 mg/g LDL protein から 10.65 ± 3.37 mg/g LDL protein と有意に 2 倍の増加を認めた[31]。さらに、男女 36 人に α-TP を 8 週間、400IU 摂取させたところ、22.7 ± 4.8μmol/L から 35.1 ± 5.95μmol/L の有意な増加を示した[47]。これまでに分かっている最も短期である 400IU/d の 3 週間の α-TP を摂取した研究[48]では、摂取 3 週間後の対象群の α-TP 濃度が 21.5±2.7μmol/L であるのに対し、α-TP 負荷群は 33.9 ±2.9μmol/L であった。これらの血中 α-TP 濃度の数値は、本研究の 14 日間、268mg/d の α-TP 摂取と同レベルの数値、増加量である。つまり、本研究では、α-TP の 14 日間の摂取で、これらの研究の血中レベルと同レベルまで到達することを明らかにした。また、LDL 酸化に関する研究における V.E 補給の効果は 1 日 400IU（268mg）の用量で最大に近づくことが示唆されている[8, 49]。400IU の摂取で、介入終了時に血中 α-TP 濃度が 30μmol/L から 40μmol/L 付近であった研究は、血管内皮の酸化からの保護作用[47]、LDL 酸化のラグタイムの延伸[48]、腎機能改善[50]といった効果が示された。したがって、一日当たり 268mg の α-TP 摂取は、14 日間の短期摂取であっても、同等の効果を示す可能性が示唆された。また、α-TP 摂取により、δ-T3 の有意な増加があった。これは今までに報告されていない結果である。血漿 TP、T3 濃度に影響を与えるのは、投与量だけではなく、腸管腔内における溶解度が吸収の主な決定要因とされている[51, 52]。また、α-TP 輸送タンパク質（α-TTP）の T3 に対する親和性は低いといわれてきたが、最近、α-T3 は非 α-TTP 依存経路を介して吸収される可能性があると推測されている[53]。そのため、δ-T3 も α-T3 と同様に非 αTTP 依存経路を介している可能性がある。したがって、本研究において、α-TP の摂取で δ-T3 が増加した原因を解明することはできないが、腸管内での溶解率や、生体内での脂肪細胞などにおける蓄積量などが関与したと考えた。

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 濃度を示したことである。また、α-TP においても、4 週間以上の摂取と同レベルの血中 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。また、δ-TP や α-TP の健康なヒトを対象とした介入研究において、有用な基礎的データとなる。

3.4.2 α-TP、δ-T3 による血中脂質代謝の影響

1) α-TP と脂質代謝

本研究の次の目的は、α-TP、δ-T3 の血中脂質項目への影響を検討することであった。若年男女が 268mg（400IU）/d の α-TP を連続 14 日間摂取した結果 Total-cho、LDL に有意な増加がみられた（$p < 0.05$）。これまで、抗酸化ビタミンの摂取量増加に対し、虚血性心疾患の

低下や、虚血性心疾患の発生件数を減少させることが、疫学研究[54-56]やヒト試験で明らかにされてきた[21]。また、血液透析患者に 120 日間 α-TP を 400IU/d 補給させた場合に、有意に LDL レベルが低下し[57]、さらに 8 週間にわたる 400IU/d の α-TP 投与群では、LDL の酸化感受性の低下が認められ、LDL 酸化感受性低下に必要な最低限の α-TP は 400IU であることが示されている[32]。したがって、本研究においても、α-TP を 268mg（400IU）摂取することによる、脂質項目の低下を期待し検討を行った。結果は、α-TP 摂取期に LDL 濃度がサプリメント摂取前（Pre）の 95±23mg/dL から摂取後（Post）101±23mg/dL に有意に増加した。しかし、C 期および δ-T3 期の Post の LDL 濃度の値も、101 ± 24 mg/dL, 101± 18 mg/dL と α-TP 摂取期の Post の値とほぼ差がない。つまり、α-TP 摂取により LDL 濃度が増加したとは考えにくい。総コレステロール濃度にも同様に α-TP 摂取期に Pre と Post で有意な増加が認められたが（$p < 0.05$）、総コレステロールは LDL と TG と HDL の値から換算されるため、それらの値の増加による影響を受けたことが考えられた。血液中の LDL や TG はエネルギー摂取量や食物繊維[58, 59]、n-3 系脂肪酸[60]の摂取量に影響を受けることが知られている。本研究では各期間に被験者が摂取したエネルギーおよび栄養素の平均値に有意な差はなかった。したがって、脂質項目は前日の食事の影響を受けた可能性がある。一般的に早朝空腹時採血は絶食 10～14 時間後の採血のことを指し、本研究においても、被験者は早朝空腹時採血のおよそ 12 時間前に夕食を済ませていた。しかし、脂質項目のなかでも特に TG は食事の影響を受けやすく、食後 9 時間であっても空腹時の TG の値より高い報告もある[61]。したがって、早朝空腹時採血を実施するにあたって、早朝採血より 12 時間以上前に夕食を済ませることを絶対条件とする必要性が示唆された。

