

カルシウム配合レモン果汁飲料摂取による
骨代謝・骨密度への影響に関する研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

令和3年3月
(2021年)

池田 ひろみ

目次

第1章 緒言

1-1	研究の背景	2
1-2	骨の構造・役割・機能	3
1-3	骨粗鬆症	5
1-4	骨代謝マーカー	8
1-5	骨密度および骨代謝に影響する栄養素	9
1-6	レモンのクエン酸による骨への効果	10
1-7	研究の目的	13

第2章 試験飲料を用いた医療機関と連携した患者介入試験

2-1	はじめに	15
2-2	対象と方法	16
2-3	結果	19
2-4	考察	28

第3章 健常な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨密度の評価

3-1	はじめに	32
3-2	対象と方法	33
3-3	結果	39
3-4	考察	43

第4章 健常な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨代謝の評価	
4-1 はじめに	46
4-2 対象と方法	47
4-3 結果	53
4-4 考察	65
第5章 本研究の総括と今後の展望	68
謝辞	75
文献	77

第1章

緒言

1-1 研究の背景

わが国では、急速な高齢化が進み、介護が必要な高齢者が増加している。特に、要介護度軽度である要支援1、2の高齢者が増加している¹⁾。平成28年の厚生労働省の調査²⁾によると、介護必要区分のうち「要支援」になる原因は、関節疾患が17.2%と最も多く、次いで高齢による衰弱16.2%、骨折・転倒15.2%、となっている。このように、加齢に伴う身体機能や運動機能の低下が多くをしめており、関節疾患と骨折・転倒を合わせると、3割を超える人が運動器障害によって要支援状態になっている。これらの身体機能や運動機能の向上・低下防止は、日常生活動作（以下ADL; activities of daily living）や生活の質（以下QOL; quality of Life）のレベルを維持するためにも重要である。特に高齢者における骨折（多くは大腿部頸部骨折）は、寝たきりにつながりやすく、骨粗鬆症で骨が脆くなっていると軽い転倒や衝撃などでも骨折の危険性が高まるため、骨折を予防することは超高齢社会において重要な課題である。

骨粗鬆症による骨量減少とそれに伴って発症する骨折は、要支援・要介護の原因となり、さらには寝たきりに至るため、社会的に大きな問題となっている。骨粗鬆症は、遺伝的要因、加齢、性別と閉経、出産歴などの個体リスク要因や、食事要因、活動強度、嗜好品などのライフスタイルにおけるリスク要因、医療・薬剤中のリスク要因などの多元的な要因によって発症する疾患である³⁾。国内の患者数は、1,280万人(女性980万人、男性300万人)と推計⁴⁾されている。

1-2 骨の構造・役割・機能

骨は、リン酸カルシウムの沈着した硬組織で構成されており、周囲の皮質骨と内部の海綿骨、関節面にある関節軟骨に分けられる。骨は、運動や身体支持といった機能を担う運動器の一部であるだけでなく、カルシウム代謝器官であり、造血幹細胞の維持・血液系細胞の分化増殖の場となる血液系器官でもある。筋肉によって駆動された随意運動や呼吸を可能とし、神経系・循環器系・内分泌系からの支配を受けると同時に、造血幹細胞を養う場を提供し、免疫担当細胞の分化増殖を支える免疫組織でもある（図 1-1）⁵⁾。血中カルシウム濃度は生命維持に直結し、内分泌系によって厳密に制御されている。ヒトを含む陸上生物は、骨組織にリン酸カルシウム塩としてカルシウムを貯蔵しており、必要に応じて骨を分解してカルシウム濃度をコントロールしている。副甲状腺ホルモン、活性化ビタミン D₃、カルシトニンのようなホルモンが骨、腸管、腎臓でのカルシウムとリンの代謝を精妙にコントロールして生体恒常性を維持しており⁵⁾、骨は人体にとってとても重要な組織であるといえる。

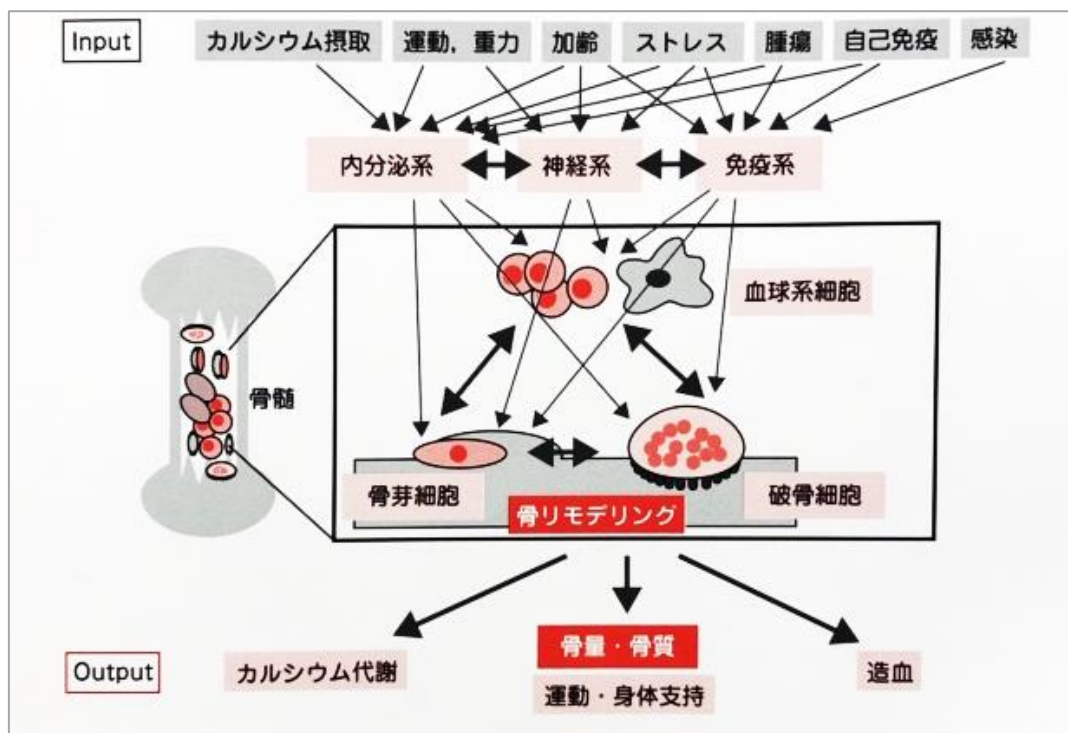


図 1-1 骨組織は外界からのさまざまな刺激入力に対して反応する複合臓器である（文献5より引用）

1-2-1 骨リモデリング

骨は、破骨と形成の絶妙なバランスによって動的な恒常性を保ちながら、常に生まれ変わっている⁶⁾。これは、骨リモデリングと呼ばれており、骨表面の破骨細胞と骨芽細胞による関連した制御システムである。骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来し、Runx2(Runt-related transcription factor 2)をはじめとする転写因子や BMP2(Bone Morphogenetic Protein-2)、Wnt などの液性因子により、巧妙にその分化が調節されている。また、破骨細胞は単球、マクロファージ系の細胞に由来する骨貪食能を有する多核の巨細胞であり、NfAT1c(Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)に代表される転写因子や、RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)などのサイトカインの作用により分化が調節されている⁷⁾。

骨リモデリング(図 1-2)は、破骨細胞が古い骨を吸収(破壊)することで開始される。成熟した破骨細胞は骨基質との吸着面に酸を分泌して無機質を溶解し、また破骨細胞が特異的に産生するタンパク質分解酵素を分泌して骨基質タンパク質を消化し、吸収窩を形成する。骨吸収が完了すると、骨芽細胞が骨表面に付着して逆転相を迎え、形成相が始まる。形成相では骨芽細胞により I 型コラーゲンやオステオカルシンなどを主成分とする骨基質タンパク質が形成された後、カルシウムやリンなどのミネラル成分の沈着により石灰化が生じ、吸収窩は新生骨で埋められる^{8,9)}。骨リモデリングは生涯にわたって繰り返されおり、骨組織は劣化を修復して強度を保ち、力学的な刺激下で生体を維持し、生体のカルシウム恒常性を維持するための供給源としての機能を果たしている。

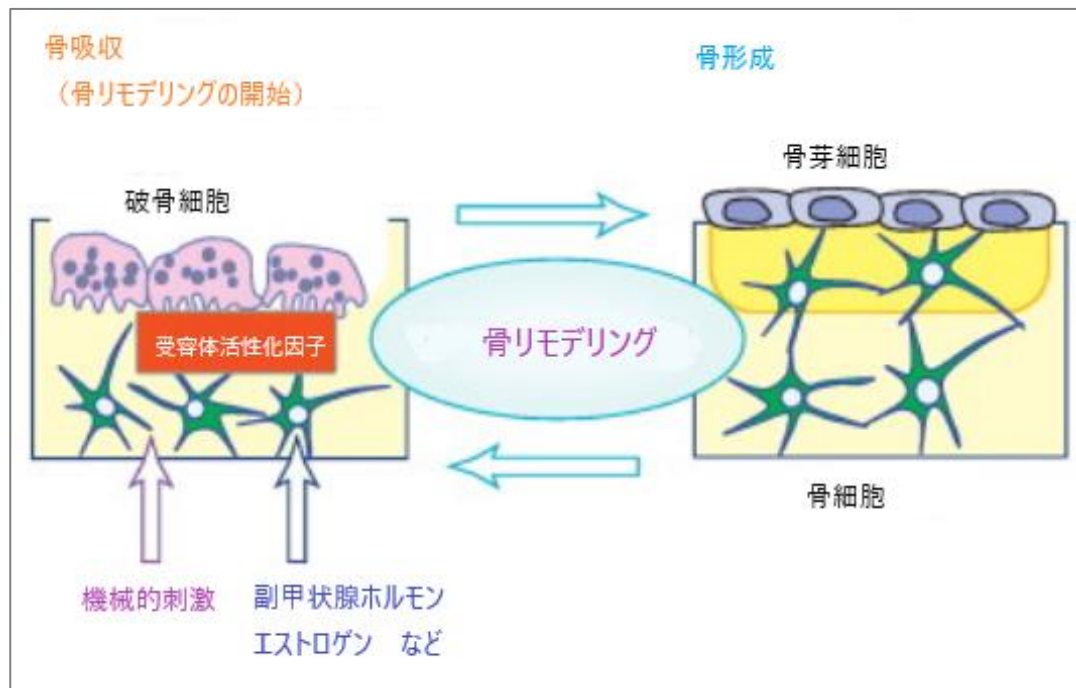


図 1-2 骨リモデリング (文献 6 より改変)

1-3 骨粗鬆症

骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる疾患と定義されている¹⁰⁾。骨強度は、主に骨密度と骨質の2つの要因からなり、骨密度は骨強度のほぼ70%を説明し、残りの30%程度は骨質により説明できる⁴⁾とされている。骨密度は、面積または体積あたりのミネラルのグラム数で表され、骨質は、微細構造、骨代謝回転、微小骨折、石灰化のことを指す。骨粗鬆症の発症のメカニズムは、骨量を低下させるメカニズムと骨質を低下させるメカニズムに分けられ、前者の例では、骨形成の低下、骨吸収の亢進、骨形成・骨吸収のカップリングの破綻、後者の例としては、骨中のコラーゲンなどの非石灰化成分の劣化および石灰化成分の微細構造以上にともなう脆弱化などが挙げられる¹¹⁾。骨強度は、骨密度と骨質により規定されているため、そのどちらかが低下しても骨強度は低下し、骨折のリスクは高くなる¹⁰⁾。

骨強度を維持するためには、骨リモデリングによる骨吸収と骨形成のバランスが保たれてはならないが、骨の石灰化に必要なカルシウム・ビタミンDの欠乏や閉経によるエ

エストロゲンの欠乏、生活習慣病による酸化ストレスの増大などによってこのバランスが崩れて骨吸収過多により骨密度が低下する。骨強度は、骨密度と骨質により規定されるため、そのどちらかが低下しても骨強度は低下する（図 1-3）。骨密度の減少や骨質の低下により骨強度が低下し骨粗鬆症が発症すると骨折しやすくなり、骨折によって身体機能の低下や運動機能障害をきたし、ADL や QOL の低下をもたらすことになる。

女性は、閉経を迎えるとエストロゲンの消退により骨吸収抑制不全をきたし、骨吸収が亢進して骨量が低下していく¹²⁾。この結果、骨代謝回転が亢進し、骨量減少が急速に進行する¹³⁾ため、閉経後女性における骨粗鬆症の頻度はきわめて高く、重篤な合併症である骨折を引き起こしやすい。また、加齢による腸管からのカルシウム吸収の低下、さらにはビタミン D 不足（摂取の低下、紫外線不足による体内での産生低下など）、腎臓でのビタミン D の活性障害による吸収の低下により負のカルシウムバランスとなる。血中カルシウム濃度の調節には、副甲状腺ホルモンが役割を担っており、骨と腎臓を主な標的臓器としている。骨において副甲状腺ホルモンは、骨芽細胞系細胞を介して破骨細胞の形成、活性を促進し、骨吸収を亢進させる⁵⁾。閉経に伴って血中カルシウム濃度が低下して負のカルシウムバランスとなると、その代償として軽度の副甲状腺機能亢進状態となり、副甲状腺ホルモンが増加し、副甲状腺ホルモンの破骨細胞機能亢進により骨よりカルシウムが供給され血中カルシウム濃度が保たれることとなる¹⁴⁾。以上のことから、血中カルシウム濃度を保つことによって骨吸収が促進され、骨量の低下につながっていくことになるため、閉経後骨粗鬆症予防のためには、骨代謝回転の亢進を抑制することが重要である。

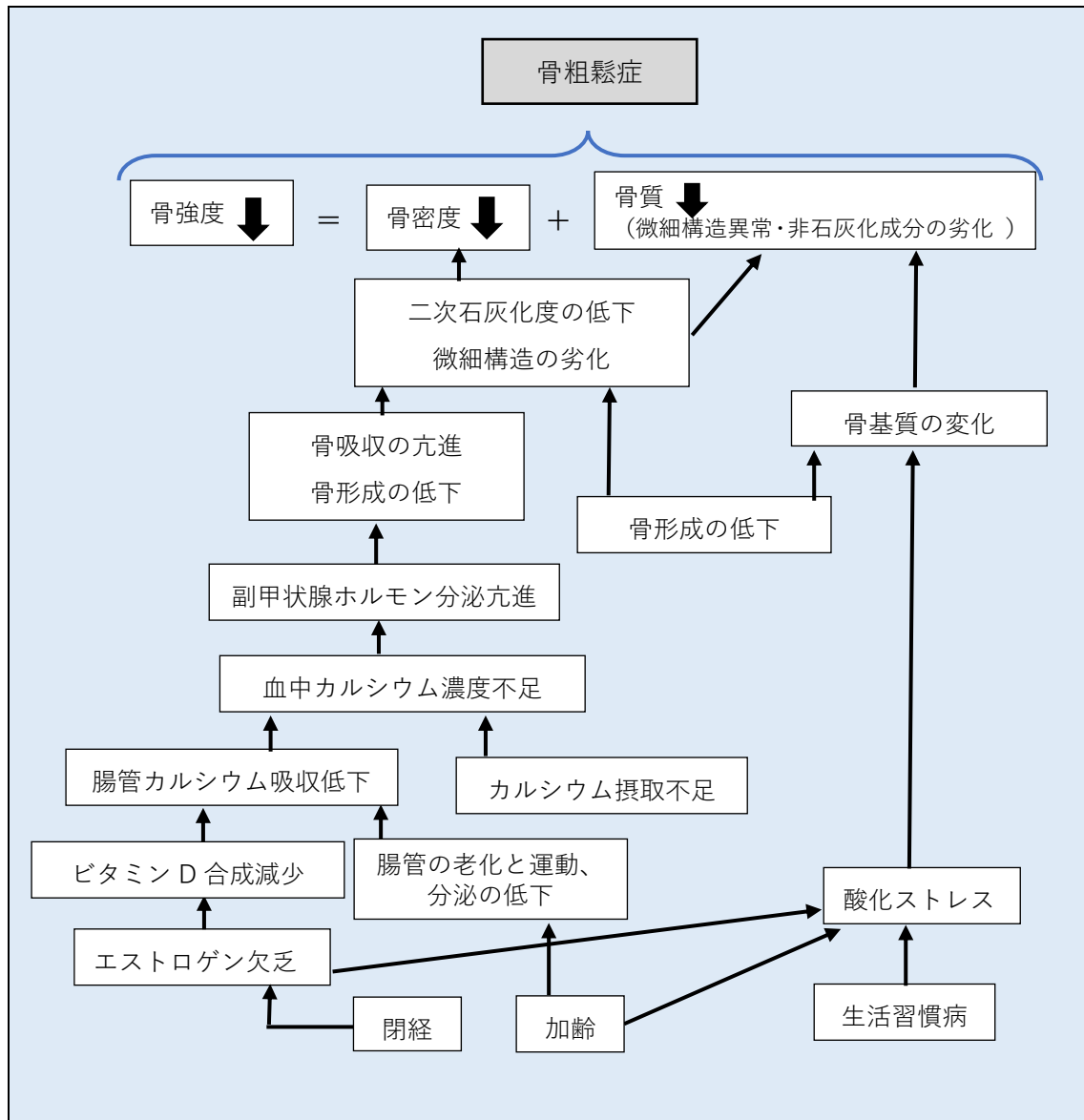


図 1-3 骨粗鬆症発症のメカニズム

1-4 骨代謝マーカー

骨代謝を評価する方法の一つとして、骨代謝マーカーがある。骨代謝マーカーは、測定時点での骨代謝を鋭敏に反映する¹⁵⁾。本研究において測定する骨代謝マーカーについて表 1-1 に示す。

表 1-1 測定した骨代謝マーカー

マーカー	略語	材料
骨形成マーカー		
骨型アルカリホスファターゼ	BAP	血清
オステオカルシン	OC	血清
骨吸収マーカー		
I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド	NTx	尿
酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ-5b	TRACP-5b	血清
骨マトリックス（基質）関連マーカー		
低カルボキシル化オステオカルシン	ucOC	血清

骨形成マーカーは、骨芽細胞の分化の各段階において骨芽細胞から直接または間接的に産生される物質である¹⁵⁾。骨形成マーカーの骨型アルカリホスファターゼ(以下 BAP)は、骨形成に関与する骨芽細胞において合成・分泌される酵素で、骨芽細胞と骨芽細胞の前駆細胞にも存在している。一方、オステオカルシン(以下 OC)は、成熟骨芽細胞を反映している¹⁶⁾。

