

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22300265

研究課題名(和文) 思春期女子における骨粗しょう症のリスク軽減と予防に関する遺伝栄養学的研究

研究課題名(英文) Genetic nutrition research regarding osteoporosis risk modification and prevention in pubescent girls

研究代表者

灌井 幸男 (Takii, Yukio)

京都学園大学・バイオ環境学部・客員研究員

研究者番号：70154937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管内は多様な微生物群で構成されて健康増進に貢献している。漬物は整腸効果のある食物繊維、カルシウムやビタミンを含み、日々三度の食生活で継続的に摂取すれば腸内環境改善に役立つ。平均年齢 20.2 ± 3.3 歳の若年女性に乳酸菌を含む漬物を2週間継続摂取させた結果、ナチュラルキラー細胞活性が増進されるとともに、便秘が統計学的に有意に改善された。

遺伝学的アプローチに加え、適切なカルシウム含有食の継続摂取を指向した食育により、思春期女子が遺伝的体質を理解し、適切な食習慣と運動習慣を体得することができ、彼女らが中高年期に到達した際、骨粗鬆症や肥満の発症リスクを効果的に軽減できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Forty-four female students (mean age, 20.2 ± 3.3 years) consumed 30 g pickles for 2 weeks and were divided into 3 groups: viable-cell intake subjects ($n = 14$), dead-cells intake subjects ($n = 15$), and placebo subjects ($n = 15$). Natural killer (NK)-cell activity in serum from dead-cell intake subjects was $37.5 \pm 17.0\%$ before the start of the test-food intake and $47.7 \pm 20.1\%$ after intake, indicating statistically significant effects ($p < 0.01$). The number of days with bowel movements significantly increased from 3.8 ± 1.5 to 4.9 ± 1.8 days in the dead-cell intake group., Feeling of incomplete evacuation reduced and refreshed feeling increased among the subjects with constipation. Thus, marked enhancement of NK-cell activity and improved bowel symptoms were observed in subjects consuming pickles containing dead lactobacillus cells. Daily adequate calcium intake is predicted to be crucial to develop optimal peak bone mass and to preserve bone mass throughout life.

研究分野：総合領域

キーワード：遺伝栄養学 骨粗しょう症 運動 思春期女子 カルシウム摂取 乳酸菌 腸内細菌 食育

1. 研究開始当初の背景

思春期女子は、自身の体型を過大視する「やせ願望」をもつが、骨量・骨組織に関心をもたない傾向がある。中高年期に発症するリスクが高い女性に特有の骨粗鬆症は、遺伝的な体質と食生活・運動習慣に関わる環境因子が交互して発症に至る典型的な多因子生活習慣病である。

カルシウム含有食継続的摂取と規則的な軽運動により、健全な身体形成が構築されること及び快適な排便を伴う腸内環境の改善保持に努める必要があることを食育で実践する。したがって女性の健全な体型形成にとって最も重要な時期である思春期にあっては強固な骨組織の形成に努め、これに支えられた適切な体型の構築が必要である。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子多型による遺伝体質研究

以下の3因子について、リスク発症との相関関係を検証する。

骨基質を吸収する破骨細胞の寿命を抑制し骨量を維持するエストロゲン受容体(ESRX と ESRP)との相関。

LDL 受容体タンパ5 (LRP5)

Wnt 経路の正常な拮抗を軽減する結果、Wnt シグナルを増大させて肥厚した下顎骨と口蓋隆起を伴う高い骨密度を起こす LRP5 変異との相関。

I型コラーゲン(CLA1)

骨組織表面に存在する骨芽細胞がコラーゲンの骨基質タンパク質を分泌する、その90%を占める CLA1 との相関。

(2) カルシウム吸収認識食育の実施

食事組成から供給される唯一の栄養成分カルシウムの供給を継続して不溶性の強靱な骨祖組織を構築する。漬物はカロリー、食物繊維、ミネラル、ビタミン群供給源として理想的な食品であるが、タンパク質成分を欠くきらいがある。ビタミンDの形で吸収された状態を改善するために、良質のタンパク質