また、V.E はリポタンパク質と共に全身に運ばれるが、V.E を充足させると、マクロファージによる LDL 取り込みが抑制されたとする報告もある[62]。さらに、V.E により脂肪組織から放出されるコレステロール輸送活性（CETA）の量が減少し、血漿中 CETP 活性は低下するため、*in vivo* で連続的な高脂肪食摂取において血漿 HDL は上昇し、LDL は低下を示した[63]。これらのことから、α-TP の脂質低下作用は、継続した高い脂質摂取時に有効に作用する可能性がある。本研究の被験者はいずれも PFC 比率は基準値内であったことから、α-TP の LDL 低下作用がみられなかった可能性がある。さらに α-TP は LDL や HDL を抗酸化するため[8, 64-66]、LDL を酸化変性から防御することにより動脈硬化への初期段階を制御することにつながる。しかし、LDL 酸化はフリーラジカルだけでなく、他の非ラジカル酸化物質を介した複数の経路で進行し、V.E はフリーラジカルを介した酸化に対してのみ有効であることが考えられていることから、未だヒトでの V.E の LDL への抗酸化作用に一貫した結果が得られていない[67]。今後も、α-TP の LDL、HDL に対する抗酸化作用に着目して行く必要がある。

2) δ-T3 と脂質代謝

本研究での 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）。これまで TRF（α-, β-, γ-, δ-T3 の混合）は、コレステロール合成酵素の 3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル補酵素 A 還元酵素（HMG-CoA）を抑制し、体内のコレステロール産生を阻害することが多数報告されている[19-22]。高コレステロール血症に使用される薬剤のスタチンは、HMG-CoA 還元酵素と HMG-CoA との結合を競争阻害し、コレステロール合成を抑制、LDL 受容体合成を促進する[68]。一方 T3 は HMG-CoA 還元酵素の転写後抑制に関与しており、HMG-CoA 還元酵素の基質に影響なく[69, 70]コレステロール合成を抑制させる。また T3 のなかでも δ-T3 は HMG-CoA 還元酵素への阻害が大きいため[23]、LDL が低下すると予測した。しかし、本研究結果では、若年男女に対する δ-T3（250 mg/d）摂取の LDL 低下作用はみられなかった。本研究の被験者の LDL レベルは基準値内であり、有意な変動がみられなかった可能性がある。

高コレステロールの改善に処方されるスタチン系薬剤が標的とするのは HMG-CoA 還元酵素である。未だ、議論の余地はあるが、メバロン酸経路とコエンザイム Q10（CoQ10）の生成経路は一部の経路を共有しているため、スタチン系薬剤は、コレステロールだけではなく、CoQ10 の生成も低下させることで、一部のスタチン服用者に認められる軽度から中等度の筋肉痛や横紋筋融解症に関与しているという報告もある[71-73]。さらにスタチンによる HMG-CoA 還元酵素の活性を抑制すると、負のフィードバック作用により、HMG-CoA 還元酵素の発現が増加することが知られている[74]。したがって、δ-T3 のコレステロール低下作用と有効な摂取量を示すことは、副作用のない疾病改善や予防へ貢献できるため、今後も検討を続ける。また、δ-T3（250mg/d）摂取した場合に、HDL に増加傾向がみられた。HDL の酸化は、末梢組織からの余分なコレステロールを回収する能力の低下へとつながり、動脈硬化の病態に酸化 HDL が関与していることが報告されている[75, 76]。Framingham Heart Study[77]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た。したがって、LDL だけでなく HDL の酸化予防や増加は動脈硬化予防に有効であることは明らかである。今後は抗酸化だけではなく、HDL レベルを増加させる栄養素として δ-T3 に注目したい。

3.4.3 α-TP、δ-T3 による骨代謝への影響

酸化ストレスが骨コラーゲンに異常をもたらすことで骨質の劣化がはじまることから、本研究では α-TP や δ-T3 が若年者における骨質劣化予防や、骨の健康維持への有用性の検証も実施した。骨代謝マーカーは骨折予測因子であり、骨密度とは独立した骨折の危険因子である[78-80]。本研究では、血清骨吸収マーカーに NTx、血清骨形成マーカーに total P1NP を採用し、さらに骨マトリックス関連マーカーとして HCY を採用した。一日当たり 268mg の α-TP および、δ-T3 を 14 日間連続摂取した場合、若年者では骨代謝マーカー、HCY 濃度に有意な変化は認められなかった。

高齢マウスに高用量 V.E を投与した場合、骨密度に変化を及ぼさず、骨母タンパク質を増加させ骨質および骨母タンパク質に顕著な影響が出た報告[12]や、インターロイキン-1（IL-1）で刺激したマウス骨髄細胞とふくらはぎ骨芽細胞の共培養において、α-TP が骨芽細胞における RANKL の発現を低下させ、破骨細胞の発生を抑制することを明らかにしている[81]。

一方で、α-TP は骨密度（BMD）への影響についても、一致した見解が得られていない。V.E の過剰摂取が骨粗鬆症の発症リスクを上昇させる報告もあるが[82]、血清 α-TP 値が低い高齢男性は酸化ストレスが高く、BMD が低下し[83]血清 α-TP と大腿骨頸部 BMD の間に正の関連性があることが発見された[84]。加えて、α-TP は骨折治癒にも有益な効果を発揮した[85]。したがって、α-TP による骨代謝への影響は骨質のみならず、骨密度への影響を含めたさらなる検討が必要である。本研究において、NT x はいずれの場合も男女ともに基準値よりも高値の 21~22 nM BCE/L 付近を示した。現在、国内の臨床で用いられている血清 NT x の基準値は男性(40～59 歳):9.5～17.7 nM BCE/L 、女性 (閉経前 40～44 歳):7.5～16.5 nM BCE/L 、(閉経後 45～79 歳):10.7～24.0 nM BCE/L である。若年の血清 NT x の基準値は明確なものがない。20 歳前後の日本人の男子スキー選手のシーズンオフの血清 NT x は本研究の対象者と同レベルの 23.4±4.77 nmBCE/L を示していた[86]。さらに OSTEOMARK® NTx Serum キットによる血清 NTx の基準（平均年齢 35 歳、24 歳から 49 歳）は、男性で 5.4～24.2 nmol BCE/L、女性で 6.2～19.0 nmol BCE/L である（2021 年 1 月現在）。以上のことから、本研究の被験者の NT x は基準値内と考えることもできる。血清若年者を対象とした血清 NT x レベルのデータは、少なく、本研究の数値は今後、さまざまな研究において若年の血清 NT x を評価する際に役立つと考えられた。