骨吸収マーカーは、破骨細胞による骨組織の吸収・破壊の状態を反映するもので、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ-5b(以下 TRACP-5b)は、破骨細胞に局在する酸性加水分解酵素であり、破骨細胞数やその骨吸収活性の直接の指標となる¹⁷⁾。TRACP-5b は、骨吸収に直接関係し、骨吸収によってできる骨の分解産物とともに血中に放出され、ヒトでは破骨細胞のみに由来する¹⁸⁾。I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド(以下 NTx)は、I型コラーゲンの分解産物¹⁸⁾で、破骨細胞による骨吸収が起こる際に産生される。NTx は、血液検体（以下血清

NTx) および尿検体 (以下 u-NTx) から測定可能である。

骨マトリックス(基質)関連マーカーの低カルボキシル化オステオカルシン(以下 ucOC)は、骨代謝に重要なはたらきをしているビタミン K の充足状態の指標であり、骨密度とは独立した骨折予測因子である¹⁹⁾。

1-5 骨密度および骨代謝に影響する栄養素

カルシウムは 骨の重要な構成成分である。体内のカルシウムは、99%は骨と歯に、残りの1%が血液、筋肉、脳脊髄液などに含まれている。骨中のカルシウムは主としてハイドロキシアパタイト $[\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]_2$ の形で存在している²⁰⁾。血液中のカルシウム濃度は一定に保たれており、濃度が低下すると、副甲状腺ホルモンの分泌が増加し、主に骨からカルシウムが溶け出し、元の濃度に戻している²¹⁾。副甲状腺ホルモンが高い状態が続くと、骨からのカルシウム溶出が大きくなり、骨吸収が骨形成を上回り骨量が減少し、骨の空洞化が促進され、骨粗鬆症を引き起こすこととなる。

経口摂取したカルシウムは主に小腸上部で吸収されるが、その吸収率は比較的低く、成人では25~30%程度である。吸収されたカルシウムは骨への蓄積、腎臓を通しての尿中排泄の経路によって調節されている²¹⁾。

骨密度および骨代謝に影響する栄養素は、カルシウムだけでなく、ビタミン D やビタミン K も骨の健康を維持するために重要な栄養素であると言われている。

ビタミン D は、しいたけやきのこ類に含まれるビタミン D2 と魚類や卵などに含まれるビタミン D3 があり、ビタミン D3 はカルシウム代謝に重要なビタミンであると言われている²²⁾。そしてビタミン D は、食事からだけでなく、日光からの紫外線が皮膚に当たることによって、内因的に合成されるという特性がある²³⁾。ビタミン D は体内で、肝臓や腎臓で活性化されて、腸管からのカルシウムの吸収を促進し、血液中のカルシウム濃度を高め、破骨細胞の働きを抑制するはたらきがある。

ビタミン K は、納豆やパセリ・シソ・ほうれん草などの野菜に多く含まれている。ビタ

ミン K には、多種類あるが、天然のものはビタミン K1 (フィノロイキン) とビタミン K2 (メナキノン類) の 2 種類がある²⁴⁾。数種類あるビタミン K のうち、栄養学的に重要なものが、ビタミン K2 のメナキノン類であり、代表的なものは、動物性食品に含まれるメナノキン-4 と納豆が産生するメナノキン-7 である。我が国において、健康な人で通常の食生活を送っているうえでは、ビタミン K の栄養はほぼ充足していると考えられ、ビタミン K 欠乏症は発症しない。

ビタミン K は、肝臓においてプロトロンビンやその他の血液凝固因子を活性化し、血液の凝固を促進するビタミンであるが、肝臓以外にもビタミン K 依存性に骨に存在するタンパク質オステオカルシンを活性化 (活性型オステオカルシン) し、カルシウムを骨に沈着させて骨形成を促進させる作用がある²⁴⁾。しかし、非活性型オステオカルシンである ucOC は、カルシウムと結合できないため、血液中に放出される¹⁹⁾。したがって、ビタミン K の濃度変化によって ucOC が変動する。ucOC は骨マトリックス関連マーカーとして血液中の濃度を知ることができる。つまり、カルシウムと結合できない ucOC の血中濃度が高くなると、ビタミン K が作用してないということになる。このことから、ucOC 濃度は、ビタミン K の充足状態の指標とされている。

1-6 レモンのクエン酸による骨への効果

レモンといえばビタミン C が多く含まれていることでよく知られているが、ビタミン C は骨の主要成分コラーゲンの生合成にとって必須の補助因子²⁵⁾であり、ビタミン C 摂取量と骨密度との間に正の相関がある^{26,27)}ことが報告されている。さらに、レモン果汁にはビタミン C だけでなく、クエン酸が豊富に含まれている (1.44g/oz)²⁸⁾こともよく知られている。

昨今、レモンの酸味の主成分であるクエン酸には、カルシウムや鉄等のミネラル成分の吸収を促進する作用 (図 1-4)があることが明らかにされている²⁹⁻³¹⁾。クエン酸がカルシウムなどのミネラルが酸化してしまう前に包み込んで吸収させることで、体内へのカルシウ

ムの吸収を促進させる。この一連の働きを「キレート作用」と呼んでいる。「キレート」とはギリシア語で、クエン酸があたかもカニのハサミのように、ミネラル分を包み込むことがこの名前の由来と言われている。しかし、カルシウムは水に溶けにくく、人体に吸収されにくいという特徴があり、経口摂取したカルシウムのうち、腸管内で吸収されるのは、約20~40%と言われている³²⁾。そのため、カルシウムの摂取量を増加させるだけでなく、カルシウムの吸収率にも注目すべきである。したがって、クエン酸のキレート作用の効果は、骨粗鬆症予防の観点から大きな意義を持っていると考えられる。

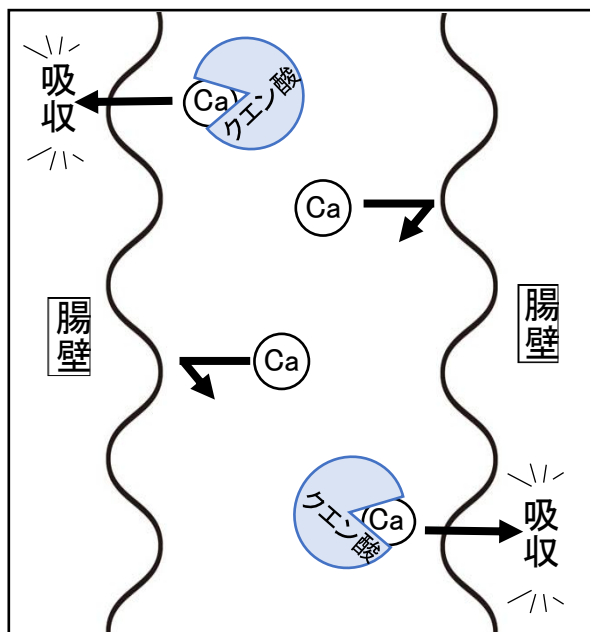


図1-4 クエン酸のキレート作用

クエン酸のキレート作用を応用し、栄養素の機能を利用した骨密度や骨代謝に対する効果の研究が行われている³³⁻³⁶⁾。Barbara³³⁾の離乳後のラットにクエン酸カルシウムまたは炭酸カルシウムを餌に加えて飼育した研究では、クエン酸カルシウム飼育では炭酸カルシウム飼育よりも海綿骨の成長が大きく、その程度は4週間後で23-25%、12週間後で44-47%ほどであったことが報告されている。Pengpengら³⁴⁾のラットの研究では、タンパク

質加水分解物-カルシウムキレート (Protein Hydrolysate-Calcium Chelate) を用いて、骨吸収の抑制と骨密度の増加を認めている。そして、新居ら³⁵⁾は、柑橘類のジュース (レモンジュースを含む) のクエン酸が *in vitro* でシラスボシ (沸騰および半乾燥しらす) に存在するカルシウムを可溶化できることを示唆している。

このように、カリウムやカルシウムを吸収するクエン酸のキレート作用や、これらの骨密度や骨代謝への影響は明らかになっているが、カルシウム吸収のクエン酸の効果として健康な人を対象とした骨密度や骨代謝の研究はあまり行われていない。堂本ら³⁷⁾は、瀬戸内島嶼部の柑橘栽培農家の中高年女性と地方都市居住の中高年女性における骨密度を比較している。この研究では、島嶼部柑橘栽培農家の中高年女性の大腿骨骨密度が有意に高く、居住する生活環境 (柑橘類を豊富に食することが可能であることや労働形態) が影響している可能性を強く示唆している。しかし、柑橘類の豊富な摂取が日常の食事でのカルシウム吸収を促進させている可能性を示唆しているものの、実際のカルシウムや柑橘類の摂取量は不明であり、健康な人におけるカルシウム吸収のクエン酸の骨への効果については明らかにされていない。Jehleら³⁶⁾は、65歳以上の健康な男女201名に対し、カルシウムとビタミンDを一定量与え、クエン酸カリウムの負荷有無の比較を行った結果、負荷ありの群で腰椎骨密度の増加を認めているが、骨代謝マーカーの評価にI型プロコラーゲン-N-プロペプチド (P1NP) を用いている。P1NPは、骨基質たんぱく質の主成分であるI型コラーゲンが前駆体のI型プロコラーゲンから生成される際にN末端から切断されるポリペプチドであるが、I型コラーゲンは骨以外の軟部組織の線維芽細胞などにおいても合成される³⁸⁾ため、評価においては注意が必要となる。本研究では、近年骨吸収に鋭敏に反応するTRACP-5bや未熟な骨芽細胞の前駆細胞に存在し、骨芽細胞系の全細胞数を反映する³⁹⁾と言われているBAPを評価項目として用いることにより、データの信頼性を高めることとした。

1-7 研究の目的

本研究では、閉経後女性を対象として、

1. 医療機関と連携し、試験飲料（カルシウム配合レモン果汁飲料）を用いた臨床研究を行い、ミネラル成分を吸収するクエン酸のキレート作用の効果を前腕骨骨密度・骨代謝にて検証を行う。
2. 骨粗鬆症の予防の観点から、健常者を対照群、レモン果汁のみの飲料を摂取する群、カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する群に分類して介入試験を行い、骨密度と骨代謝への影響について検証を行う。

以上のことを目的としておこなった。

第2章

カルシウム配合レモン果汁飲料を用いた 医療機関と連携した臨床研究

2-1 はじめに

骨粗鬆症の研究は、投薬による研究が広く行われている。吉田ら⁴⁰⁾は、閉経後早期女性119名を対象とし、骨でエストロゲン作用を示す治療薬であるラロキシフェン(RLX)を6ヶ月間投与することにより、骨吸収マーカーである血清 NTx 濃度は1ヶ月で高率に低下し、骨形成マーカーの BAP 濃度の減少も認めていたと報告している。Wallach ら⁴¹⁾は、コルチコステロイド療法を受けている患者(男女518名)がビスフォスフォネート系治療薬であるリセドロネートの12ヶ月間の投与により、血清 NTx 濃度と BAP 濃度の減少を認め、腰椎および大腿骨骨密度値は、有意に増加、あるいは維持できていたと報告している。骨は、骨リモデリングによる骨吸収と骨形成のバランスを保っているが、骨粗鬆症ではこのバランスが崩れ、骨吸収過多により骨密度が低下していく。これらの先行研究における治療薬の効果は、破骨細胞による骨吸収を抑制し、それに伴い骨形成も抑制された結果、骨密度の増加あるいは維持につながっていることが推測される。

しかしながら、薬物療法は、骨粗鬆症(若年成人平均値(以下YAM; Young Adult Mean)70%未満)の診断がなければ処方されず、すでに骨折のリスクが高まっている状態であるため、骨粗鬆症と診断される前の段階から予防することが重要であり、予防医学の観点から生活習慣、特に食習慣と運動習慣は重要とされる⁴²⁻⁴⁴⁾。閉経後女性を対象としたカルシウム補給の32件の対照試験レビュー⁴⁵⁾では、骨量または骨密度値の変化率について報告している。カルシウムの効果は、すべての測定部位(前腕/手、近位大腿骨、脊椎、全身など)でほぼ同じで、700mg未満のサプリメントは骨量減少あるいは骨密度減少に効果的ではなく、毎日約1,000mgのカルシウム補給は、閉経後女性の骨量減少に対して少なくとも4年間は有意な予防効果があると報告している。これらの研究は、カルシウム補給による骨密度値の変化率について明らかにされているが、骨代謝については言及されていない。一方、食事による酸負荷は、骨粗鬆症の病態生理において重要な役割を果たす可能性があり、クエン酸のキレート作用を応用し、栄養素の機能を利用した骨代謝や骨密度に対する効果の研究が行われている。Pengpeng ら³⁴⁾は、ラットの研究でタンパク質加水分解物-カルシウムキレー

ト (Protein Hydrolysate-Calcium Chelate) を用いて、骨吸収の抑制と骨密度の増加を認めている。そして、新居ら³⁵⁾は、柑橘類のジュース (レモンジュースを含む) のクエン酸が *in vitro* でシラスポシ (沸騰および半乾燥しらす) に存在するカルシウムを可溶化できることを示唆している。このように、カルシウムを吸収するクエン酸のキレート作用や、これらの骨密度や骨代謝への影響は明らかになっているが、カルシウム吸収のクエン酸の効果として閉経後女性を対象とした骨密度や骨代謝の研究はあまり行われていない。

そこで、この章では、カルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料の摂取による、骨密度・骨代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、閉経後女性患者を対象として試験飲料を6ヶ月間継続摂取した場合の有効性の検証を臨床研究にて行った。

2-2 対象と方法

2-2-1 対象

対象は、医療機関と連携し、福祉施設・福祉施設関係者に呼びかけ、ボランティアを募集した。参加者には、事前に研究内容及び方法などに関する十分な説明を行い、文書により44名の同意を得た (整形外科通院患者で骨粗鬆症患者を除く)。44名の調査対象者のうち、閉経している40名を解析対象とした。本研究はヘルシンキ宣言に従い、県立安芸津病院倫理委員会の承諾のもとに行われた (承認番号 平成26年度第1号)。

2-2-2 試験飲料

試験飲料の主成分量の設定を表2-1に示す。対象者は、200mlの試験飲料を1日1本継続摂取した。摂取時間の指定はしなかった。カルシウムの成人女性の1日摂取目安量は700mg程度⁴⁶⁾であり、1日摂取目安量の半分である350mgを摂取量とした。レモン果汁については、堂本ら³⁷⁾が行った広島県のレモン産地住民を対象とした健康調査において、1日のレモン摂取量の多い群は、摂取量の少ない群と比較して、血圧が有意に低くなることが明らかにされており、レモン摂取量の多い群の1日平均レモン摂取量が約30mlであったこと

から、レモン果汁の摂取量を 30 ml と設定した。

表 2-1 試験飲料の成分組成

摂取量	200/日
エネルギー (kcal/本)	50
カルシウム (mg/本)	350
レモン果汁 (ml/本)	30
クエン酸 (g/本)	約 1.5

2-2-3 調査項目

問診により年齢、閉経後経過年数を同定した。身体計測、骨密度値・骨代謝マーカー濃度の測定を行った。

身体計測では、身長、体重、body mass index(以下 BMI)を測定した。

骨密度は X 線骨密度測定装置 DTX-200 (東洋メディック) を使用し、前腕遠位部の骨密度値の測定を行った。調査期間の変動係数は、0.273%であった。

骨代謝マーカーは、骨吸収マーカーとして、TRACP-5b 濃度、u-NTx 濃度の測定を行った。骨形成マーカーとして、BAP 濃度、OC 濃度の測定を行った。骨マトリックス関連マーカーとして、ucOC 濃度の測定を行った。

TRACP-5b・BAP・OC・ucOC 濃度の測定用血清試料は、採取した血液より 3000 回転 7 分間の条件で遠心分離して得たのち、市販の測定キットを用いて測定した。u-NTx 濃度測定用尿試料は、採尿後前処置なしで市販の測定キットを用いて測定した。血清および尿中の測定は(株)福山臨床検査センターに依頼した。血清試料 TRACP-5b 濃度はオステオリンクス「TRAP-5b」(NITTOBO MEDICAL CO., LTD.)、BAP 濃度はアクセス オスターゼ(BECKMAN COULTER CO., LTD.)、OC 濃度は BGP IRMA「エルエスアイ M」(LSI Medience CO., LTD.)を用いて測定した。u-NTx 濃度は OSTEOMARK(ALERE MEDICAL CO., LTD.)を用いて測定した。ucOC 濃度は Picolumi ucOC(EIDIA CO.,

LTD.)を用いて測定した。

2-2-4 調査期間と測定時期

調査期間は2014年10月～2015年4月とした。身体計測、骨密度値の測定は介入前の調査開始時、飲料摂取3ヶ月後、6ヶ月後に行い、骨代謝マーカー濃度の測定は介入前の調査開始時、飲料摂取1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後に行った(表2-2)。対象者は200mlの試験飲料を1日1本、6ヶ月間継続して摂取した。

表2-2 調査期間と測定時期

介入前検診	摂取1ヶ月後検診	摂取3ヶ月後検診	摂取6ヶ月後検診
2014年10月	2014年11月	2015年1月	2015年4月
・身体計測	・骨代謝マーカー濃度	・身体計測	・身体計測
・骨密度値		・骨密度値	・骨密度値
・骨代謝マーカー濃度		・骨代謝マーカー濃度	・骨代謝マーカー濃度

2-2-5 対象者の分類

介入前の調査開始時の骨密度値の測定結果より、YAM70%未満を低値群、70%以上を高値群として、対象者を2群に分類した。

2-2-6 統計解析

得られたデータはShapiro-Wilk検定により正規性の検定を行った。得られた評価項目のデータは、正規性が認められた場合は平均値(標準偏差)で表し、正規性が認められなかった場合は中央値(25%-75%)で表した。

試験飲料と測定値(骨密度値及び骨代謝マーカー濃度)の調査期間との関連について、正規性が認められた場合は年齢とBMIを調整し、高値群・低値群の2群と調査期間(介入前の調査開始時、摂取1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後の個人内水準)を二要因、測定値(骨密度値及び骨代謝マーカー濃度)を従属変数とする二元配置分散分析をおこなった。その後、

各群において Bonferroni の多重比較を行った。正規性が認められなかった場合には、高値群・低値群各々で Friedman 検定を行った後、すべてのペアごとの多重比較を行った。

統計解析には SPSS バージョン 23 (IBM Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

2-3 結果

2-3-1 介入前の身体的特徴の比較

対象者の身体的特徴を表 2-3 に示した。いずれの項目においても、骨密度値の低値群と高値群との間に有意な差はなかった。

介入前の骨密度値および骨代謝マーカー濃度の測定値を表 2-4 に示した。骨密度値は高値群より低値群の方が有意に低く ($p < 0.001$)、u-NTx 濃度は低値群の方が有意に高値 ($p = 0.012$)であった。