の摂取が不可欠であることを理解させる。

免疫賦活活性更進と腸内環境の改善

中高年期時に発症する骨粗鬆症リスクを低減するためには、健全な身体のほか、ストレスの少ない精神的安定性及び健康な腸内環境の3つの因子が必要である。そのため、日々三度の食事を保障する正常な便通活動が必須である。思春期女子では、便秘もしくは排便に苦痛を・悩みを伴うものが多い。免疫活性を保持して健常な身体を保つために不可欠な食事構成として、食物繊維とカルシウムの摂取、並びに当該ミネラルの効率的な吸収・代謝に有用なタンパク質(乳製品、ヨーグルト、チーズ等)の摂取を奨励する。

3. 研究の方法

遺伝子工学的アプローチ

骨代謝遺伝子マーカー、ESRX、ESRP、LRP5、CLA1、脂肪分解エネルギー産生関与遺伝子(β 3AR)、脂肪分解性遺伝子(APOE)を選択した。骨密度測定はIn Body 解析機器を用い、集積にリアルタイムPCRを採用した。ESRX, ESRP, LRP5, CLA1 判定には、各 SNP ID に対応した probe を用いるリアルタイムPCR法によった。

乳酸菌によるカルシウム給源食の調製

乳酸菌標品は嫌気条件下で GYP 液体培地を用いて 28 で培養することにより求めた。炭素資化能は、API50CHL のほか炭素源最少培地及び MRS 培地を併用して検討した。基準株との 16S rDNA 塩基配列では、アポロン DB-BA7.0 に対する BLAST 同源性検索により検討した。

乳酸菌発酵でカルシウムを含有する漬物食品摂取による介入試験を実施した。小魚・干しエビ・海草・乳製品などカルシウム高含有を歓迎しない被験者に便秘に悩む傾向がみられることから、便秘群女子に対して乳酸菌発酵漬物を用いる2週間の継続摂取試験を供した。日常の食行動と摂取品目調査には、

解析ソフト SPSS により統計判定した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子多型と骨評価値の相関

同意を得た女子学生 44 名(平均年齢 20.2 歳)は以下のように分布していた。

ESRX は、XX:1.7%, Xx:30.9%, xx:67.4%

ESRP は、PP:36%, Pp:47.4%, pp:16.6%

LRP5 は、CC:50.3%, CT:39.4%, TT10.3%

CLA1 は、すべて AC hetero であった。

遺伝子型と骨評価値の相関

単独因子以外に ESRP/VDR 因子を掛け合わせ、Kruskal Wallis 検定を実施したところ、漸近有意確率は 0.021 であり、音響的骨評価値と ESRP/VDR 間で有意差がみられた。

遺伝子型と体脂肪率の相関

体脂肪率 CC=27.0 ± 4.56, CT=25.9 ± 5.26, TT=22.2 ± 6.33 で、CC 型ホモより、TT 型変異ホモで体脂肪率が優位に低かった。CT ヘテロより TT 変異ホモにおいて体脂肪率が低い結果が得られた (p < 0.1)。

骨評価値に対する環境因子と遺伝因子の掛け合わせ

スナック摂取頻度と LRP5 の相関ではでは摂取頻度が多く、TT ホモ変異型において骨評価値が優位に低い結果であった (p < 0.05)。歩行習慣と LRP5 の相関では、歩行習慣がなく、TT ホモ変異型において骨評価値が優位に低くなった (p < 0.05)。

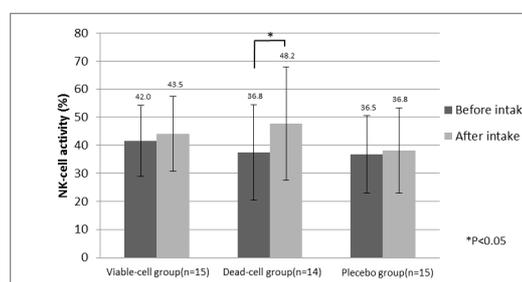
骨評価値と乳製品摂取の相関

牛乳、ヨーグルト、チーズの摂取頻度と骨評価値の間には有意な相関関係はみられなかった。結論として、変異型を有する思春期女子に対しては、当該変異型だけで、将来骨粗鬆症になると決められるわけではなく、自身の食生活と運動経験がより重要であることを十分理解させたうえで、栄養指導食育を行うことがきわめて大切であると結論した。