これまでに、脂質異常症の治療に多く用いられているスタチンが、骨形成を促進し、骨芽細胞の分化を促進させ骨強度を高めた報告が多数ある[87-92]。これらのことは、骨代謝にとってメバロン酸経路が重要であることを示唆している。T3 もスタチンと似た作用を有しており、HMG-CoA 還元酵素を分解することで HMG-CoA 還元酵素の活性を低下させる[74]。さらに T3（10%γ-T3 と 90%δ-T3 からなる）は、骨形成関連遺伝子の発現を促進することで、マウス骨芽細胞の骨形成活性を高めることを実証した[93]。しかし、骨は常に体内で代謝されているものの、BMD を動的マーカーとして用いるためには半年から 1 年の観察期間が必要だといわれている。対して、骨代謝マーカーは測定時点での骨代謝の状態を反映するが、骨代謝マーカーを用いて薬剤の効果を観察する場合でも、6 か月間の観察期間をとる[94]。したがって、本研究での介入期間は δ-T3 の作用が代謝マーカーへ反映されていなかった可能性がある。T3 と骨代謝との関係は、メバロン酸経路が機序の主であると考えている。メバロン酸経路におけるゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）が骨芽細胞や、破骨細胞などの分化に関わっており、骨形成促進作用はメバロン酸代謝を阻害することにより GGPP などのイソプレノイドの産生を阻害することで、破骨細胞の形成や破骨細胞機能を阻害し、生体内での骨代謝に影響を与える[95-97]。無作為化二重盲検プラセボ対照試験では、閉経後の骨粗鬆症の女性で 12 週間のアナトーT3（10% γ-T3 と 90% δ-T3）サプリメントの効果が

評価された。T3 補充を受けた閉経後女性では、プラセボ群と比較して骨型アルカリホスファターゼ（BALP）/NTx 比に有意な増加と酸化マーカーである 8-OHdG 濃度に減少が見られている[25]。また、K A Chan ら[98]は、60 歳以上の女性に過去 2 年間にスタチン投与の記録がなかった女性と比較して、13 回以上のスタチン投与を受けた女性は、非病的骨折のリスクが減少したとし、スタチンは高齢女性の非病理学的骨折に対して保護的であるように思われると報告している。以上のことから、T3（δ-T3）は骨芽細胞に対して保護作用が作用しているが、ヒトにおいては T3 の作用は高齢女性の骨代謝に特異的である可能性も推察できる。δ-T3 のヒトの骨代謝への作用を証明するには、さらなるデータの蓄積が必要になる。被験者の年齢、性別、性ホルモン濃度、サプリメント投与期間に十分考慮することで δ-T3 の骨代謝改善への機序がより明らかになると考える。

3.4.4 α-TP・δ-T3 摂取による HCY への影響

本論文の 2 章での結果では、V.E 摂取により血漿 HCY 濃度は有意に低下したが、本研究において、α-TP、δ-T3 の摂取による血漿 HCY 濃度に有意な変化は認められなかった。今回対象としたのは、健康な若年男女であり、第 2 章の女子陸上選手は若年女性ではあるが、本章の被験者と比較し、運動習慣や運動能力に差がある。加えて、女子陸上選手を被験者とした第 2 章では、MTHFR の一塩基多型（SNP）がホモ型、ヘテロ型の対象者であった。今回の被験者の MTHFR の SNP は判定しておらず､比較することはできないが､被験者の MTHFR の SNP が影響した可能性もある。また、血中 HCY レベルは一般人とアスリートを比較した場合に、アスリートのほうが低レベルである報告がある[99]。Rousseau らは[100]、有酸素運動を行ったアスリートや陸上選手の HCY レベルは、非運動者やレスリング選手らと比較し低いとし、さらに Sema Can ら[101]によると、非アスリートよりもアスリートでは定期的なトレーニングに依存して HCY レベルが低くなる可能性を示した。運動と HCY レベルについて、現在一貫した結果は得られていないが、これらに共通しているのは、HCY レベルの変動に関して、アスリートと非アスリートで分けて検討する必要があるということである。また､2 章での女子陸上長距離選手の栄養素摂取量は､HCY 代謝に関与する $V.B_6$(2.0±0.5mg)､$V.B_{12}$（19.0±6.2 μg）、葉酸摂取量（528±169 μg）は推奨量（RDA）の 2 倍から 8 倍量を摂取していた。一方、本研究の被験者では、$V.B_{12}$ については RDA を満たしているものの、$V.B_6$ や葉酸は RDA に満たなかった。血中 HCY レベルは、HCY 代謝と関与している補酵素の栄養状態に依存している[102, 103]。しかしながら、HCY 代謝に関与する $V.B_6$ および $V.B_{12}$ のサプリメント投与を行ったところ、閉経後女性において大腿骨頸部骨折が上昇するという報告もある[104]。したがって、本研究は HCY レベル上昇と骨折や骨代謝との関係には栄養素の欠乏のみに焦点をあてるのではなく､運動量や SNPs も考慮すべきであることを示した。以上のことから今回、α-TP、δ-T3 によって変動が認められなかったのは、運動習慣および補酵素の栄養状態も一つの要因である。