表 2-3 対象者の身体的特徴

	高値群 (n=27)	低値群 (n=13)	Total	p 値
年齢 (歳)	62.1 (8.8)	67.6 (7.1)	63.9 (8.6)	0.055
	50.0 - 78.0	52.0 - 79.0	50.0 - 79.0	
閉経後経過 (年)	11.7 (8.2)	16.2 (6.8)	13.3 (8.0)	0.068
	0.0 - 25.0	4.0 - 26.0	0.0 - 26.0	
身長(cm)	154.2 (5.1)	152.4 (6.5)	156.3 (5.6)	0.351
	145.4 - 169.3	143.3 - 163.0	143.3 - 169.3	
初回体重(kg)	55.3 (8.3)	50.8 (6.7)	53.9 (8.1)	0.101
	45.2 - 80.0	39.0 - 60.0	39.0 - 80.0	
初回 BMI ¹	23.2 (2.9)	22.0 (3.3)	22.8 (3.1)	0.223
	18.6 - 31.4	17.3 - 26.7	17.3 - 31.4	

値：平均値 (標準偏差) 最小値-最大値

p 値：Student t-test

¹Body mass index

表 2-4 介入前の骨密度値および骨代謝マーカー濃度

	高値群 (n=27)	低値群 (n=13)	p 値
前腕骨骨密度値 (g/cm ²)	0.42 (0.06) 0.34 - 0.56	0.28 (0.04) 0.21 - 0.32	<0.001 ^a
TRACP-5 b ¹ (mU/dL)	393.2 (108.7) 175.0 - 573.0	460.2 (102.7) 282.0 - 613.0	0.071 ^a
骨代謝マーカー 濃度	u-NTx ² (nmol BCE/mmol/Cr) * 28.5 (21.7-34.0)	40.0 (28.5-52.0)	0.012 ^c
OC ³ (ng/ml)*	6.0 (5.0-7.3)	7.5 (5.2-8.0)	0.319 ^b
BAP ⁴ (μg/L) *	13.0 (11.7-16.2)	16.0 (11.3-19.6)	0.124 ^b
骨マトリックス 関連マーカー濃度	ucOC ⁵ (ng/mL)* 4.0 (3.4-5.0)	4.2 (3.0-6.5)	0.474 ^b

値：平均値（標準偏差）最小値-最大値

*：中央値（25%-75%）

^a Student t-test

^b Welch's test

^c Mann-Whitney's U test

¹ Tartrate-resistant acid phosphatase type 5b

² Urinary type I collagen cross-linked N-telopeptide

³ Osteocalcin

⁴ Bone alkaline phosphatase

⁵ Undercarboxylated osteocalcin

2-3-2 骨密度値の変化

骨密度値について、期間要因および交互作用では統計学的有意に異ならなかった ($p=0.678, p=0.968$) が、被験者間要因においては統計学的有意であった ($p<0.001$)。高値群では、介入前、摂取3ヶ月後、摂取6か月後のどの時期においても有意な変化は見られなかった。低値群では、介入前と摂取3ヶ月後では、有意差はないが増加傾向 ($p=0.054$) にあり、摂取6ヶ月後は3ヶ月後と比較して差はみられなかった(図2-1)。

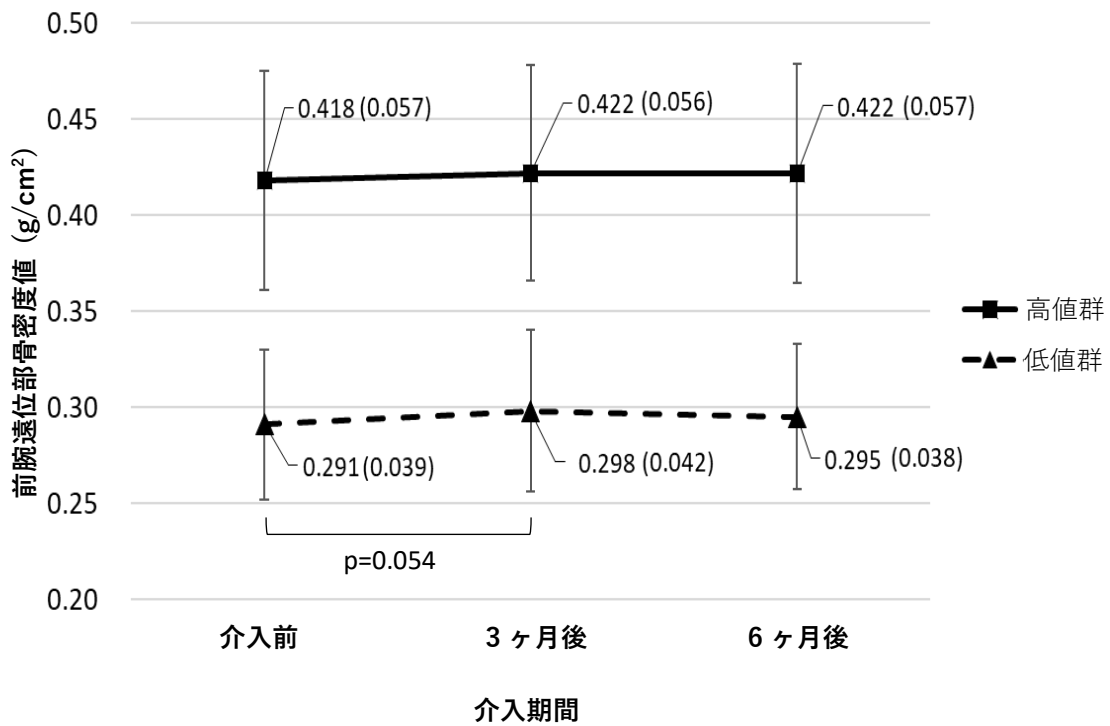


図2-1 骨密度値の変化

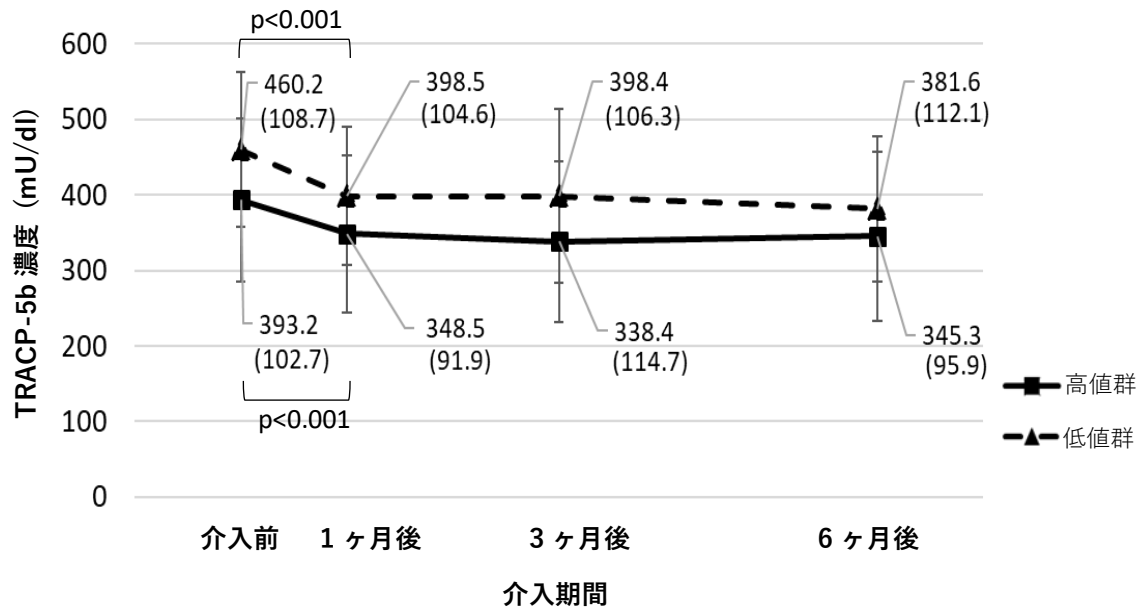
二元配置分散分析 期間要因： $p=0.678$ 被験者間要因： $p<0.001$ 交互作用： $p=0.968$
Bonferroni 多重比較 低値群 介入前 vs 3ヶ月後： $p=0.054$

2-3-3 骨代謝マーカーの変化

骨吸収マーカーの TRACP-5b 濃度について、交互作用では統計学的有意に異ならなかった($p=0.649$)が、期間要因および被験者間要因においては統計学的有意であった($p=0.002$, $p=0.003$)。介入前と比較して摂取 1 ヶ月後には両群とも有意に減少(高値群 $p<0.001$, 低値群 $p<0.001$)し、摂取 3 ヶ月後、6 ヶ月後は摂取 1 ヶ月後と比較して有意な変化はみられなかった(図 2-2)。u-NTx 濃度 について、高値群は介入前から 6 ヶ月後までの値に差があり ($p<0.001$)、低値群では差は認められなかった($p=0.250$)。高値群は、介入前および 1 ヶ月後と比較して、摂取 6 ヶ月後は有意に高値 ($p=0.008$, $p<0.001$) であった (図 2-3)。

骨形成マーカーの OC 濃度について、高値群は介入前から 6 ヶ月後までの値に有意差があり ($p=0.002$)、低値群では有意差は認められなかった($p=0.115$)。高値群は、介入前と比較して摂取 6 ヶ月後には有意に減少($p=0.007$)していた(図 2-4)。BAP 濃度について、高値群と低値群とも、介入前から 6 ヶ月後までの値に有意差があり ($p<0.001$)、高値群は、介入前と比較して摂取 1 ヶ月後に有意に増加し($p=0.001$)、摂取 3 ヶ月後に有意に減少 ($p<0.001$)していた。摂取 6 ヶ月後は、摂取 3 ヶ月後と比較して有意差はなかった。低値群は、介入前と比較して摂取 3 ヶ月後に有意に減少($p<0.001$)し、摂取 6 ヶ月後は摂取 3 ヶ月後と比較して有意差はなかった (図 2-5)。

骨マトリックス関連マーカーの ucOC 濃度について、高値群、低値群ともに介入前から 6 ヶ月後までの値に有意差があり ($p<0.001$)、高値群、低値群ともに、介入前と比較して、摂取 3 ヶ月後には有意に減少(高値群 $p<0.001$, 低値群 $p=0.001$)し、摂取 6 ヶ月後は摂取 3 ヶ月後と比較して有意差はなかった(図 2-6)。



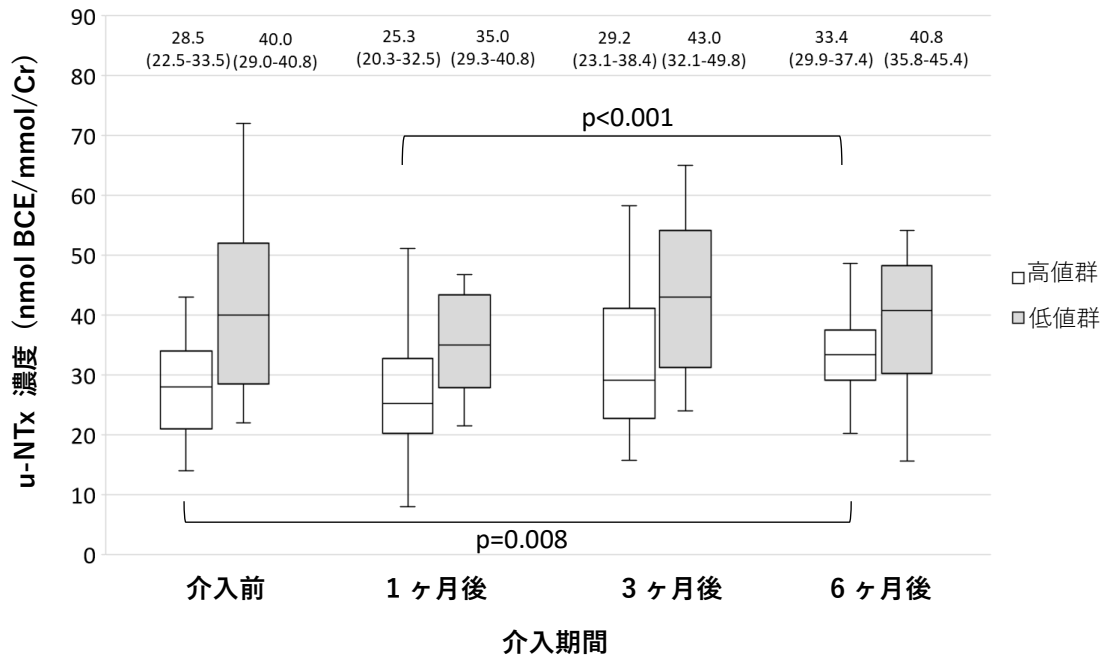
	介入前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
高値群	460.2 (108.7)	398.5 (104.6)	398.4 (106.3)	381.6 (112.1)
低値群	393.2 (102.7)	348.5 (91.9)	338.4 (114.7)	345.3 (95.9)

図 2-2 TRACP-5b 濃度の変化

二元配置分散分析 期間要因： $p=0.002$ 被験者間要因： $p=0.003$ 交互作用： $p=0.649$

Bonferroni 多重比較 高値群 介入前 vs 1ヶ月後： $p<0.001$

低値群 介入前 vs 1ヶ月後： $p<0.001$

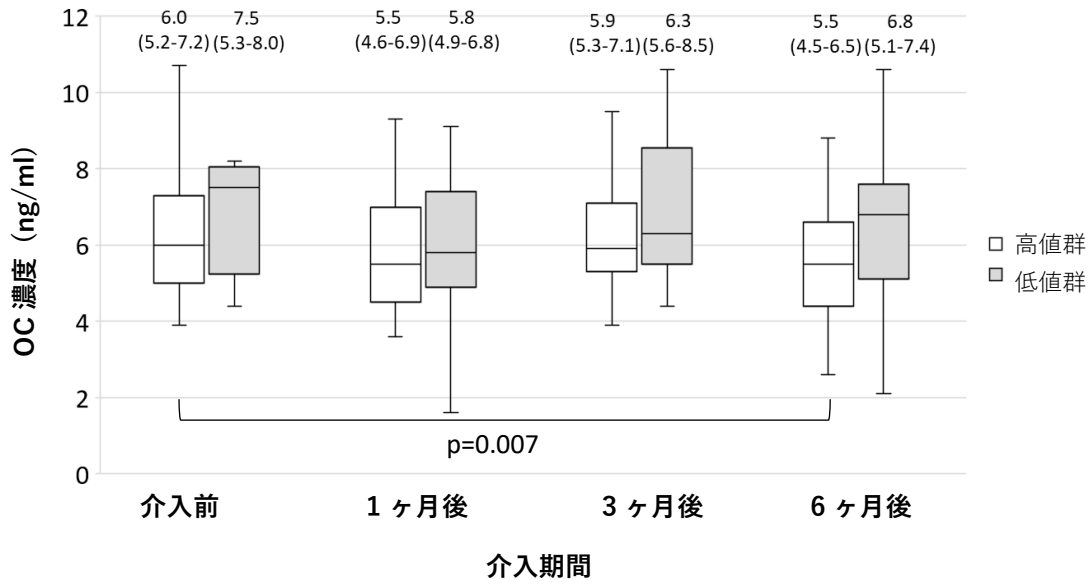


	介入前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
高値群	28.5 (22.5-33.5)	25.3 (20.3-32.5)	29.2 (23.1-38.4)	33.4 (29.9-37.4)
低値群	40.0 (29.0-40.8)	35.0 (29.3-40.8)	43.0 (32.1-49.8)	40.8 (35.8-45.4)

図 2-3 u-NTx 濃度の変化

Friedman 検定 高値群：p<0.001, 低値群：p=0.250

多重比較 高値群 介入前 vs 6ヶ月後：p=0.008, 1ヶ月後 vs 6ヶ月後：p<0.001

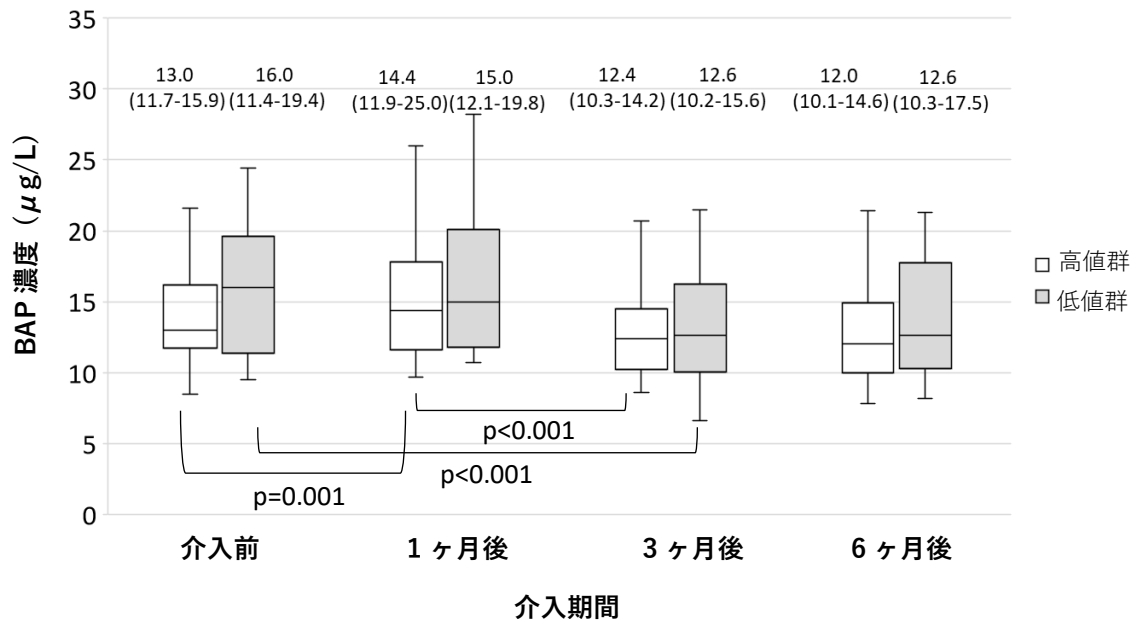


	介入前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
高値群	6.0 (5.2-7.2)	5.5 (4.6-6.9)	5.9 (5.3-7.1)	5.5 (4.5-6.5)
低値群	7.5 (5.3-8.0)	5.8 (4.9-6.8)	6.3 (5.6-8.5)	6.8 (5.1-7.4)