(2) 免疫賦活活性更進と腸内環境の改善に資するプレバイオティクス摂取

ヘテロ型乳酸菌 NSB1 発酵でカルシウム及び GABA を含有する漬物食品摂取による介入試験を実施した。被験者は、ビタミン受容体 (VDR) 遺伝子 BB 型と LRP5 変異ホモ型の遺伝素因を合わせ持つ被験者が 2%存在したが、小魚・干しエビ・海草・乳製品などカルシウム高含有食を歓迎しない被験者に便秘に悩む傾向がみられたことから、便秘群女子に対して乳酸菌発酵漬物を用いる 2 週間の継続摂取試験を供した。

予想に反し dead cells (滅菌処理した乳酸菌死菌) 試験食群に NK キラー細胞活性の昂進と便秘症状の改善がみられ、viable cells (非加熱乳酸菌) 摂取群にはまったく効果がみられないことが判明した (次図)。



便秘改善

便秘群女子 (n=15) の排便日数は 3.8 ± 1.5 から 4.9 ± 1.8 へと優位に減少するとともに、残便感が劇的に消失する効果が示された。

新規乳酸菌は *Lactobacillus buchneri* の性状と一致し、基準株 JCM1115 株に対し、99.8% の高い相同性を示した。16S rDNA 塩基配列に基づく分子解析の結果、*L. buchneri* とクラスターを形成し、93% の高いブーストラップ値で支持された。しかし primer 箇所を除く NSB1 と基準株の塩基配列間には 4 塩基の明確な相違点 (G A、C T、C T、T C) が認められた。

当該株は *L. buchneri* に最も近縁な *Lactobacillus* sp. NCCB100334 としてオランダ政府公式菌株保存機関に寄託した。免疫賦活活性測定に必須となった非侵襲性ヒ

ト唾液・口腔細胞スワブ採取に向けたスクリーニングを実施し、日内変動、個人差閾値の設定と遺伝子診断法構築を推進する対応策が望まれる。

〔学術論文〕(計 12 件)

1. Emi Nagayoshi, Kenji Ozeki, Mai Hata, Toshitaka Minetoki and Yukio Takii. Transglycosylation activity of *Aspergillus oryzae*-derived α -glucosidase. *Journal of Biological Macromolecule* **15**(1): 11- 15 (2015).
2. 永吉恵美, 山田千尋, 幸友見, 佐藤宏, 今野宏, 福本康文, 瀧井幸男 植物細胞壁崩壊酵素を生産する糸状菌の検索. 日本食品化学会誌 **20**(3): 226-230 (2013)。
3. Yukio Taki, Sayaka Nishimura, Shumi Yoshida-Yamamoto, Yuka Kobayashi and Emi Nagayoshi. Effects of intake of pickles containing *Latobacillus brevis* on immune activity and bowel symptoms in female students. *Journal of Nutritional Science and Vitamino-logy*. **59**(5): 402-411 (2013).
4. Emi Nagayoshi, Yoko Mizuta, Yukio Takii. Development of highly throughput diagnosis method for detecting ALDH2 gene by using fingernail DNA. *J. Biotechnol. Wellness Indust.* **2** 91-100 (2013).
6. Emi Nagayoshi, Haya Furuta, Keiko Fujii, Yukio Takii. Characterization of β -glucosidase produced from *Aspergillus awamori* MIBA335 *Journal of Biological Macromolecule* **11**(3): 69-82 (2011).
7. 山本周美, 西村沙矢香, 小林由佳, 瀧井幸男 GABA 含有漬物摂取による女子学生の腸内環境の改善. 食品・臨床栄養 **e2011 9-20** (2011).