本章では、α-TP および δ-T3 を健康なヒトが摂取した場合の血中動態を明らかにすることを目的とし、研究をおこなった。その結果、血中 δ-T3 および α-TP 濃度は有意に増加した。すなわち、本研究結果は、δ-T3 や α-TP が 14 日間の短期摂取後、有意なレベルで検出可能であ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 摂取による血中 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。しかし、本研究の限界点は、ヒトの δ-T3 の基準値を示したデータがないために、被験者の血漿 δ-T3 の階層の特定ができないこと、さらに、δ-T3 の生理機能的効果を示すのに有用とされる T3 の血中濃度範囲であるかの推測ができなかったことである。今後は、δ-T3 のバイオアベイラビリティに対し、より有効な摂取方法や摂取量を検討し、ヒトの疾病予防に役立つ栄養素の一つとして確立させたい。

参考文献

[1] 山門 實. 生活習慣病は活性酸素病. 人間ドック (Ningen Dock). 2014;29:465-470 doi: 10.11320/ningendock.29.465.

[2] Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. The Lancet. 1999;354:407-413 doi: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11058-9.

[3] Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, et al. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease: The European Concerted Action Project. JAMA. 1997;277:1775-1781 doi: 10.1001/jama.1997.03540460039030.

[4] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA. 1995;274:1049-1057 doi: 10.1001/jama.1995.03530130055028.

[5] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. Osteoporos Int. 2010;21:195-214 doi: 10.1007/s00198-009-1066-z.

[6] Manolagas SC. From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. Endocr Rev. 2010;31:266-300 doi: 10.1210/er.2009-0024.

[7] Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. J Biol Chem. 2000;275:11278-11283 doi: 10.1074/jbc.275.15.11278.

[8] Suzukawa M, Ishikawa T, Yoshida H, Nakamura H. Effect of in-vivo supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein to oxidative modification. J Am Coll Nutr. 1995;14:46-52 doi: 10.1080/07315724.1995.10718472.

[9] Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. The American Journal of Clinical Nutrition. 1991;53:326S-334S doi: 10.1093/ajcn/53.1.326S.

[10] Kasai S, Ito A, Shindo K, Toyoshi T, Bando M. High-Dose α-Tocopherol Supplementation Does Not Induce Bone Loss in Normal Rats. PLoS One. 2015;10:e0132059-e0132059 doi: 10.1371/journal.pone.0132059.

[11] Chin K-Y, Ima-Nirwana S. The biological effects of tocotrienol on bone: a review on evidence from rodent models. Drug Des Devel Ther. 2015;9:2049-2061 doi: 10.2147/DDDT.S79660.

[12] Arjmandi B, Juma S, Beharka A, Bapna M, Akhter M, Meydani S. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice. J Nutr Biochem. 2002;13:543 doi: 10.1016/s0955-2863(02)00199-7.

[13] 笠井 俊, 福澤 健. 骨の健康とビタミン E：α-トコフェロールは本当に骨量を低下させるのか？. ビタミン. 2016;90:469-483 doi: 10.20632/vso.90.10_469.

[14] Chuin A, Labonté M, Tessier D, Khalil A, Bobeuf F, Doyon CY, et al. Effect of antioxidants

combined to resistance training on BMD in elderly women: a pilot study. Osteoporos Int. 2009;20:1253-1258 doi: 10.1007/s00198-008-0798-5.
[15] Ruiz-Ramos M, Vargas LA, Fortoul Van der Goes TI, Cervantes-Sandoval A, Mendoza-Nunez VM. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol is useful to preventing bone loss linked to oxidative stress in elderly. J Nutr Health Aging. 2010;14:467-472 doi: 10.1007/s12603-010-0099-5.
[16] Chavan SN, More U, Mulgund S, Saxena V, Sontakke AN. Effect of supplementation of vitamin C and E on oxidative stress in osteoporosis. Indian J Clin Biochem. 2007;22:101-105 doi: 10.1007/BF02913324.
[17] Kamat JP, Devasagayam TPA. Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria. Neurosci Lett. 1995;195:179-182 doi: https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11812-B.
[18] Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Free Radic Biol Med. 1991;10:263-275 doi: https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90033-Y.
[19] Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Dischino DD, Gillespie E, Qureshi AA, et al. Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis. 2. Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Benzopyran and Tetrahydronaphthalene Analogs of the Tocotrienols. J Med Chem. 1994;37:526-541 doi: 10.1021/jm00030a012.
[20] Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Qureshi AA, Wright JJ. Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. J Med Chem. 1992;35:3595-3606 doi: 10.1021/jm00098a002.
[21] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Lancet. 1996;347:781-786 doi: 10.1016/s0140-6736(96)90866-1.
[22] Qureshi AA, Qureshi N, Wright JJK, Shen Z, Kramer G, Gapor A, et al. Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). The American Journal of Clinical Nutrition. 1991;53:1021S-1026S doi: 10.1093/ajcn/53.4.1021S.
[23] Chao J-T, Gapor A, Theriault A. Inhibitory Effect of .DELTA.-Tocotrienol, a HMG CoA Reductase Inhibitor, on Monocyte-Endothelial Cell Adhesion. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2002;48:332-337 doi: 10.3177/jnsv.48.332.
[24] Maniam S, Mohamed N, Shuid AN, Soelaiman IN. Palm tocotrienol exerted better antioxidant activities in bone than alpha-tocopherol. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103:55-60 doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00241.x.
[25] Shen CL, Yang S, Tomison MD, Romero AW, Felton CK, Mo H. Tocotrienol supplementation suppressed bone resorption and oxidative stress in postmenopausal osteopenic women: a 12-week randomized double-blinded placebo-controlled trial. Osteoporos Int. 2018;29:881-891 doi:

10.1007/s00198-017-4356-x.
[26] Yap SP, Yuen KH, Lim AB. Influence of route of administration on the absorption and disposition of alpha-, gamma- and delta-tocotrienols in rats. J Pharm Pharmacol. 2003;55:53-58 doi: 10.1111/j.2042-7158.2003.tb02433.x.
[27] Qureshi A. Impact of δ-Tocotrienol on Inflammatory Biomarkers and Oxidative Stress in Hypercholesterolemic Subjects. Journal of Clinical and Experimental Cardiology. 2015;06 doi: 10.4172/2155-9880.1000367.
[28] Qureshi A, Khan D, Saleem S, Silswal N, Trias A, Tan B, et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Annatto δ-tocotrienol in Healthy Fed Subjects. J Clin Exp Cardiolog. 2015;6 doi: 10.4172/2155-9880.1000411.
[29] Mahipal A, Klapman J, Vignesh S, Yang CS, Neuger A, Chen D-T, et al. Pharmacokinetics and safety of vitamin E δ-tocotrienol after single and multiple doses in healthy subjects with measurement of vitamin E metabolites. Cancer Chemother Pharmacol. 2016;78:157-165 doi: 10.1007/s00280-016-3048-0.
[30] O'Byrne D, Grundy S, Packer L, Devaraj S, Baldenius K, Hoppe PP, et al. Studies of LDL oxidation following α-, γ-, or δ-tocotrienyl acetate supplementation of hypercholesterolemic humans. Free Radic Biol Med. 2000;29:834-845 doi: https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00371-3.
[31] van Tits LJH, de Waart F, Hak-Lemmers HLM, van Heijst P, de Graaf J, Demacker PNM, et al. Effects of α-tocopherol on superoxide production and plasma intercellular adhesion molecule-1 and antibodies to oxidized LDL in chronic smokers. Free Radic Biol Med. 2001;30:1122-1129 doi: https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00519-6.
[32] Jialal I, Fuller CJ, Huet BA. The Effect of α-Tocopherol Supplementation on LDL Oxidation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15:190-198 doi: doi:10.1161/01.ATV.15.2.190.
[33] Kobayashi S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, Notsu A, et al. Comparison of relative validity of food group intakes estimated by comprehensive and brief-type self-administered diet history questionnaires against 16 d dietary records in Japanese adults. Public Health Nutr. 2011;14:1200-1211 doi: 10.1017/s1368980011000504.
[34] Kobayashi S, Honda S, Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Hirota N, et al. Both comprehensive and brief self-administered diet history questionnaires satisfactorily rank nutrient intakes in Japanese adults. J Epidemiol. 2012;22:151-159 doi: 10.2188/jea.je20110075.
[35] Ministry of Health LaW. Dietary Reference Intakes for Japanese (2020): DAI-ICHI SHUPPAN Co.Ltd.; 2020.
[36] Brigelius-Flohé R. Vitamin E and drug metabolism. Biochem Biophys Res Commun. 2003;305:737-740 doi: https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00811-8.
[37] Qureshi AA, Sami SA, Salser WA, Khan FA. Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF(25)) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. J Nutr

Biochem. 2001;12:318-329 doi: 10.1016/s0955-2863(01)00144-9.
[38] Yap SP, Yuen KH, Wong JW. Pharmacokinetics and bioavailability of α-, γ- and δ-tocotrienols under different food status. J Pharm Pharmacol. 2001;53:67-71 doi: https://doi.org/10.1211/0022357011775208.
[39] Rasool AHG, Yuen KH, Yusoff K, Wong AR, Rahman ARA. Dose Dependent Elevation of Plasma Tocotrienol Levels and Its Effect on Arterial Compliance, Plasma Total Antioxidant Status, and Lipid Profile in Healthy Humans Supplemented with Tocotrienol Rich Vitamin E. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2006;52:473-478 doi: 10.3177/jnsv.52.473.
[40] Shen C-L, Wang S, Yang S, Tomison MD, Abbasi M, Hao L, et al. A 12-week evaluation of annatto tocotrienol supplementation for postmenopausal women: safety, quality of life, body composition, physical activity, and nutrient intake. BMC Complement Altern Med. 2018;18:198 doi: 10.1186/s12906-018-2263-0.
[41] Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. Mol Aspects Med. 2007;28:692-728 doi: 10.1016/j.mam.2007.03.001.
[42] Julianto T, Yuen KH, Noor AM. Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation. Int J Pharm. 2000;200:53-57 doi: 10.1016/s0378-5173(00)00337-9.
[43] Qureshi A, Khan D, Wajeeha D, Qureshi PN. Dose-dependent Modulation of Lipid Parameters, Cytokines and RNA by δ-tocotrienol in Hypercholesterolemic Subjects Restricted to AHA Step-1 Diet. Br J Med Med Res. 2015;6:351-366 doi: 10.9734/BJMMR/2015/13820.
[44] 二木 鋭, 阿部 皓. ビタミン E は疾患予防に対して有効か?：介入試験とバイオマーカーに基づく評価. ビタミン. 2009;83:229-247 doi: 10.20632/vso.83.5-6_229.
[45] 太田 好, 福澤 健. ビタミン E のサプリメント効果. ビタミン. 2004;78:495-512 doi: 10.20632/vso.78.10_495.
[46] Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller ER, 3rd, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2002;76:549-555 doi: 10.1093/ajcn/76.3.549.
[47] Desideri G, Marinucci MC, Tomassoni G, Masci PG, Santucci A, Ferri C. Vitamin E Supplementation Reduces Plasma Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and von Willebrand Factor Levels and Increases Nitric Oxide Concentrations in Hypercholesterolemic Patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002;87:2940-2945 doi: 10.1210/jcem.87.6.8545.
[48] Weinberg RB, VanderWerken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ. Pro-Oxidant Effect of Vitamin E in Cigarette Smokers Consuming a High Polyunsaturated Fat Diet. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:1029-1033 doi: doi:10.1161/01.ATV.21.6.1029.
[49] Jialal I, Fuller CJ, Huet BA. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15:190-198 doi: doi:10.1161/01.ATV.15.2.190.
[50] Chan JCM, Mahan JD, Trachtman H, Scheinman J, Flynn JT, Alon US, et al. Vitamin E therapy