図 2-4 OC 濃度の変化

Friedman 検定 高値群 : $p=0.002$, 低値群 : $p=0.115$

多重比較 高値群 介入前 vs 6ヶ月後 : $p=0.007$



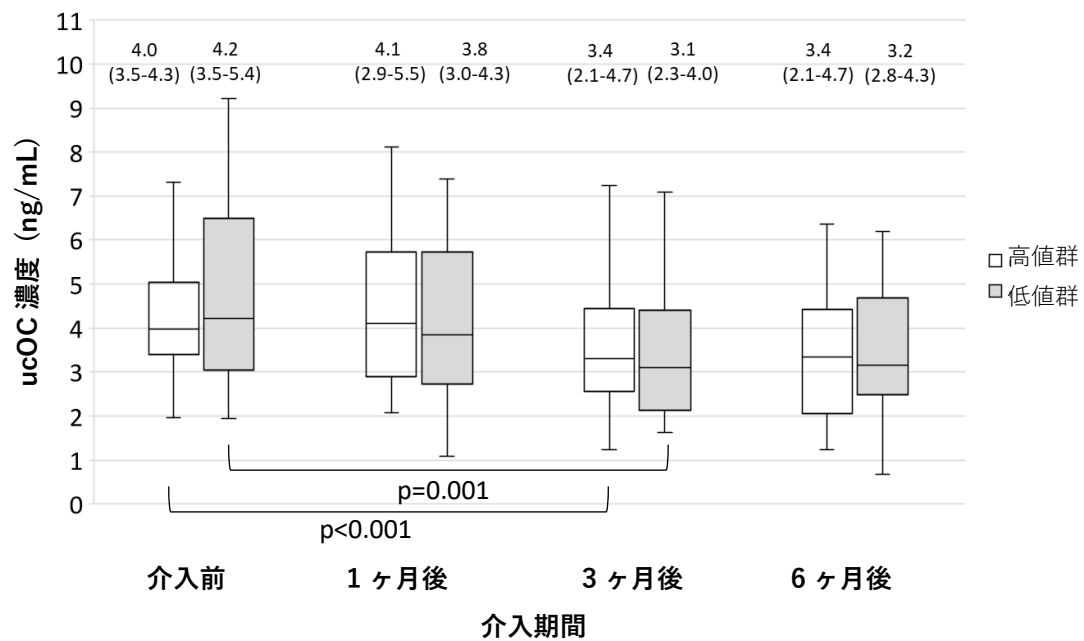
	介入前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
高値群	13.0 (11.7-15.9)	14.4 (11.9-25.0)	12.4 (10.3-14.2)	12.0 (10.1-14.6)
低値群	16.0 (11.4-19.4)	15.0 (12.1-19.8)	12.6 (10.2-15.6)	12.6 (10.3-17.5)

図 2-5 BAP 濃度の変化

Friedman 検定 高値群 : $p < 0.001$, 低値群 : $p < 0.001$

多重比較 高値群 介入前 vs 1ヶ月後 : $p = 0.001$, 1ヶ月後 vs 3ヶ月後 : $p < 0.001$

低値群 介入前 vs 3ヶ月後 : $p < 0.001$



	介入前	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後
高値群	4.0 (3.5-4.3)	4.1 (2.9-5.5)	3.4 (2.1-4.7)	3.4 (2.1-4.7)
低値群	4.2 (3.5-5.4)	3.8 (3.0-4.3)	3.1 (2.3-4.0)	3.2 (2.8-4.3)

図 2-6 ucOC 濃度の変化

Friedman 検定 高値群： $p < 0.001$ ，低値群： $p < 0.001$

多重比較 高値群 介入前 vs 3ヶ月後： $p < 0.001$

低値群 介入前 vs 3ヶ月後： $p = 0.001$

2-4 考察

先行研究によると、カルシウムの摂取により骨吸収マーカー指標は有意に減少したとする報告⁴⁷⁾と有意な変化はみられなかったという報告⁴⁸⁾があり、先行研究の知見は一致していない。Matsumoto ら⁴⁷⁾は、20~60歳の男女を対象とし、2ヶ月間アカモク抽出物の摂取により、骨吸収マーカー指標の酒石酸骨耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) 濃度および血清 NTx 濃度は有意に減少したと報告している。また、栗原ら⁴⁸⁾は、68名の要介護高齢者を対象とし、1ヶ月間カルシウム 200mg を含むゼリーの摂取で、骨吸収マーカー TRACP-5b 濃度は有意な変化はみられなかったと報告している。そして、Kamel ら⁴⁹⁾は、閉経後女性を対象とし、2ヶ月間カルシウムを 1200mg 摂取し、1ヶ月目には尿中の骨吸収マーカー指標であるピリジノリン濃度、デオキシピリジノリン濃度、尿 I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド濃度、u-NTx 濃度は有意に減少し、尿中ヒドロキシプロリン濃度は2ヶ月目に有意に減少したと報告している。我々の検証では、閉経後女性を対象として、TRACP-5b 濃度の平均値は、高値群、低値群いずれも介入前と比較すると、摂取1ヶ月後に有意に減少し、その後の変化はみられなかった。このことから、Kamel らの研究と同様の結果であり、本研究は支持される。これは、クエン酸によるキレート作用によってカルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が補充かつ一定に保たれたためと考えられる。すなわち、血中カルシウム濃度低下による骨からのカルシウム供給が必要なくなり、破骨細胞の代謝マーカーである TRACP-5b 濃度が減少したと考えられる。しかしながら、u-NTx 濃度においては、高値群では、飲料摂取1ヶ月後と比較して6ヶ月後に有意に増加しており、TRACP-5b 濃度では有意に減少するという結果となっており、これら同じ骨吸収マーカーの2種類において異なる結果となった。u-NTx は、骨基質の主要構成蛋白である I 型コラーゲンの分解産物であり、ピリジノリンあるいはデオキシピリジノリンと呼ばれる物質を介して安定な架橋構造を形成している。したがって、骨吸収による分解によって生成される2次的な代謝物質として血中に放出され、その後尿中に排出される⁵⁰⁾。また、尿中での測定のため、生理的変動が大きく、腎機能低下の影響を受ける可能性が考えられる¹⁸⁾。TRACP-5b は、骨吸収に

直接関係し、骨吸収によってできる骨の分解産物とともに血中に放出され、ヒトでは破骨細胞のみに由来する⁵¹⁾。したがって、破骨細胞に直接由来する物質と考えられる。以上のことから、カルシウム配合レモン飲料摂取によって TRACP-5b 濃度が低値を示し骨吸収が抑制されたことは新規的であると考えられる。

骨形成マーカーの OC 濃度は、高値群で介入前と比較して飲料摂取 6 ヶ月後に有意に減少した。BAP 濃度は高値群では、飲料摂取 1 ヶ月後に有意に増加したのち、3 ヶ月後に有意に減少し、低値群では介入前と比較して飲料摂取 3 ヶ月後に有意に減少していた。骨は、第1章で述べた通り、骨リモデリングによって破骨細胞が古い骨を吸収（破壊）することで開始され、骨芽細胞がその欠失部分に骨基質を分泌し充填する^{52,53)}ことによって維持されている。そのため、本研究では、破骨細胞の代謝マーカーである TRACP-5b 濃度が先に述べた（クエン酸のキレート作用によりカルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が補充され一定濃度に保たれたという）理由で減少したことが考えられ、骨芽細胞の代謝マーカーである OC 濃度および BAP 濃度は、骨吸収抑制効果の結果として骨芽細胞の合成も抑制されたものと考えられる。

OC は、ビタミン K の作用のもとで、骨芽細胞により合成され、骨の非コラーゲン性蛋白の中で最多のカルシウム結合蛋白⁵⁴⁾であり、分化した骨芽細胞機能を反映するとされている。そしてビタミン K 不足状態では、グルタミン酸残基が γ -カルボキシグルタミン酸残基に変換されないため、骨基質に取り込まれず ucOC として血中に放出される。そのため、ucOC は骨におけるビタミン K 作用不足の指標とされている⁵⁵⁾。したがって、ucOC 濃度の低下は OC が作用している証拠となる。このことから、今回の検証で OC 濃度は高値群で飲料摂取 6 ヶ月後に減少し、BAP 濃度は両群とも飲料摂取 3 ヶ月後に減少していたことから、骨芽細胞の機能は維持されていると考えられる。

今回の対象者の平均年齢は 63.9 歳で、平均閉経後経過年数は 13.3 年であった。女性ホルモンであるエストロゲンは、更年期および閉経後女性において、骨量に影響を及ぼすと言われている^{56,57)}。そして、エストロゲンが不足している状態である更年期および閉経後女性

は、骨粗鬆症になる危険性が高い^{41,58,59)}。Wallach⁴¹⁾らの報告では、コルチコステロイド療法を受けている患者の腰椎骨密度値、大腿骨頸部骨密度値において、初回測定値と比較して6ヶ月後の値は、どちらも有意 ($p<0.001$) に減少していた。しかし、今回の検証結果では、骨密度値は減少する年齢にもかかわらず高値群、低値群とも、減少はみられず、高値群では上昇した値を維持できていた。

骨粗鬆症の診断基準は、YAM70%未満とされている。日本では、2011年に骨粗鬆症に罹患したと推定される患者は、1,280万人と推定⁴⁾され、骨粗鬆症の発生率は最近の数年間で大幅に増加しており、今回の対象者の約1/3のものがYAM70%未満で、骨密度値が低いものが多かった。そして、今回は前腕骨遠位部の骨密度値を評価したが、骨粗鬆症による骨折を評価するには、二重エネルギーX線吸収測定（以下 DEXA; Dual Energy X-ray Absorptiometry）法による腰椎や大腿骨といった躯幹骨の骨密度評価が推奨されている^{60,61)}。また、飲料を摂取しない対照群との比較やレモン果汁のみでも効果があるのか、レモン果汁にカルシウムを配合したものが効果的であるのかを検討する必要がある。ビスフォスフォネートなどの治療薬は、骨粗鬆症の診断がないと処方されないが、本飲料は疾患の有無にかかわらず摂取することができ、摂取することで将来の骨粗鬆症予防の効果が期待できる。そのため、骨粗鬆症の予防の観点から、上記の課題を解決し、健常者を対象とした長期的な介入試験が必要とされる。

第3章

健常な閉経後女性における試験飲料介入試験 による骨密度の評価

3-1 はじめに

骨粗鬆症はサイレント・ディジーズ（静かな病気）といわれており、自覚症状が現れないため気づきにくく、腰痛や背部痛により受診した際や、骨折によって初めて認識する疾患である。腰痛や背部痛などの症状が出現しても、単なる老化現象として考えてしまいがちで、治療に結びつかないことも問題となる。したがって、症状が出現してから対処するのではなく、健常な時期から予防をしていくことが重要となる。

第2章では、閉経後女性患者を対象として、カルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料の摂取による、骨密度・骨代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、試験飲料を6ヶ月間継続摂取した場合の有効性を検証した。その結果、骨代謝回転の亢進が抑制されたことが推察され、骨密度は減少する年齢にもかかわらず減少は認められず、維持できていた。このことは、クエン酸によるキレート作用によってカルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が保たれたことにより骨吸収が抑制され、骨密度が維持されたと推察される。このように、閉経後女性におけるカルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料による破骨細胞の抑制および骨密度維持が見込まれるが、レモン成分による効果なのか、レモンのクエン酸によるキレート作用のカルシウム吸収促進効果なのかは不明であった。そして、前腕骨遠位部による骨密度評価を行ったが、骨粗鬆症による骨折を評価するためには、腰椎や大腿骨といった躯幹骨の評価が推奨されており^{60,61)}、骨粗鬆症予防の観点から、健常者を対象とした長期的な介入試験が必要であるという課題が残された。そこで、この章では、健常な閉経後女性を対象として、カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する群、カルシウム配合なしレモン果汁飲料を摂取する群、飲料を摂取しない群の3群に分類し、試験飲料の継続的な摂取が骨密度へ及ぼす影響について検討することとした。

3-2 対象と方法

3-2-1 対象

対象は、M 市広報により健常な閉経後女性をボランティアとして募集した。除外基準は、(1)心筋梗塞・脳梗塞、肝・腎機能障害などの重篤な疾患を合併している者、(2)ワーファリンの服薬を行っている者（試験飲料の摂取が薬効に影響を及ぼす可能性があるため）、(3)試験責任医師が不相当と判断した者、とした。参加者には、事前の研究説明会にて、研究内容及び方法などに関する十分な説明を行い、文書により 100 名の同意を得た。100 名の調査対象者のうち、介入前の調査開始時、摂取 5 ヶ月後、摂取 11 ヶ月後の検診全てに参加した 79 名を解析対象とした(図 3-1)。本研究はヘルシンキ宣言に従い、県立広島大学倫理委員会の承諾のもとに行われた（承認番号 第 15MH025 号-01）。

3-2-2 対象者の分類

対象者は、それぞれに ID 番号を付し匿名化し、年齢と BMI をマッチング（年齢： ± 3 age、BMI： ± 3 kg/m²）して 3 群に分類した。カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する群（LECA 群：28 名）、カルシウム配合なしレモン果汁飲料を摂取する群（LE 群：28 名）、飲料を摂取しない群（対照群：23 名）に分類した。本研究の対照群は偽薬を使わず普段通りの生活をした。

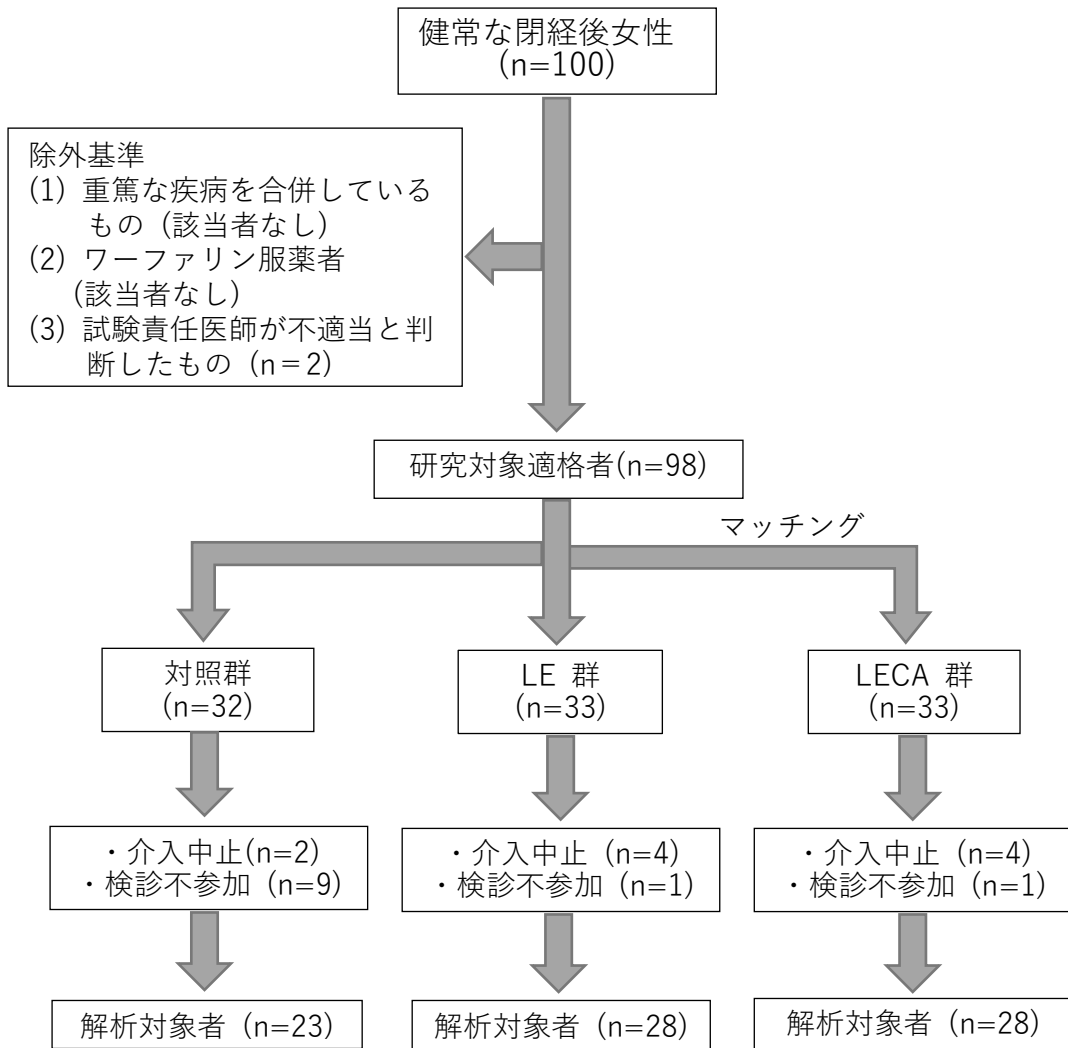


図 3-1 フローチャート

3-2-3 二重盲検による試験飲料の配布

研究者が匿名化した対象者を3群に分類したのち、共同研究者である別の研究者が飲料を摂取する2群（LECA群・LE群）を決定し、飲料を配布した。飲料の容器はどちらも同じ容器を使用しており、LECA群とLE群に分類された対象者も、どちらの飲料か判別できないようにした（図3-2）。二重盲検としたのは、LECA群とLE群のみで、残りの1群は対照群とし、飲料の配布は行わなかった（図3-3）。