8. Y. Takii, M. Yano, Y. Sakaide, S. Tsujimoto, A. Nagaike, S. Nisihimura. Differences in chitinase activity in anatomies of plant species. *Jpn J Food Chemistry and Safety* **17**, 227-230 (2010)
9. 西村沙矢香, 宮林沙希, 瀧井幸男 若年女性の隠れ肥満を形成する食行動と遺伝的要因の検討. 日本食生活学会誌 **17**, 227-230 (2010).
10. Emi Nagayoshi E, Yukio Takii and Shinichi Asano. Assignment of KP 1246, a thermophilic actinomycete strain that produces 2 distinct β -glucosidases, to *Thermomonospora curvata* *Journal of Biological Macromolecule* **12**(3): 81- 107 (2012).
11. Yamamoto, S. Nishimura, T. Okuno, M. Rakuman and Y. Takii. Efficient DNA extraction from nail clippings using the protease solution from *Cucumis melo*. *Molecular Biotechnology* **46**: 41-48 (2010).
12. S. Suzuki, M. Fukuoka, H. Ookuchi, M. Sano, K. Ozeki, E. Nagayoshi, Y. Takii, M. Matsushita, S. Tada, K. Kusumoto and Y. Kashiwabara. Characterization of *Aspergillus oryzae* hydrolase family 43 β -xylosidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **109** 115-117 (2010).

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 永吉 恵美、水谷 公彦、高橋 延行、三上文三、瀧井 幸男 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来グルコアミラーゼの X 線構造解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 28 日 岡山
2. 水田容子、永吉恵美、瀧井幸男 思春期女子のアルコール飲料に対する簡易体質判定法 日本生物高分子学会2013年度大

- 会 2013年10月20日 大阪
3. 3. 永吉恵美、瀧井幸男、關谷次郎 日本生物高分子学会2013年度大会 2013年10月20日 大阪
 4. 瀧井幸男 食の安全と健康を担う乳酸菌発酵生産物の機能と応用 日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム 2013年3月27日 仙台
 5. 瀧井幸男、井上裕美、永吉恵美、立里臨、大村聖子、關谷次郎 植物性乳酸菌 *Lactobacillus* sp. NCCB100334 の分類学的特性と GABA 生産 2012 年度日本農芸化学会関西支部大会第 476 回講演会 2012 年 6 月 9 日 亀岡
 6. 永吉恵美、三浦由貴、瀧井幸男、坪井宏、尾関健二 遺伝子組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* ET3-6 が生産する glucoamylase の酵素学的特性 2012 年度日本農芸化学会関西支部大会第 476 回講演会 2012 年 6 月 9 日 亀岡
 7. 永吉恵美、瀧井幸男 爪遺伝子診断に向けた *Bacillus* 属細菌 protease 遺伝子のクローニングと枯草菌における発現 日本生物高分子学会 2011 年度大会 2011 年月日
 8. 西村沙矢香、川崎彩、小林由佳、瀧井 抗 菌性物質生産乳酸菌のスクリーニング 日本食品化学学会第 16 回大会 2010 年 6 月 9 日 大阪
 9. 清重未来、楠田泰子、栗花落美侑、藤本寿々、西村沙矢香、瀧井幸男 爪遺伝子診断法の紹介 日本食品化学学会 16 回大会 2010 年 6 月 9 日 大阪
 10. 小林玲香、瀧川彩織、藤本寿々、西村沙矢香、瀧井幸男 未成年者飲酒予防の啓発 日本食品化学学会第 16 回大会 2010 年 6 月 9 日 大阪
 10. 水田容子、矢野めぐむ、坂出裕子、辻本紗也佳、長池亜季、西村沙矢香、瀧井幸男 柿果皮由来キチナーゼ 日本食品化学学会第 16 回大会 2010 年 6 月 9 日 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：保湿剤
発明者：瀧井幸男、福本康文
権利者：株式会社 F・E・C
種類：
番号：特許第 5 5 3 5 5 3 9 号
出願年月日：平成 21 年 7 月 10 日
取得年月日：平成 26 年 5 月 9 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧井 幸男 (Yukio Takii) 京都学園大学・
バイオ環境学部・客員研究員
研究者番号：70154937

(2) 研究分担者

關谷 次郎 (Sekiya Jirou)・京都学園大学・
バイオ環境学部・教授
研究者番号：10035123

(3) 研究分担者

山本 周美 (Syuumi Yamamoto)・武庫川女子
大学・生活環境学部・講師
研究者番号：60441234

(3) 研究分担者

西村 沙矢香 (Sayaka Nishimura)・武庫川
女子大学・生活環境学部・助手
研究者番号：00509177

(3) 研究分担者

相澤 徹 (Toru Aizawa)・武庫川女子大学・
文学部・教授
研究者番号：10340944