in IgA nephropathy: a double-blind, placebo-controlled study. Pediatr Nephrol. 2003;18:1015-1019 doi: 10.1007/s00467-003-1205-2.
[51] Traber MG. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. J Lipid Res. 2013;54:2295-2306 doi: 10.1194/jlr.R032946.
[52] MacGregor KJ, Embleton JK, Lacy JE, Perry EA, Solomon LJ, Seager H, et al. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. Advanced Drug Delivery Reviews. 1997;25:33-46 doi: https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00489-9.
[53] Gee PT. Vitamin E – essential knowledge for supplementation. Lipid Technology. 2011;23:79-82 doi: https://doi.org/10.1002/lite.201100102.
[54] Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med. 1993;328:1444-1449 doi: 10.1056/nejm199305203282003.
[55] Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med. 1993;328:1450-1456 doi: 10.1056/nejm199305203282004.
[56] Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. N Engl J Med. 1996;334:1156-1162 doi: 10.1056/nejm199605023341803.
[57] Mafra D, Santos FR, Lobo JC, de Mattos Grosso D, Barreira AL, Velarde LGC, et al. Alpha-tocopherol supplementation decreases electronegative low-density lipoprotein concentration [LDL(−)] in haemodialysis patients. Nephrology Dialysis Transplantation. 2009;24:1587-1592 doi: 10.1093/ndt/gfn760.
[58] Abumweis SS, Barake R, Jones PJ. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. Food Nutr Res. 2008;52 doi: 10.3402/fnr.v52i0.1811.
[59] Demonty I, Ras RT, van der Knaap HCM, Duchateau GSMJE, Meijer L, Zock PL, et al. Continuous Dose-Response Relationship of the LDL-Cholesterol–Lowering Effect of Phytosterol Intake. The Journal of Nutrition. 2008;139:271-284 doi: 10.3945/jn.108.095125.
[60] Harris WS. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. J Lipid Res. 1989;30:785-807 doi.
[61] 坂手 誠, 恵 千, 小林 正, 村田 和, 阪上 皖, 木村 隆. 健康診断における食後中性脂肪値のスクリーニングレベルの検討. 産業衛生学雑誌. 2003;45:201-205 doi: 10.1539/sangyoeisei.45.201.
[62] Suzukawa M, Abbey M, Clifton P, Nestel PJ. Effects of supplementing with vitamin E on the uptake of low density lipoprotein and the stimulation of cholesteryl ester formation in macrophages. Atherosclerosis. 1994;110:77-86 doi: 10.1016/0021-9150(94)90070-1.
[63] Shen GX, Novak C, Angel A. Effect of dietary vitamin E supplements on cholesteryl ester transfer

activity in hamster adipose tissue. Atherosclerosis. 1996;124:211-219 doi: https://doi.org/10.1016/0021-9150(96)05827-3.
[64] Nadeem N, Woodside JV, Kelly S, Allister R, Young IS, McEneny J. The two faces of α- and γ-tocopherols: an in vitro and ex vivo investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation. J Nutr Biochem. 2012;23:845-851 doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.04.009.
[65] Islam KN, O'Byrne D, Devaraj S, Palmer B, Grundy SM, Jialal I. Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. Atherosclerosis. 2000;150:217-224 doi: 10.1016/s0021-9150(99)00410-4.
[66] Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. Atherosclerosis. 2000;150:129-134 doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00353-6.
[67] Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med. 2010;49:503-515 doi: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016.
[68] Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res. 1992;33:1569-1582 doi.
[69] Parker RA, Pearce BC, Clark RW, Gordon DA, Wright JJ. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. J Biol Chem. 1993;268:11230-11238 doi.
[70] Theriault A, Chao J-T, Wang Q, Gapor A, Adeli K. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. Clin Biochem. 1999;32:309-319 doi: https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00027-2.
[71] 濱野 忠, 武藤 多, 栗山 勝. 7. スタチンと横紋筋融解症. 日本内科学会雑誌. 2007;96:1646-1651 doi: 10.2169/naika.96.1646.
[72] Mortensen SA, Leth A, Agner E, Rohde M. Dose-related decrease of serum coenzyme Q10 during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors. Mol Aspects Med. 1997;18:137-144 doi: https://doi.org/10.1016/S0098-2997(97)00014-9.
[73] Marcoff L, Thompson PD. The Role of Coenzyme Q10 in Statin-Associated Myopathy. J Am Coll Cardiol. 2007;49:2231-2237 doi: doi:10.1016/j.jacc.2007.02.049.
[74] Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein Sensors for Membrane Sterols. Cell. 2006;124:35-46 doi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022.
[75] Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:6457-6461 doi: 10.1073/pnas.88.15.6457.
[76] Rifici VA, Khachadurian AK. Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper mediated oxidation of HDL and on HDL mediated cholesterol efflux. Atherosclerosis. 1996;127:19-26 doi: https://doi.org/10.1016/S0021-9150(96)05928-X.
[77] Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of