図3-2 LECA群とLE群に配布した試験飲料

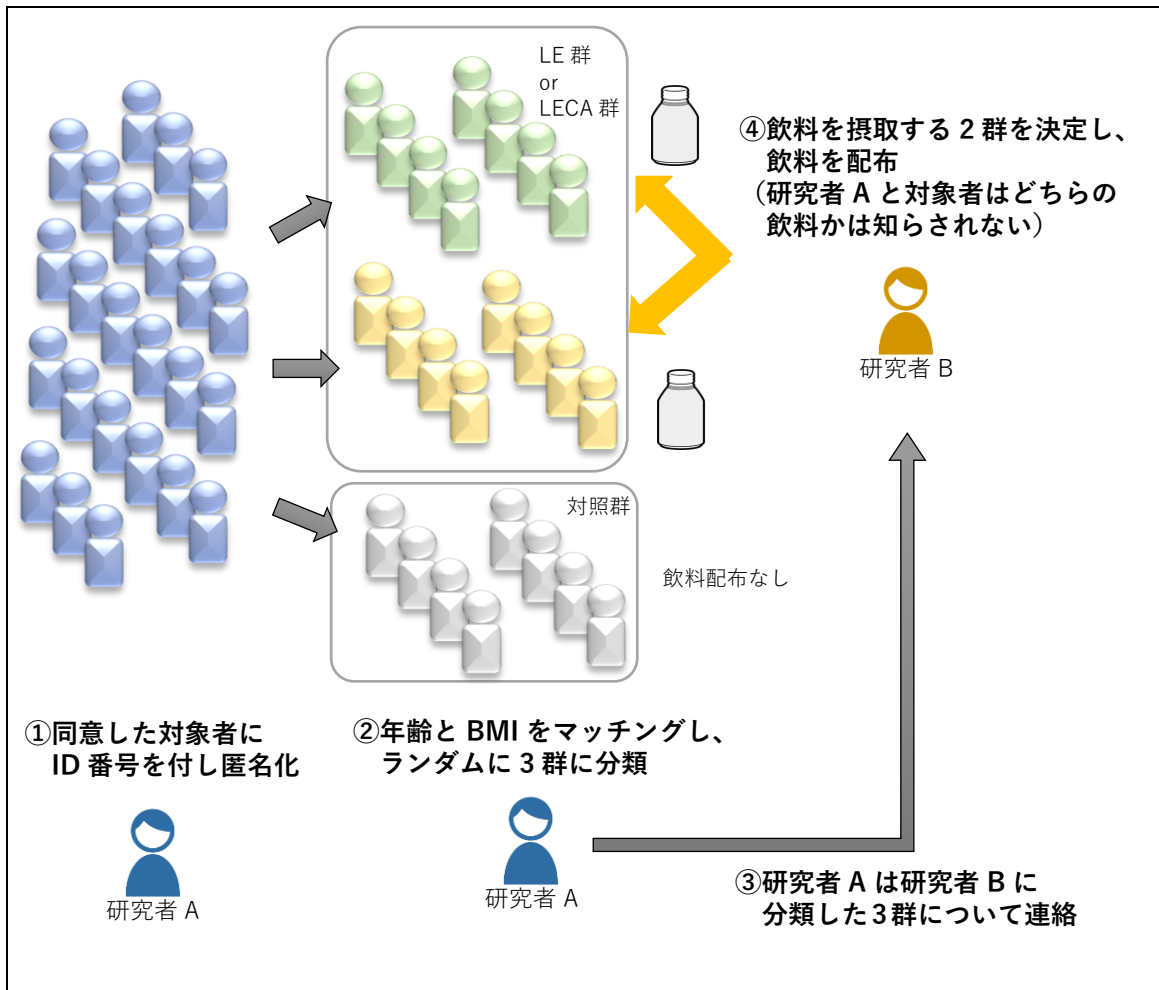


図 3-3 二重盲検による試験飲料の配布

3-2-4 試験飲料

試験飲料は共同研究機関のポッカサッポロフード&ビバレッジより提供された。その試験飲料の成分組成を表 3-1 に示す。試験飲料は 1 本あたり 290ml で、1 日 1 本摂取するように指示したが、摂取時間の指定はしなかった。なお、対象者には飲料摂取記録表を配布して、3 ヶ月に 1 度回収した。解析対象者の平均摂取率は 94.2%であった。LECA および LE 群の 1 本当たりの試験飲料にはレモン果汁を 30ml 含み、レモン果汁飲料カルシウム配合ありには 350mg のカルシウムを含む組成である。

表 3-1 試験飲料の成分組成

	対照群	LE 群	LECA 群
摂取量		290ml/日	
エネルギー (kcal/本)		約 20	約 50
カルシウム (mg/本)	-	-	350
レモン果汁 (ml/本)		30	30
クエン酸 (g/本)		約 1.5	約 1.5

3-2-5 調査項目

3-2-5-1 身体計測

問診により年齢、閉経後経過年数を同定した。身体計測で、身長、体重、BMI を測定した。

3-2-5-2 骨密度測定

骨密度は X 線骨密度測定装置 Discovery (東洋メディック) を使用し、腰椎(L2~L4)、左大腿骨近位部における骨密度(g/cm^2) 値を DEXA 法により測定した^{4,56)}。この測定方法は、骨密度測定法の主流であり、骨粗鬆症の疫学調査や臨床において多用されている⁶²⁾。骨は、海綿骨と皮質骨から構成されるが、腰椎は海綿骨が主体で、大腿骨や橈骨などは皮質骨が主体である^{60,62,63)}。腰椎や大腿骨は荷重骨であり、骨密度の低下は橈骨などの非荷重骨よりも著しいといわれている。骨粗鬆症による骨折は椎体、大腿骨近位部、下腿骨、橈骨遠位端などの部位で生じやすく、椎体骨折は骨粗鬆症性骨折なのかでも最も頻度が高い⁴⁾。また、大腿骨近位部骨折は ADL の低下や寝たきりとなるリスクが大きい⁶⁴⁾。したがって、海綿骨が主体である腰椎と皮質骨が主体である大腿骨の両部位における効果を検証する必要がある。本装置における調査期間中のキャリブレーション結果は、99 回行い、 $\text{mean}=1.038\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $\text{SD}=0.003\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $\text{cv}=0.37\%$ となり、それぞれ Hologic 社が定める正常範囲であった。

3-2-6 調査期間と測定時期

調査期間は 2015 年 12 月～2016 年 12 月とし、対象者のうち LECA 群及び LE 群は、290ml の試験飲料を 1 日 1 本 11 ヶ月間継続して摂取した。身体計測、骨密度値の測定は介入前の調査開始時、5 ヶ月後、11 ヶ月後に行った（表 3-2）。

表 3-2 調査期間と測定時期

介入前検診	摂取 5 ヶ月後検診	摂取 11 ヶ月後検診
2015 年 12 月	2016 年 6 月	2016 年 12 月
・身体計測	・身体計測	・身体計測
・骨密度値	・骨密度値	・骨密度値

3-2-7 統計解析

得られたデータは Shapiro-Wilk 検定により正規性の検定を行った。介入前において得られた評価項目のデータは、正規性が認められた場合は平均値（標準偏差）で表し、正規性が認められなかった場合は中央値（25%-75%）で表した。また、試験飲料と骨密度値の調査期間との関連について、正規性が認められた場合は、年齢と BMI を調整し、介入の有無 3 群（LECA 群、LE 群、対照群）と調査期間（介入前の調査開始時、摂取 5 ヶ月後、摂取 11 ヶ月の個人内水準）を二要因、骨密度値を従属変数とする二元配置分散分析をおこなった。さらに、LECA 群、LE 群、対照群の 3 群の骨密度値において、摂取 11 ヶ月後の値から初期値を差分し、初期値で除した変化割合を求めた。この値において正規性及び等分散が認められた場合は一元配置分散分析により解析した後、Dunnett の多重比較を行った。いずれの有意検定でも危険率 5%未満($p < 0.05$)とした。統計解析には IBM SPSS Statistics version23 を用いた。

3-3 結果

3-3-1 介入前の身体的特徴と評価項目の測定値

対象者の介入前の身体的特徴を表 3-3 に、介入前の評価項目測定値を表 3-4 に示した。身体的特徴については、いずれの項目においても、LECA 群、LE 群、対照群の間に統計学的有意差はなかった。

表 3-3 対象者の身体的特徴

	対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	全体 (n=79)	p 値
年齢 (歳)	63.9 (7.1) 48.0 - 80.0	64.9 (5.8) 56.0 - 81.0	65.2 (5.2) 57.0 - 82.0	64.7 (6.0) 48.0 - 82.0	0.676
閉経後経過年数 (年)	13.0 (6.9) 0.0 - 29.0	15.1 (9.2) 5.0 - 51.0	16.4 (7.6) 2.0 - 31.0	14.9 (8.1) 0.0 - 51.0	0.258
5 年未満*	2 (8.7%)	1 (3.6%)	2 (7.1%)	5 (6.3%)	-
5 年以上*	19 (82.6%)	25 (89.3%)	19 (67.9%)	63 (79.7%)	-
不明*	2 (8.7%)	2 (8.3%)	7 (25.0%)	11 (13.9%)	-
身長 (cm)	154.3 (5.4) 141.1 - 162.8	154.5 (4.6) 147.5 - 162.5	152.8 (5.6) 143.2 - 164.1	153.9 (5.2) 141.1 - 164.1	0.559
初回体重 (kg)	50.8 (10.1) 30.3 - 79.0	53.4 (8.5) 41.9 - 72.9	52.3 (7.2) 40.3 - 65.7	52.3 (8.5) 30.3 - 79.0	0.255
介入前 BMI ¹ (kg/m ²)	21.6 (3.5) 16.6 - 32.5	22.2 (3.5) 17.4 - 31.6	22.4 (2.8) 17.8 - 29.0	22.1 (3.2) 16.6 - 32.5	0.534

値：平均値（標準偏差）最小値-最大値

*：n 数（比率）

p 値：一元配置分散分析

¹ Body mass index

表 3-4 介入前の評価項目測定値

	対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	全体 (n=79)	p 値
腰椎骨密度値 (g/cm ²)	0.84 (0.16) 0.63 - 1.33	0.87 (0.12) 0.65 - 1.24	0.83 (0.15) 0.49 - 1.09	0.85 (0.14) 0.49 - 1.33	0.567
大腿骨 近位部骨密度値 (g/cm ²)	0.70 (0.13) 0.47 - 0.96	0.71 (0.12) 0.54 - 0.94	0.73 (0.09) 0.61 - 0.92	0.72 (0.11) 0.47 - 0.96	0.738

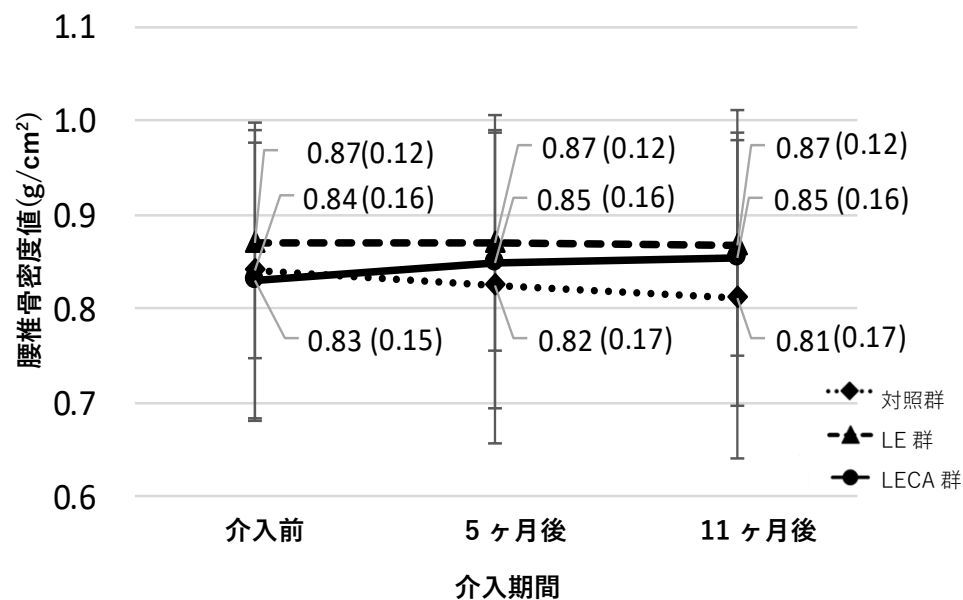
値：平均値（標準偏差）最小値-最大値

p 値：一元配置分散分析

3-3-2 骨密度値と試験飲料との関係および変化割合

腰椎骨密度値について、期間間要因および被験者要因では統計学的有意に異ならなかった($p=0.956$, $p=0.666$)が、交互作用においては統計学的有意であった($p<0.001$) (図 3-4a)。腰椎骨密度値の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群はプラス(0.03)、LE 群及び対照群はマイナス(LE 群:-0.00, 対照群:-0.04)の変化が認められ、LECA 群と対照群、LE 群と対照群、LECA 群と LE 群との間に有意差(すべて $p<0.001$)が認められた(図 3-4b)。

大腿骨近位部骨密度値について、期間要因および被験者間要因では統計学的有意に異ならなかった($p=0.413$, $p=0.771$)が、交互作用においては統計学的有意であった($p<0.001$) (図 3-5a)。大腿骨近位部骨密度値の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群はプラス(0.00)、LE 群および対照群はマイナス(LE 群:-0.02, 対照群:-0.02)の変化が認められた。また、LECA 群と対照群、LECA 群と LE 群との間に有意差($p<0.001$, $p=0.001$)が認められた(図 3-5b)。

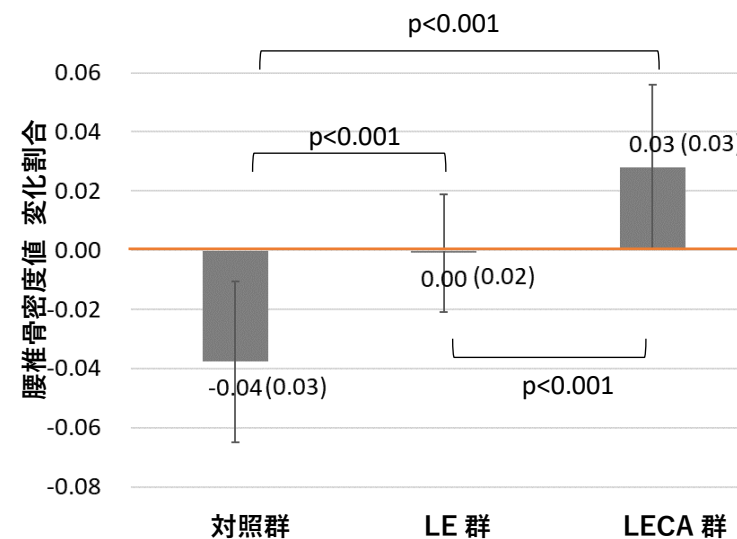


	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	0.84 (0.16)	0.82 (0.17)	0.81 (0.17)
LE群 (n=28)	0.87 (0.12)	0.87 (0.12)	0.87 (0.12)
LECA群 (n=28)	0.83 (0.15)	0.85 (0.16)	0.85 (0.16)

図 3-4a 腰椎骨密度値の変化

二元配置分散分析

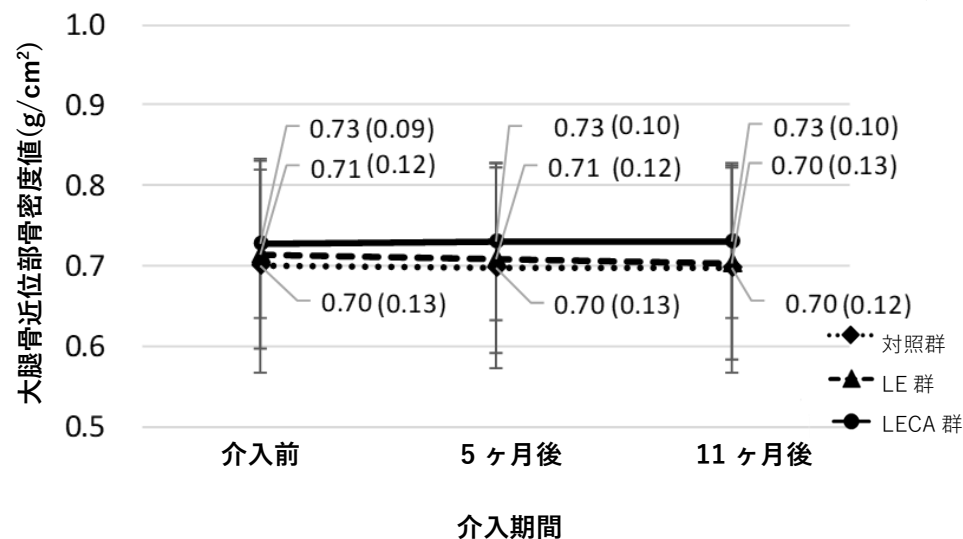
期間要因：p=0.956 被験者間要因：p=0.666 交互作用：p<0.001



対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	p値
-0.04 (0.03)	-0.00 (0.02)	0.03 (0.03)	<0.001

図 3-4b 腰椎骨密度値変化割合（摂取 11 ヶ月後）

p 値：一元配置分散分析, Dunnett 多重比較

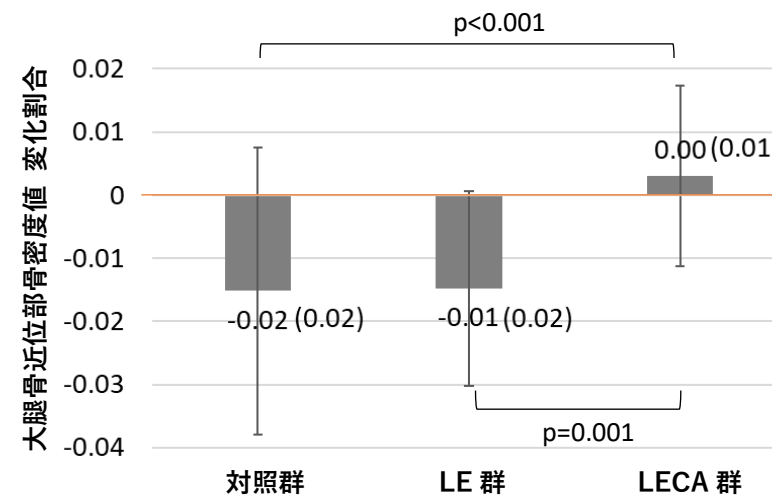


	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	0.70 (0.13)	0.70 (0.13)	0.70 (0.13)
LE群 (n=28)	0.71 (0.12)	0.71 (0.12)	0.70 (0.12)
LECA群 (n=28)	0.73 (0.09)	0.73 (0.10)	0.73 (0.10)

図 3-5a 大腿骨近位部骨密度値の変化

二元配置分散分析

期間要因：p=0.413 被験者間要因：p=0.771 交互作用：p<0.001



対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	p値
-0.02 (0.02)	-0.02 (0.02)	0.00 (0.01)	<0.001

図 3-5b 大腿骨近位部骨密度値変化割合（摂取 11ヶ月後）

p値：一元配置分散分析, Dunnett 多重比較

3-4 考察

この章では11ヶ月にわたるクエン酸を含むレモン飲料のカルシウム配合有無の長期の介入によって、閉経後の健常な女性 [平均年齢 (±標準偏差), 64.7 ± 6.0 歳] の躯幹骨 (腰椎・大腿骨近位部) の骨密度評価を行った。

Smithら⁶⁵⁾やReidら⁶⁶⁾は、閉経後女性においてカルシウム補給 (1000~1500mg/day) は骨密度の減少率を低下させると報告している。本研究のLECA群が摂取したカルシウム配合レモン果汁飲料に含まれているカルシウム量は、これらの研究^{65,66)}よりも350mg/本と少量であるが、腰椎骨密度値・大腿骨近位部骨密度値において交互作用で統計学的有意を認めた。介入前と摂取11ヶ月後の変化割合が、腰椎骨密度値ではLECA群と対照群、LE群と対照群、LE群とLECA群との間に有意差を認め、大腿骨近位部骨密度値ではLECA群と対照群、LE群とLECA群との間に有意差を認めた。これは試験飲料を継続摂取することで、クエン酸によるキレート作用によってカルシウムの吸収が促進され、血中カルシウム濃度が保たれた結果と考えられる。腰椎骨密度値と大腿骨近位部骨密度値の変化割合において、LE群とLECA群との間にも有意差が認められたため、レモン果汁のみの飲料を摂取するより、レモン果汁にカルシウムを配合した飲料を摂取したほうが効果的であると考えられる。

女性では50歳前後に閉経を迎えると、エストロゲンの枯渇により骨量は急激に減少する⁶⁷⁾。女性の腰椎骨密度でみると40~44歳を100%とすると、45~49歳で約98%、50~54歳で90~92%、55~59歳で82~83%と激減していくことが報告されている⁶⁸⁾。したがって、カルシウムを配合したレモン飲料を継続して摂取することにより、骨密度は減少する時期にもかかわらず、維持できていたことは意義があると考えられる。

骨粗鬆症による骨折は椎体、大腿骨近位部、下腿骨、橈骨遠位端などの部位で生じやすく、骨粗鬆症性骨折のなかで最も頻度の高いものが椎体骨折である⁴⁾。また、大腿骨近位部骨折はADLの低下や寝たきりとなるリスクが大きい⁶⁴⁾。そのため、腰椎および大腿骨近位部の両部位の骨密度値を把握することにより、生活指導や健康指導にも活用していただくことも考え

られる。本研究では腰椎(L2~L4)と大腿骨近位部の2部位で評価を行い、介入前からの変化割合は、LECA群において両部位とも対照群およびLE群より有意に増加していた。この両部位で効果が見られたことは、大変意義のあることである。

第4章

健常な閉経後女性における試験飲料介入試験 による骨代謝の評価

4-1 はじめに

骨粗鬆症の発症予防には様々な研究が行われており、サプリメントをはじめとする栄養素の機能を利用した骨代謝や骨密度に対する効果の研究が行われている。骨代謝マーカーは、測定時点での骨代謝を鋭敏に反映する¹⁵⁾といわれており、Gonnelliら⁶⁹⁾は、閉経後骨粗鬆症の女性において、骨表面に結合し破骨細胞による骨吸収を抑制する窒素含有のビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネートが骨代謝回転に及ぼす影響について報告している。Rossら⁷⁰⁾やGarneroら⁷¹⁾は、骨代謝マーカーを測定し、骨折リスクとの関連について報告している。このように、骨代謝マーカーは、骨粗鬆症の治療薬の効果判定にも用いられ、骨粗鬆症性骨折リスクの評価にも用いられ、したがって、骨代謝マーカーを測定し、骨代謝回転を評価することは、治療の必要性や治療薬の有効性についての指標となり、骨粗鬆症の予防や日常診療において重要な位置を占めている。

Yamamuraら⁷²⁾は、6ヶ月間の介入で、ミルク基礎たんぱく質(MBP; milk basic protein)は健常な成人女性の骨密度を増加させることを報告しており、Aoeら^{73,74)}は、6ヶ月間の介入で、健常な閉経前および閉経後初期の女性の骨吸収を抑制することにより骨密度を増加させることを報告している。これらの先行研究では、骨吸収マーカー(u-NTx濃度またはデオキシピリノジン濃度)の減少を認め、骨吸収抑制により骨密度が増加したことを報告しているが、介入期間が6ヶ月間と短く、骨形成マーカーの変化は認められていない。骨形成マーカーは骨吸収抑制に応じてカップリング現象で二次的に低下し、骨吸収マーカー低下より遅れて低下すると考えられている⁴⁾ため、骨吸収マーカーおよび骨形成マーカー双方の変化を把握するためには、長期間の介入が必要とされる。

第3章では、健常な閉経後女性を対象とし、カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する群、カルシウム配合なしレモン果汁飲料を摂取する群、飲料を摂取しない群の3群に分類し、試験飲料の骨密度への影響を検討した。11ヶ月にわたるカルシウム配合レモン果汁飲料の継続摂取によって、骨密度値は維持され、介入前からの変化割合の比較結果からも、カルシウム配合レモン飲料の効果が推察された。

そこでこの章では、試験飲料の継続摂取が骨代謝に与える影響について検討することとした。

4-2 対象と方法

4-2-1 対象

対象は、「第3章 健常な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨密度の評価」と同様で、M市広報により健常な閉経後女性をボランティアとして募集した。除外基準は、(1)心筋梗塞・脳梗塞、肝・腎機能障害などの重篤な疾患を合併している者、(2)ワーファリンの服薬を行っている者（試験飲料の摂取が薬効に影響を及ぼす可能性があるため）、(3)試験責任医師が不相当と判断した者、とした。参加者には、事前の研究説明会にて、研究内容及び方法などに関する十分な説明を行い、文書により100名の同意を得た。100名の調査対象者のうち、介入前の調査開始時、摂取5ヶ月後、摂取11ヶ月後の検診全てに参加した79名を解析対象とした(図3-1 再掲)。本研究はヘルシンキ宣言に従い、県立広島大学倫理委員会の承諾のもとに行われた（承認番号 第15MH025号-01）。

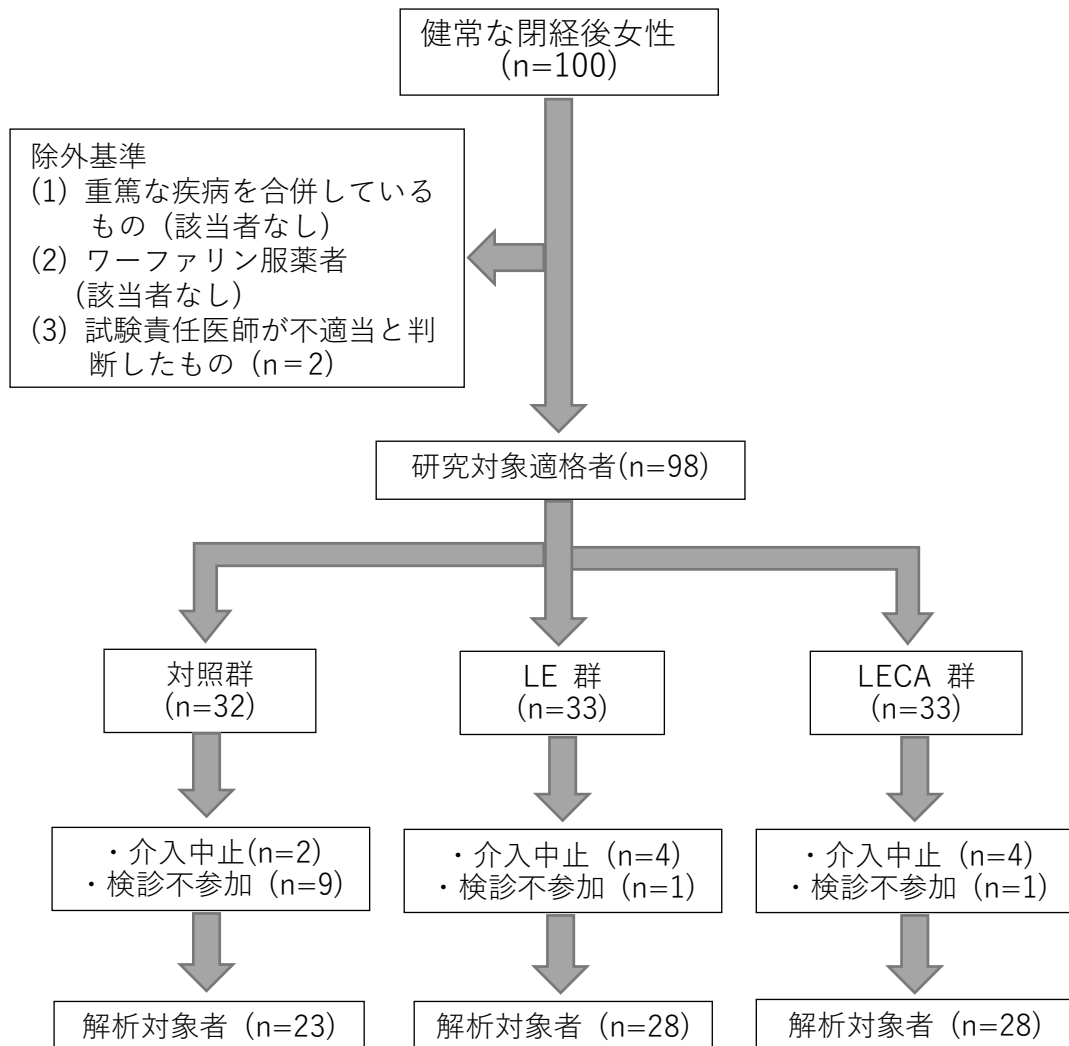


図 3-1 フローチャート (再掲)

4-2-2 対象者の分類

対象者は、「第3章 健常な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨密度の評価」と同様で、それぞれに ID 番号を付し匿名化し、年齢と BMI をマッチング（年齢： ± 3 age、BMI： ± 3 kg/m²）して3群に分類した。カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する群（LECA 群：28名）、カルシウム配合なしのレモン果汁飲料を摂取する群（LE 群：28名）、飲料を摂取しない群（対照群：23名）に分けた。本研究のコントロール群は偽薬を使わず普段通りの生活をした。

4-2-3 二重盲検による試験飲料の配布

研究者が匿名化した対象者を3群に分類したのち、共同研究者である別の研究者が飲料を摂取する2群（LECA群・LE群）を決定し、飲料を配布した。飲料の容器はどちらも同じ容器を使用しており、LECA群とLE群に分類された対象者も、どちらの飲料か判別できないようにした。二重盲検としたのは、LECA群とLE群のみで、残りの1群は対照群とし、飲料の配布は行わなかった（図3-3 再掲）。

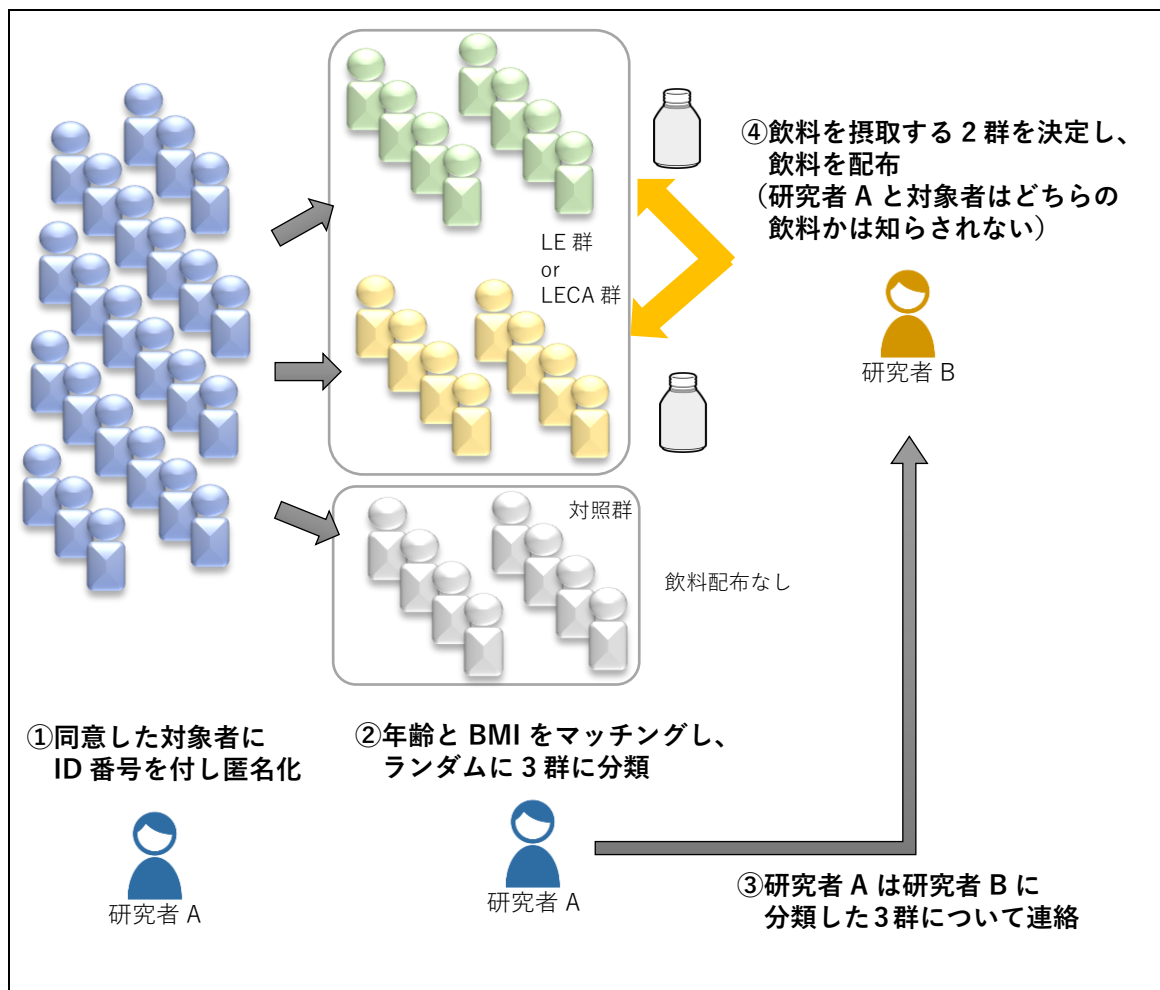


図 3-3 二重盲検による試験飲料の配布（再掲）

4-2-4 試験飲料

試験飲料は、「第3章健常な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨密度の評価」で用いたものと同じのもので、試験飲料は1本あたり290mlで、1日1本摂取するように指示したが、摂取時間の指定はしなかった。なお、対象者には飲料摂取記録表を配布して、3ヶ月に1度回収した。解析対象者の平均摂取率は94.2%であった。LECA および LE 群の1本当たりの試験飲料にはレモン果汁を30ml含み、レモン果汁飲料カルシウム配合ありには350mgのカルシウムを含む組成である（表3-1 再掲）。

表 3-1 試験飲料の成分組成 （再掲）

		対照群	LE 群	LECA 群
摂取量			290ml/日	
エネルギー	(kcal/本)		約 20	約 50
カルシウム	(mg/本)	-	-	350
レモン果汁	(ml/本)		30	30
クエン酸	(g/本)		約 1.5	約 1.5

4-2-5 調査項目

4-2-5-1 身体計測

問診により年齢、閉経後経過年数を同定した。身体計測で、身長、体重、BMI を測定した。

4-2-5-2 骨代謝マーカー

骨吸収マーカーとしては、TRACP-5b)濃度と、u-NTx 濃度を、骨形成マーカーとしては、BAP 濃度、OC 濃度をそれぞれ測定した。骨マトリックス関連マーカーとしては、ucOC 濃度を測定した。

TRACP-5b 濃度、BAP 濃度、OC 濃度、ucOC 濃度の測定用血清試料は、採取した血液より 3000 回転 7 分間の条件で遠心分離して得たのち、市販の測定キットを用いて測定し

た。u-NTx 濃度測定用尿試料は、採尿後前処理なしで市販の測定キットを用いて測定した。血清および尿中の測定は(株)福山臨床検査センターにて分析を行い、血清試料中の TRACP-5b 濃度はオステオリックス「TRAP-5b」(NITTOBO MEDICAL CO., LTD.)、BAP 濃度はアクセス オスターゼ(BECKMAN COULTER CO., LTD.)、OC 濃度は BGP IRMA「エルエスアイ M」(LSI Medience CO., LTD.)、ucOC 濃度は Picolumi ucOC(EIDIA CO., LTD.)を用いて測定した。u-NTx 濃度は OSTEOMARK(ALERE MEDICAL CO., LTD.)を用いて測定した。

4-2-5-3 高感度 PTH 濃度と血清総カルシウム濃度

骨代謝に関連する項目として、高感度副甲状腺ホルモン(以下高感度 PTH; para-thyroid hormone)濃度および血清総カルシウム濃度を測定した。

高感度 PTH 濃度、血清総カルシウム濃度の測定用血清試料は、採取した血液より 3000 回転 7 分間の条件で遠心分離して得たのち、市販の測定キットを用いて測定した。血清の測定は(株)福山臨床検査センターにて分析を行い、高感度 PTH 濃度はヤマサ「PTH キット」(YAMASA CORPORATION.)、血清総カルシウム濃度は「セロテック」Ca-AL Type C(SEROTEC CO., LTD.)を用いてアルセナゾⅢ法で測定した。

高感度 PTH は、副甲状腺ホルモンの指標として用いられている。副甲状腺ホルモンは 84 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、生体のカルシウムの恒常性維持に重要な役割を果たしている⁷⁵⁾。副甲状腺ホルモンは、血中カルシウム濃度の低下の刺激で副甲状腺から分泌され、骨組織に作用し骨塩(リン酸カルシウム)の動員を促したり、腎臓に作用して尿細管でのカルシウムの再吸収を促進したりする。小腸に対しては活性型ビタミン D 合成亢進を介し間接的にカルシウムの輸送を促し、血中カルシウム濃度を上昇させるよう働いている⁷⁵⁾。

女性は閉経を迎えると、破骨細胞抑制作用があるカルシトニンやエストロゲンの分泌が低下する¹²⁾ため、破骨細胞の働きが抑制されず、血中のカルシウムを骨に取り込むため血

中カルシウム濃度は低下する。血中カルシウム濃度の低下を感知した副甲状腺は、副甲状腺ホルモンを分泌させ、骨からのカルシウムを血中に取り込み、血中カルシウム濃度を上げるよう作用する¹⁴⁾。したがって、副甲状腺ホルモンの指標である高感度PTH濃度の上昇は、副甲状腺機能亢進状態となり、骨からのカルシウムを血中に取り込み、血中カルシウム濃度も上昇することとなり、血清総カルシウム濃度も上昇する。つまり、高感度PTH濃度と血清総カルシウム濃度の上昇は、骨吸収の亢進をもたらし、骨密度の減少につながるようになる。

4-2-6 調査期間と測定時期

調査期間は2015年12月～2016年12月とし、対象者のうちLECA群及びLE群は、290mlの試験飲料を1日1本11ヶ月間継続して摂取した。身体計測、骨代謝マーカー濃度、高感度PTH濃度、血清総カルシウム濃度の測定は介入前の調査開始時、5ヶ月後、11ヶ月後に行った(表4-1)。

表4-1 調査期間と測定時期

介入前検診	摂取5ヶ月後検診	摂取11ヶ月後検診
2015年12月	2016年6月	2016年12月
・身体計測	・身体計測	・身体計測
・骨代謝マーカー濃度	・骨代謝マーカー濃度	・骨代謝マーカー濃度
・高感度PTH濃度	・高感度PTH濃度	・高感度PTH濃度
・血清総カルシウム濃度	・血清総カルシウム濃度	・血清総カルシウム濃度

4-2-7 統計解析

得られたデータはShapiro-Wilk検定により正規性の検定を行った。介入前において得られた評価項目のデータは、正規性が認められた場合は平均値(標準偏差)で表し、正規性が認められなかった場合は中央値(25%-75%)で表した。また、試験飲料と評価項目(骨代