Coronary Heart Disease and Lipoprotein Cholesterol Levels: The Framingham Study. JAMA. 1986;256:2835-2838 doi: 10.1001/jama.1986.03380200073024.
[78] George A. Kelley KSK, and Zung Vu Tran. Aerobic Exercise and Lipids and Lipoproteins in Women: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. J Womens Health. 2004;13:1148-1164 doi: 10.1089/jwh.2004.13.1148.
[79] George A. Kelley　KSK. Aerobic exercise and lipids and lipoproteins in men: a meta-analysis of randomized controlled trials. The Journal of Men's Health and Gender. 2006;3:61-70 doi: 10.1016/j.jmhg.2005.09.003.
[80] Kelley GA, Kelley KS. Impact of progressive resistance training on lipids and lipoproteins in adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. Prev Med. 2009;48:9-19 doi: https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2008.10.010.
[81] Kim HN, Lee JH, Jin WJ, Lee ZH. α-Tocopheryl Succinate Inhibits Osteoclast Formation by Suppressing Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB Ligand (RANKL) Expression and Bone Resorption. J Bone Metab. 2012;19:111-120 doi: 10.11005/jbm.2012.19.2.111.
[82] Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, et al. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. Nat Med. 2012;18:589-594 doi: 10.1038/nm.2659.
[83] Ostman B, Michaëlsson K, Helmersson J, Byberg L, Gedeborg R, Melhus H, et al. Oxidative stress and bone mineral density in elderly men: antioxidant activity of alpha-tocopherol. Free Radic Biol Med. 2009;47:668-673 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.031.
[84] Mehat MZ, Shuid AN, Mohamed N, Muhammad N, Soelaiman IN. Beneficial effects of vitamin E isomer supplementation on static and dynamic bone histomorphometry parameters in normal male rats. J Bone Miner Metab. 2010;28:503-509 doi: 10.1007/s00774-010-0159-2.
[85] Shuid AN, Mohamad S, Muhammad N, Fadzilah FM, Mokhtar SA, Mohamed N, et al. Effects of α-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. J Orthop Res. 2011;29:1732-1738 doi: 10.1002/jor.21452.
[86] 佐藤 照, 櫻庭 景, 若松 健, 土屋 陽, 越智 英. 大学男子スキー選手の骨代謝及び骨質に関する研究. スキー研究. 2012;9:25-28 doi: 10.14845/jskisciences.9.1_25.
[87] Bauer DC, Mundy GR, Jamal SA, Black DM, Cauley JA, Ensrud KE, et al. Use of Statins and Fracture: Results of 4 Prospective Studies and Cumulative Meta-analysis of Observational Studies and Controlled Trials. Arch Intern Med. 2004;164:146-152 doi: 10.1001/archinte.164.2.146.
[88] Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. Science. 1999;286:1946 doi: 10.1126/science.286.5446.1946.
[89] Bauer DC. HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. Osteoporos Int. 2003;14:273-282 doi: 10.1007/s00198-002-1323-x.
[90] Funkhouser HL, Adera T, Adler RA. Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) on Bone Mineral Density. J Clin Densitom. 2002;5:151-158 doi: https://doi.org/10.1385/JCD:5:2:151.

[91] Hatzigeorgiou C, Jackson JL. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors and osteoporosis: a meta-analysis. Osteoporos Int. 2005;16:990-998 doi: 10.1007/s00198-004-1793-0.

[92] Abdul-Majeed S, Mohamed N, Soelaiman I-N. The use of delta-tocotrienol and lovastatin for anti-osteoporotic therapy. Life Sci. 2015;125:42-48 doi: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.012.

[93] Wan Hasan WN, Abd Ghafar N, Chin KY, Ima-Nirwana S. Annatto-derived tocotrienol stimulates osteogenic activity in preosteoblastic MC3T3-E1 cells: a temporal sequential study. Drug Des Devel Ther. 2018;12:1715-1726 doi: 10.2147/dddt.S168935.

[94] 三浦雅一. 骨粗鬆症診断における骨代謝マーカーの実践的活用法について. 医学検査のあゆみ. 2016;62:298-303 doi.

[95] Yoshida T, Asanuma M, Grossmann L, Fuse M, Shibata T, Yonekawa T, et al. Geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) synthase is down-regulated during differentiation of osteoblastic cell line MC3T3-E1. FEBS Lett. 2006;580:5203-5207 doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.060.

[96] 福井　浩. トコトリエノールの骨粗鬆症に対する効果と有効性. ビタミン. 2017;91:506-508 doi: 10.20632/vso.91.8_506.