謝マーカー濃度、高感度 PTH、血清総カルシウム濃度) の調査期間との関連について、正規性が認められた場合は、年齢と BMI を調整し、介入の有無 3 群 (LECA 群、LE 群、対照群) と調査期間 (介入前の調査開始時、摂取 5 ヶ月後、摂取 11 ヶ月の個人内水準) を二要因、評価項目を従属変数とする二元配置分散分析をおこなった。正規性が認められなかった場合には、介入の有無 3 群 (LECA 群、LE 群、対照群) 各々で Friedman 検定を行った。さらに、LECA 群、LE 群、対照群の 3 群の評価項目において、摂取 11 ヶ月後の値から初期値を差分し、初期値で除した変化割合を求めた。この値において正規性及び等分散が認められた場合は一元配置分散分析により解析した後、Dunnett の多重比較を行った。また、正規性が認められ等分散が認められなかった場合は Welch 検定、正規性及び等分散が認められなかった場合は Kruskal-Wallis 順位和検定、これらを行った後いずれも Holm の多重比較を行った。いずれの有意検定でも危険率 5%未満($p < 0.05$)とした。統計解析には IBM SPSS Statistics version23 を用いた。

4-3 結果

4-3-1 介入前の身体的特徴と評価項目の測定値

対象者の介入前の身体的特徴を表 3-3 (再掲) に、介入前の評価項目測定値を表 4-2 に示した。身体的特徴については、いずれの項目においても、LECA 群、LE 群、対照群の間に統計学的有意差はなかった。

表 3-3 対象者の身体的特徴（再掲）

	対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	全体 (n=79)	p 値
年齢 (歳)	63.9 (7.1) 48.0 - 80.0	64.9 (5.8) 56.0 - 81.0	65.2 (5.2) 57.0 - 82.0	64.7 (6.0) 48.0 - 82.0	0.676
閉経後経過年数 (年)	13.0 (6.9) 0.0 - 29.0	15.1 (9.2) 5.0 - 51.0	16.4 (7.6) 2.0 - 31.0	14.9 (8.1) 0.0 - 51.0	0.258
5年未満*	2 (8.7%)	1 (3.6%)	2 (7.1%)	5 (6.3%)	-
5年以上*	19 (82.6%)	25 (89.3%)	19 (67.9%)	63 (79.7%)	-
不明*	2 (8.7%)	2 (8.3%)	7 (25.0%)	11 (13.9%)	-
身長 (cm)	154.3 (5.4) 141.1 - 162.8	154.5 (4.6) 147.5 - 162.5	152.8 (5.6) 143.2 - 164.1	153.9 (5.2) 141.1 - 164.1	0.559
初回体重 (kg)	50.8 (10.1) 30.3 - 79.0	53.4 (8.5) 41.9 - 72.9	52.3 (7.2) 40.3 - 65.7	52.3 (8.5) 30.3 - 79.0	0.255
介入前 BMI ¹ (kg/m ²)	21.6 (3.5) 16.6 - 32.5	22.2 (3.5) 17.4 - 31.6	22.4 (2.8) 17.8 - 29.0	22.1 (3.2) 16.6 - 32.5	0.534

値：平均値（標準偏差）最小値-最大値

*：n 数（比率）

p 値：一元配置分散分析

¹ Body mass index

表 4-2 介入前の評価項目測定値

	対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	全体 (n=79)	p 値	
骨代謝 マーカー 濃度	TRACP-5b ¹ (mU/dL)	397.8 (144.7) 126.0 - 761.0	361.8 (132.4) 175.0 - 785.0	435.4 (131.2) 154.0 - 719.0	398.4 (137.5) 126.0 - 785.0	0.134
	u-NTx ² (nmol BCE/mmol/Cr) *	39.9 (30.3 - 56.5)	42.5 (25.7 - 51.4)	45.9 (37.5 - 59.1)	43.3 (32.0 - 55.0)	0.492
	BAP ³ (μg/L) *	13.3 (10.9 - 15.9)	11.4 (8.9 - 14.3)	13.9 (10.4 - 19.7)	12.5 (9.7 - 16.2)	0.057
	OC ⁴ (ng/ml)	11.4 (4.6) 0.7 - 5.1	11.4 (4.7) 2.0 - 20.9	12.4 (4.1) 4.9 - 20.1	11.7 (4.4) 2.0 - 20.9	0.613
骨マトリック ス関連 マーカー 濃度	ucOC ⁵ (ng/ml) *	3.6 (2.1 - 4.0)	3.8 (2.3 - 5.4)	3.3 (2.4 - 4.7)	3.6 (2.2 - 4.8)	0.674
高感度 PTH ⁶ 濃度 (pg/ml) *	395.0 (340.0-470.0)	460.0 (402.5-515.0)	415.0 (355.0-460.0)	420.0 (370.0-482.5)	0.111	
血清総カルシウム濃度 (mg/dl) *	9.5 (9.1-9.6)	9.5 (9.1-9.6)	9.6 (9.4-9.8)	9.5 (9.3-9.7)	0.069	

値：平均値（標準偏差）最小値-最大値

*：中央値（25%-75%）

p 値：一元配置分散分析

^a：Kruskal- Wallis 順位和検定

¹ Tartrate-resistant acid phosphatase type 5b

² Urinary type I collagen cross-linked N-telopeptide

³ Bone alkaline phosphatase

⁴ Osteocalcin

⁵ Undercarboxylated osteocalcin

⁶ Para-thyroid hormone

4-3-2 骨代謝マーカー濃度と試験飲料との関係および変化割合

TRACP-5b 濃度について、期間要因および被験者間要因では統計学的有意に異ならなかった($p=0.967$, $p=0.840$)が、交互作用においては統計学的有意であった($p<0.001$) (図 4-1a)。

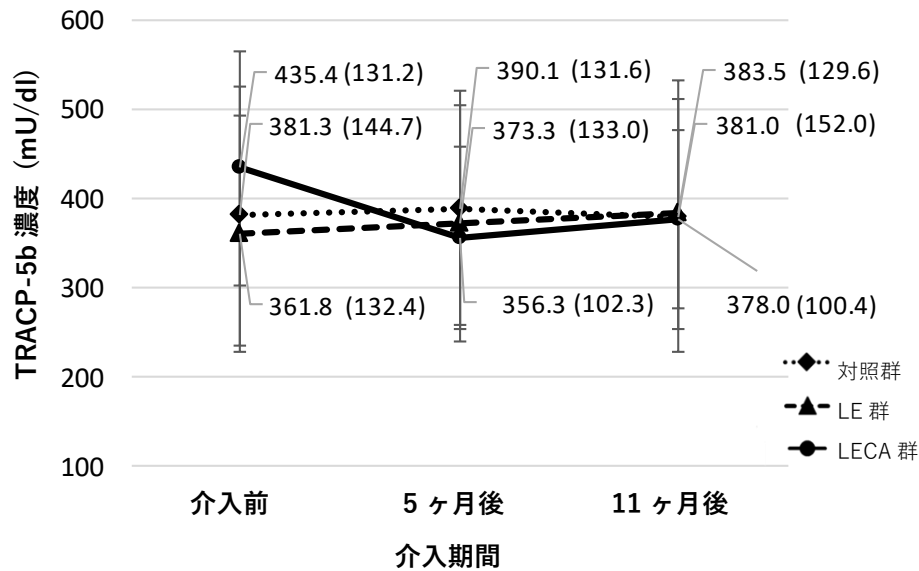
TRACP-5b 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群はマイナス(-0.10)、LE 群および対照群はプラス(LE 群:0.08, 対照群:0.03)の変化が認められた。また、LECA 群と対照群および LE 群の間に有意差 ($p=0.002$, $p=0.003$)が認められた (図 4-1b)。u-NTx 濃度について、3 群

とも調査期間は統計学的有意に異ならなかった(対照群; $p=0.401$, LE 群; $p=0.248$, LECA 群; $p=0.131$) (図 4-2a)。u-NTx 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群および LE 群はマイナス(LECA 群:-0.16, LE 群:-0.01)の変化が認められ、対照群にはプラス(0.00)の変化が認められ、有意差はなかった($p=0.573$) (図 4-2b)。

OC 濃度について、3 群の期間要因および被験者間要因では統計学的有意に異ならなかった($p=0.254$, $p=0.788$)が、交互作用においては統計学的有意であった($p=0.006$) (図 4-3a)。OC 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群(-0.27)は LE 群(-0.02)よりも有意($p<0.001$)に減少していた (図 4-3b)。BAP 濃度について、3 群とも調査期間において統計学的有意であった(全て $p<0.001$) (図 4-4a)。BAP 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともプラス(LECA 群:0.03, LE 群:0.26, 対照:0.17)の変化が認められ、LECA 群は対照群および LE 群よりも有意($p=0.007$, $p<0.001$)に小さかった (図 4-4b)。

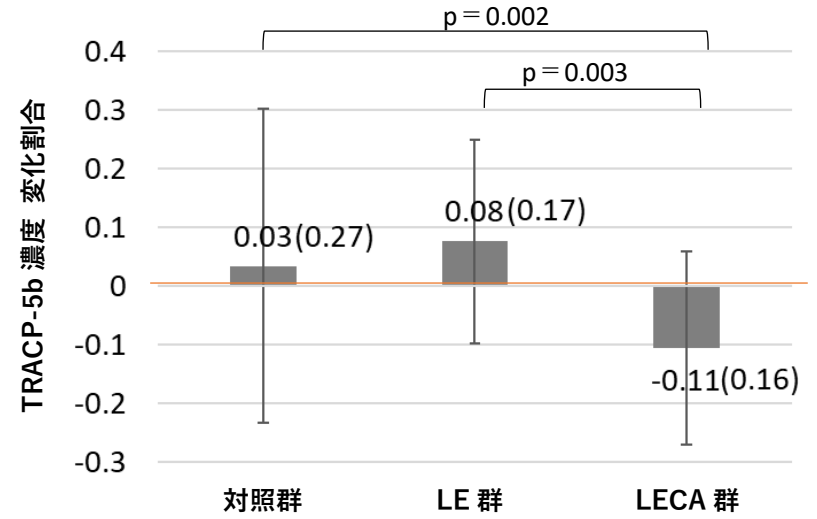
ucOC 濃度について、LECA 群は調査期間において統計学的有意であった($p<0.001$) (図 4-5a)。ucOC 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともマイナス(LECA 群:-0.22, LE 群:-0.14, 対照群:-0.10)の変化が認められ、有意差はなかった($p=0.152$) (図 4-5b)。

健康な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨代謝の評価



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	381.3 (144.7)	390.1 (131.6)	381.0 (152.0)
LE群 (n=28)	361.8 (132.4)	373.3 (133.0)	383.5 (129.6)
LECA群 (n=28)	435.4 (131.2)	356.3 (102.3)	378.0 (100.4)

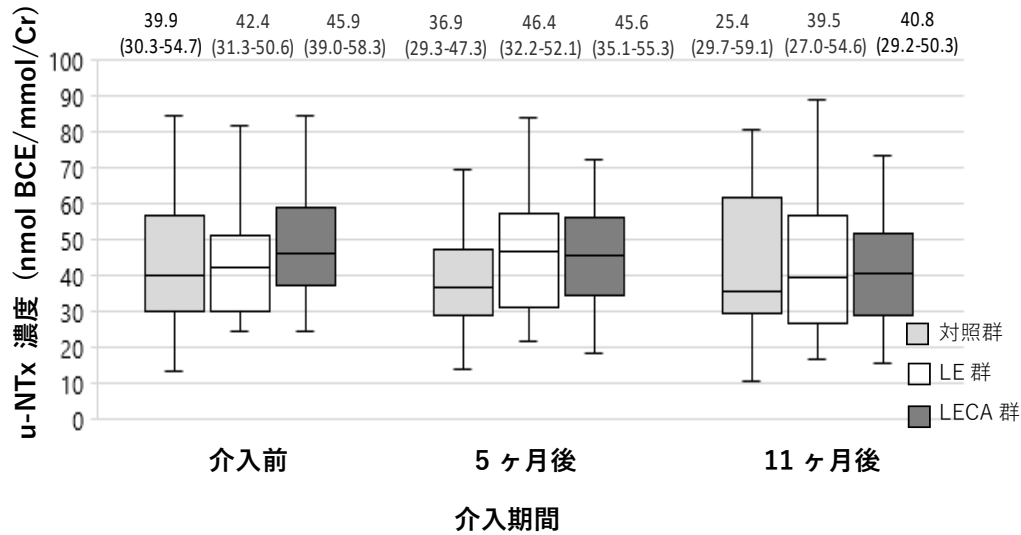
図 4-1a 骨吸収マーカーTRACP-5b 濃度の変化
 二元配置分散分析
 期間要因：p=0.967 被験者間要因：p=0.840 交互作用：p<0.001



対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	p 値
0.03 (0.27)	0.08 (0.17)	-0.11 (0.16)	0.004

図 4-1b 骨吸収マーカーTRACP-5b 濃度の変化割合 (摂取 11 ヶ月後)
 p 値：一元配置分散分析, Dunnett 多重比較

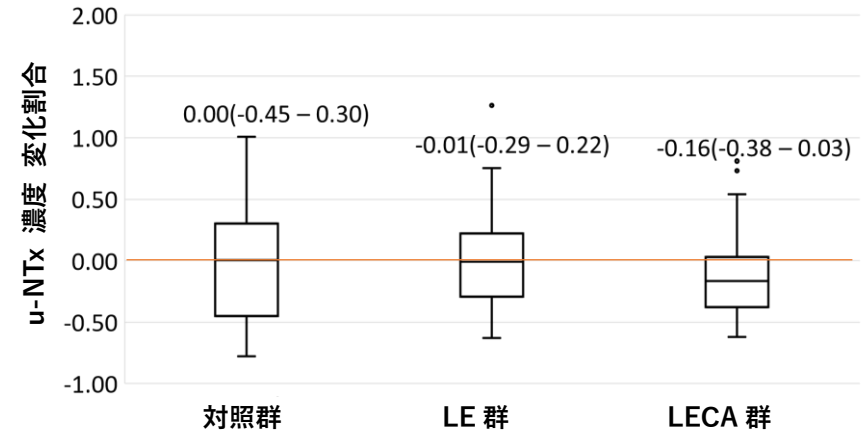
健康な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨代謝の評価



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	39.9 (30.3-54.7)	36.9 (29.3-47.3)	35.4 (29.8-59.1)
LE群 (n=28)	42.4 (31.3-50.6)	46.4 (32.2-52.1)	39.5 (27.0-54.6)
LECA群 (n=28)	45.9 (39.0-58.3)	45.6 (35.1-55.3)	40.8 (29.2-50.3)

図 4-2a 骨吸収マーカー u-NTx 濃度の変化

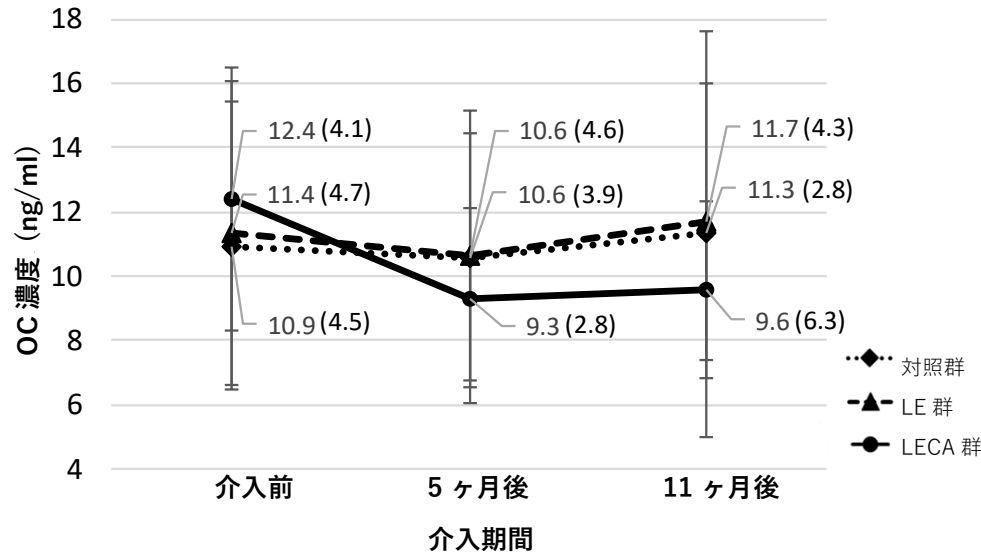
Friedman 検定 対照群： p=0.401；LE 群： p=0.248；LECA 群： p=0.131



対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	p 値
0.00 (-0.45 - 0.30)	-0.01 (-0.29 - 0.22)	-0.16 (-0.38 - 0.03)	0.573

図 4-2b 骨吸収マーカー u-NTx 濃度の変化割合（摂取 11 ヶ月後）

p 値：Kruskal- Wallis 順位和検定

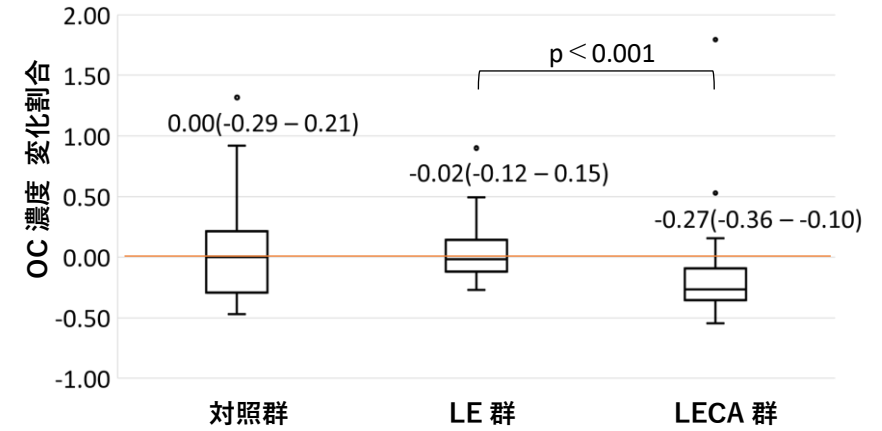


	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	10.9 (4.5)	10.6 (3.9)	11.3 (2.8)
LE群 (n=28)	11.4 (4.7)	10.6 (4.6)	11.7 (4.3)
LECA群 (n=28)	12.4 (4.1)	9.3 (2.8)	9.6 (6.3)