[97] Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, et al. The Ability of Statins to Inhibit Bone Resorption Is Directly Related to Their Inhibitory Effect on HMG-CoA Reductase Activity. J Bone Miner Res. 2003;18:88-96 doi: 10.1359/jbmr.2003.18.1.88.

[98] Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. Lancet. 2000;355:2185-2188 doi: 10.1016/s0140-6736(00)02400-4.

[99] Unt E, Zilmer K, Mägi A, Kullisaar T, Kairane C, Zilmer M. Homocysteine status in former top-level male athletes: possible effect of physical activity and physical fitness. Scand J Med Sci Sports. 2008;18:360-366 doi: 10.1111/j.1600-0838.2007.00674.x.

[100] Rousseau AS, Robin S, Roussel AM, Ducros V, Margaritis I. Plasma homocysteine is related to folate intake but not training status. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2005;15:125-133 doi: https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.02.002.

[101] CAN S, Demirkan, E., & AVCI, E. The Effect of Exercise on Serum Homocysteine, Adma, Neopterin and Oxidative Stress Levels in Young Male Athletes. International Journal of Applied Exercise Physiology. 2018;7:17-29 doi: https://doi.org/10.30472/ijaep.v7i4.290.

[102] Multivitamin Use, Folate, and Colon Cancer in Women in the Nurses' Health Study. Ann Intern Med. 1998;129:517-524 doi: 10.7326/0003-4819-129-7-199810010-00002 %m 9758570.

[103] Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. N Engl J Med. 2006;354:1567-1577 doi: 10.1056/NEJMoa060900.

[104] Meyer HE, Willett WC, Fung TT, Holvik K, Feskanich D. Association of High Intakes of Vitamins B6 and B12 From Food and Supplements With Risk of Hip Fracture Among Postmenopausal

Women in the Nurses' Health Study. JAMA Network Open. 2019;2:e193591-e193591 doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.3591.

研究業績

本学位論文に関する成果は以下の論文、学会発表にて報告した。

[原著論文]

第 1 章

Naho Serizawa, Mamoru Nishimuta, Naoko Kodama, Mieko Shimada, Yutaka Yoshitake, Nobuko (Kay) Hongu, Masako Ota, TomohiroYano. Salt Restriction Affects the Excretions of Minerals (Na, K, Ca, Mg, P and Zn) in the Second Voided Fasting Early Morning Urine. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2019. 65 (2) pp.142-147.

[学会発表]

第 1 章

Serizawa N, Nishimuta M, Kodama N, Shimada M, Yoshitake Y. Second voided early morning urine minerals changed significantly with or without sodium restriction in humans. 10th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition. Adelaide Convention Centre, Adelaide, Australia. November. 2017.

第 2 章

Naho Serizawa, Mamoru Nishimuta, Naoko Kodama, Mieko Shimada, Yutaka Yoshitake, Masako Ota, Tomohiro Yano. Stress reduces phosphorus balance in humans. 42nd Nutrition Society of Australia 2018 AMS. the QT Hotel, Canberra, Australia. November. 2018.

Naho Serizawa, Akiho Shinagawa, Tomoki Yamazaki, Masako Ota, Tomohiro Yano. The effect of conventional intake of the vitamin B2 and vitamin E on each vitamin in serum of young women. FENS2019, 13th European Nutrition Conference, The convention Centre Dublin, Dublin, Ireland. October. 2019.

芹澤奈保, 山崎倫生, 太田昌子, 矢野友啓. ビタミン E および B2 の併用摂取はヒト血中ホモシステイン濃度を低下させる. 第 31 回日本ビタミン E 研究会, 松山, 愛媛大学. 2020 年 1 月.

謝辞

本研究実施に際し、ご参加いただきました全ての被験者の皆様に感謝申し上げます。

研究を遂行するにあたり、多大なるご指導を賜りました恩師である、東洋大学大学院食環境科学研究科 教授 矢野友啓先生、東洋大学大学院食環境科学研究科 准教授 太田昌子先生、東洋大学大学院食環境科学研究科 教授 佐藤順先生、千葉大学予防医学研究センター客員教授 上野光一先生にここに深謝の意を表します。先生方から懇切なご指導、親身な励ましをいただき、導いていただいたおかげで、博士後期課程を全うすることができました。厚く御礼申し上げます。

また、分子食理学研究室、食品栄養学研究室の皆さんには研究への熱意や意欲を与えていただきました。特に品川明穂氏、山崎倫生氏とは研究を通して多くの困難や喜びを共有することができました。本当にありがとうございました。そして博士後期課程の同級生メンバーと出会い、共に支え合えたことに感謝申し上げます。

さらに、本論文作成にあたり、修士課程での研究内容を一部まとめました。修士課程でご指導賜りました、東洋大学ライフイノベーション研究所 客員研究員 西牟田守先生、お茶の水女子大学 名誉教授 近藤和雄先生、東京栄養食糧専門学校 児玉直子先生、千葉県立保健医療大学 教授 島田美恵子先生、大阪市立大学 特任教授 本宮暢子先生、鹿屋体育大学 名誉教授 吉武裕先生に謝意を申し上げます。

本研究の一部は次の助成金により遂行されました：私立大学研究ブランディング事業（MEXT）（type-B 世界戦略型, 2017）、科研費（基盤 B 15H02885, 2017）、東洋大学オリンピックパラリンピックプロジェクト(type-A, 2017)、東洋大学井上円了助成金（2017, 2018, 2019, 2020）、ライフイノベーション研究所 (2017)。誠にありがとうございました。

2021 年 2 月 3 日
芹澤 奈保