図 4-3a 骨形成マーカーOC濃度の変化

二元配置分散分析

期間要因：p=0.254 被験者間要因：p=0.788 交互作用：p=0.006

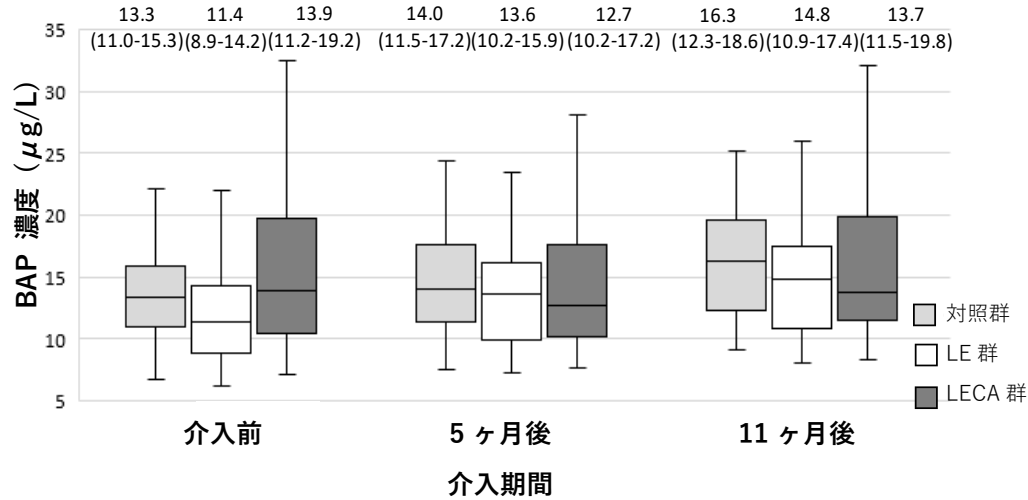


対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	p値
0.00 (-0.29 - 0.21)	-0.02 (-0.12 - 0.15)	-0.27 (-0.36 - 0.10)	0.001

図 4-3b 骨形成マーカーOC濃度の変化割合（摂取11ヶ月後）

p値：Kruskal-Wallis 順位和検定, Holm 多重比較

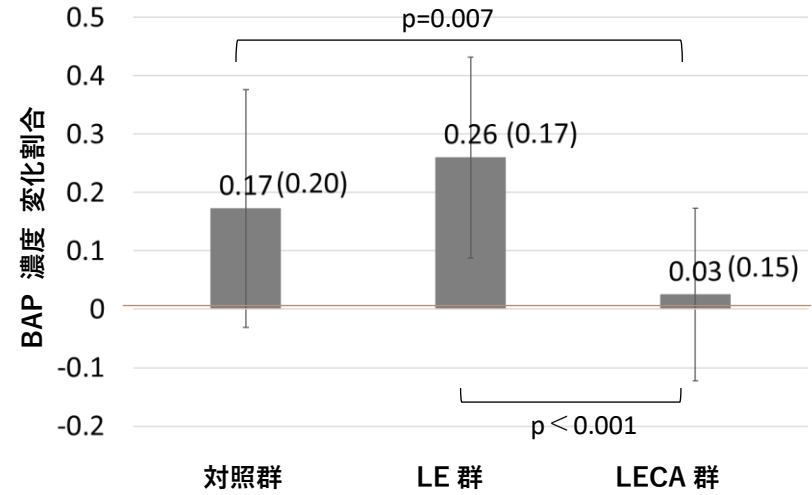
健康な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨代謝の評価



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	13.3 (11.0-15.3)	14.0 (11.5-17.2)	16.3 (12.3-18.6)
LE群 (n=28)	11.4 (8.9-14.2)	13.6 (10.2-15.9)	14.8 (10.9-17.4)
LECA群 (n=28)	13.9 (11.2-19.2)	12.7 (10.2-17.2)	13.7 (11.5-19.8)

図 4-4a 骨形成マーカーBAP 濃度の変化

Friedman 検定 対照群: p<0.001; LE 群: p<0.001; LECA 群: p<0.001

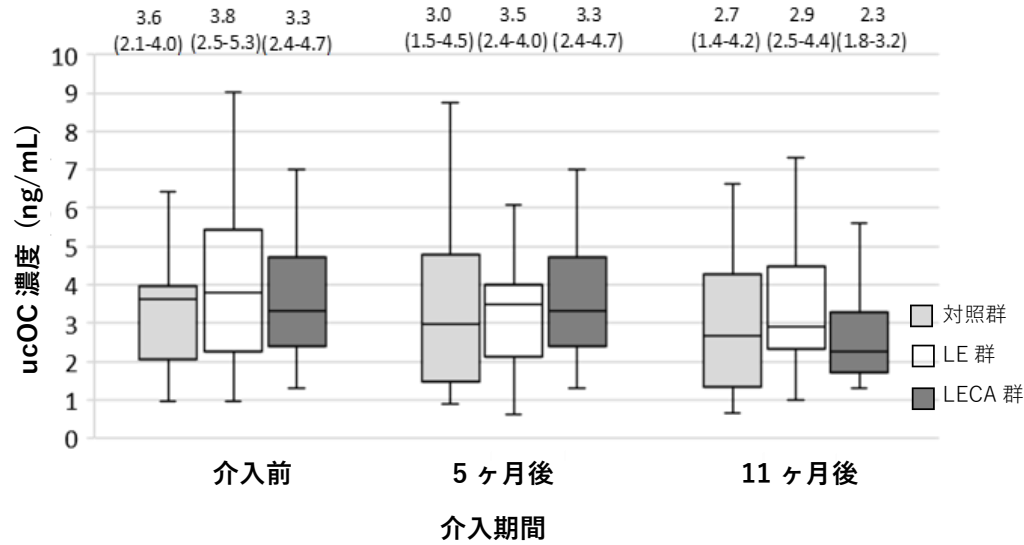


対照群 (n=23)	LE群 (n=28)	LECA群 (n=28)	p 値
0.17 (0.02)	0.26 (0.17)	0.03 (0.15)	<0.001

図 4-4b 骨形成マーカーBAP 濃度の変化割合 (摂取 11 ヶ月後)

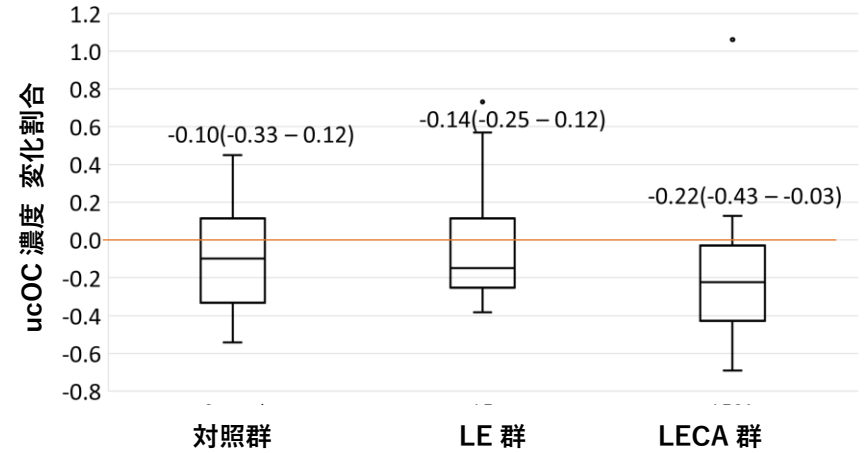
p 値：一元配置分散分析, Dunnett 多重比較

健康な閉経後女性における試験飲料介入試験による骨代謝の評価



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	3.6 (2.1-4.0)	3.0 (1.5-4.5)	2.7 (1.4-4.2)
LE群 (n=28)	3.8 (2.5-5.3)	3.5 (2.4-4.0)	2.9 (2.5-4.4)
LECA群 (n=28)	3.3 (2.4-4.7)	3.3 (2.4-4.7)	2.3 (1.8-3.2)

図 4-5a 骨マトリックス関連マーカーucOC 濃度の変化
Friedman 検定 対照群: p=0.664; LE 群:p=0.214; LECA 群:p<0.001



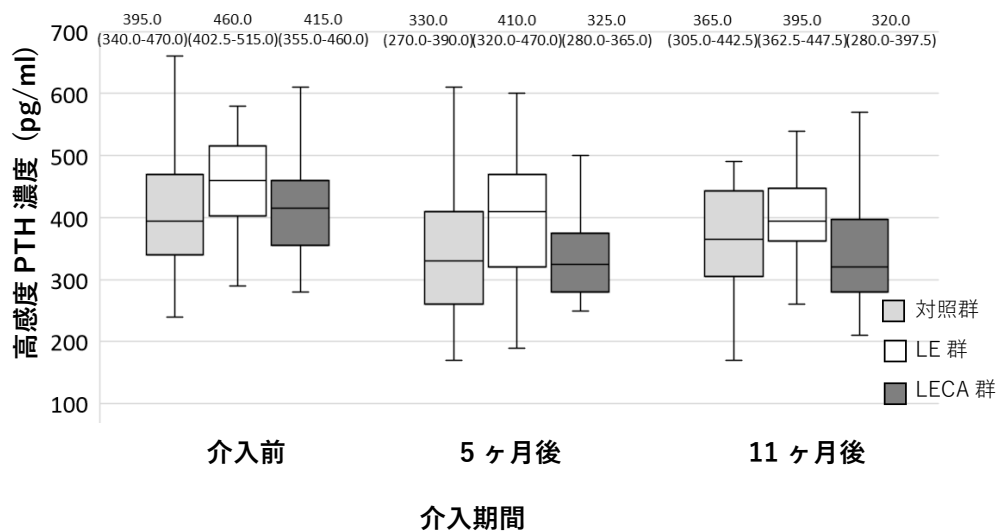
対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	p 値
-0.10 (-0.33 - 0.12)	-0.14 (-0.25 - 0.12)	-0.22 (-0.43 - 0.03)	0.152

図 4-5b 骨マトリックス関連マーカーucOC 濃度の変化割合 (摂取 11 ヶ月後)
p 値 : Kruskal- Wallis 順位和検定

4-3-3 高感度 PTH 濃度と血清総カルシウム濃度の変化

高感度 PTH 濃度について、3 群とも調査期間において統計学的有意であった(対照群: $p=0.003$, LE 群および LECA 群: $p<0.001$) (図 4-6a)。高感度 PTH 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともマイナス(LECA 群:-0.19, LE 群:-0.11, 対照群:-0.08)の変化が認められ、LECA 群は対照群よりも有意($p=0.040$)に減少していた (図 4-6b)。

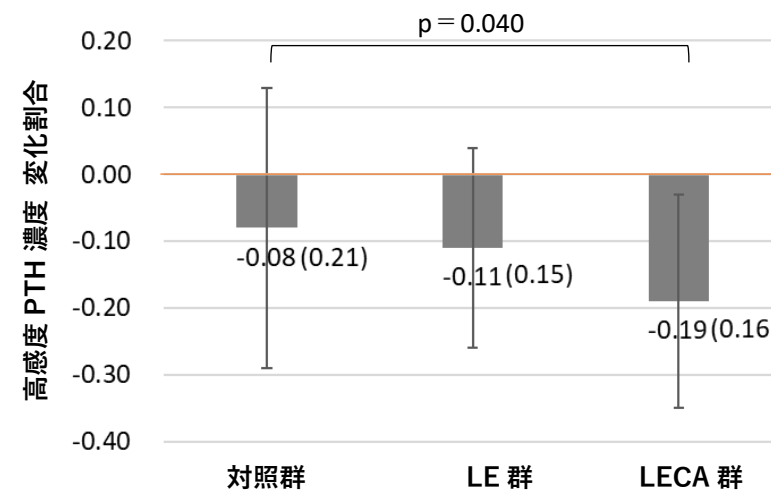
血清総カルシウム濃度について、LE 群および LECA 群は、調査期間において統計学的有意であった($p<0.001$) (図 4-7a)。血清総カルシウム濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともプラス(LECA 群:0.03, LE 群:0.03, 対照群:0.01)の変化が認められ、有意差はなかった($p=0.102$) (図 4-7b)。



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	395.0 (340.0-470.0)	330.0 (270.0-390.0)	365.0 (305.0-442.5)
LE 群 (n=28)	460.0 (402.5-515.0)	410.0 (320.0-470.0)	395.0 (362.5-447.5)
LECA 群 (n=28)	415.0 (355.0-460.0)	325.0 (280.0-365.0)	320.0 (280.0-397.5)

図 4-6a 高感度 PTH 濃度の変化

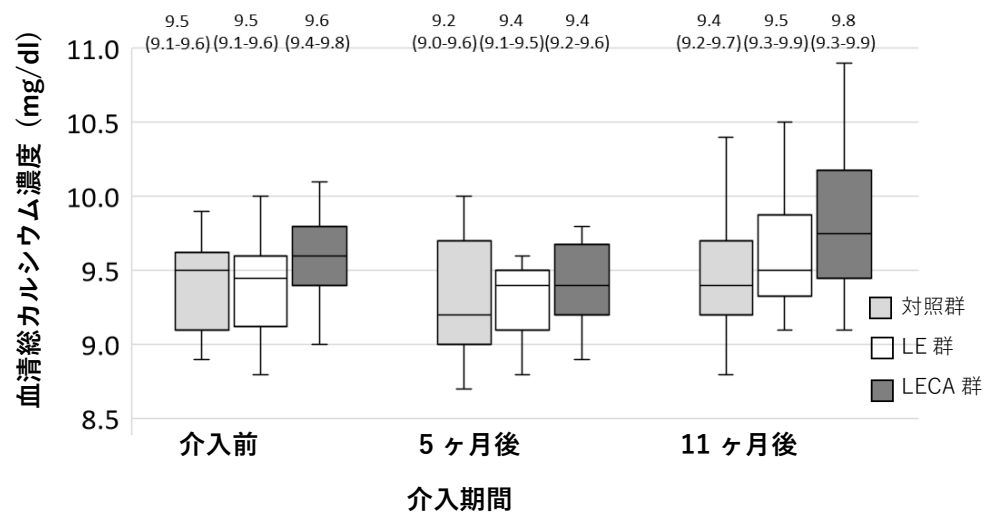
Friedman 検定 対照群: $p=0.003$; LE 群: $p<0.001$; LECA 群: $p<0.001$



対照群 (n=23)	LE 群 (n=28)	LECA 群 (n=28)	p 値
-0.08 (0.21)	-0.11 (0.15)	-0.19 (0.16)	0.056

図 4-6b 高感度 PTH 濃度の変化割合 (摂取 11 ヶ月後)

p 値: 一元配置分散分析, Dunnett 多重比較



	介入前	5ヶ月後	11ヶ月後
対照群 (n=23)	9.5 (9.1-9.6)	9.2 (9.0-9.6)	9.4 (9.2-9.7)
LE群 (n=28)	9.5 (9.1-9.6)	9.4 (9.1-9.5)	9.5 (9.3-9.9)
LECA群 (n=28)	9.6 (9.4-9.8)	9.4 (9.2-9.6)	9.8 (9.3-9.9)

図 4-7a 血清総カルシウム濃度の変化

Friedman 検定 対照群: p=0.616; LE群:p<0.001; LECA群:p<0.001

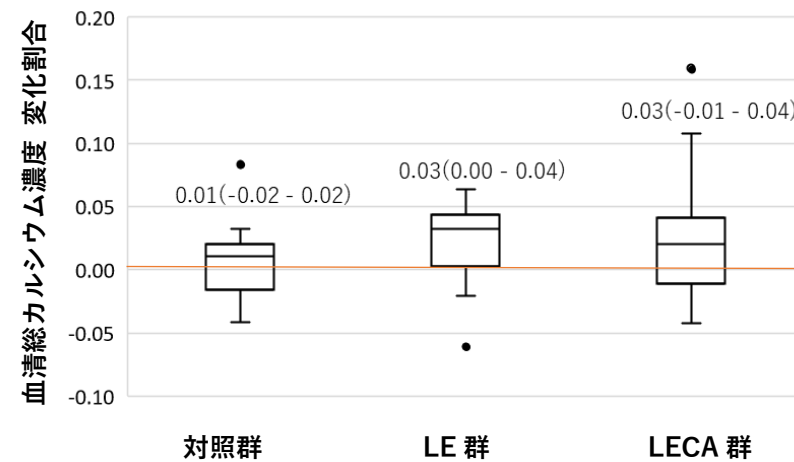


図 4-7b 血清総カルシウム濃度の変化割合 (摂取 11ヶ月後)

p値: Kruskal-Wallis 順位和検定

4-4 考察

この章では11ヶ月に渡るクエン酸を含むレモン飲料のカルシウム配合有無の長期の介入によって、閉経後の健常な女性 [平均年齢 (±標準偏差), 64.7 ± 6.0 歳] の骨代謝に関する項目の評価を行った。

骨吸収マーカーの TRACP-5b 濃度について、LECA 群では、試験飲料摂取 11 ヶ月後に介入前からマイナスの変化が認められた。骨形成マーカーの OC 濃度について、摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群は LE 群よりも有意に減少していた。さらに BAP 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群は対照群および LE 群よりも有意に小さかった。これらの結果は、レモンの酸味の主成分であるクエン酸によるキレート作用が関連していると考えられる。これは試験飲料を継続摂取することで、クエン酸によるキレート作用によってカルシウムの吸収が促進され、血中カルシウム濃度が保たれた結果と考えられる。血中カルシウム濃度が保たれ結果、骨からのカルシウム供給が必要なくなり、LECA 群で破骨細胞による骨吸収が抑制された。それに伴い、骨芽細胞の合成機能も抑制され、骨形成も抑制されたものと考えられる。つまり、閉経による高回転型の骨代謝^{76,77)}を抑制し、加齢による腸管からのカルシウム吸収の低下やビタミン D 不足 (摂取の低下、紫外線不足による体内での産生低下など) から引き起こされる腎臓でのビタミン D の活性障害によるカルシウム吸収の低下による負のカルシウムバランス¹⁴⁾を抑制したと推察される。

レモン果汁にはクエン酸が豊富に含まれている (1.44g/oz)²⁸⁾ことが知られている。クエン酸によるキレート作用はカルシウムや鉄等のミネラル成分を水に溶けやすくして吸収率を高めるとされており²⁹⁻³¹⁾、本研究結果である LECA 群で骨吸収マーカーおよび骨形成マーカーの増加抑制につながり、骨代謝回転の亢進が抑制されたと推測される。骨形成マーカーは骨吸収抑制に応じてカップリング現象で二次的に低下するため、骨吸収マーカー低下より遅れて低下すると考えられている⁴⁾。本研究の LECA 群では、試験飲料摂取 11 ヶ月後に、TRACP-5b 濃度は介入前からマイナス、BAP 濃度は介入前からの増加はほとんどなく、

これらから骨吸収の抑制より骨形成の増加の抑制が遅延していることが推測され、同様の変化が起きている可能性が考えられる。さらにこの骨代謝マーカーの変化は、経口イバンドロネートの薬物療法による介入研究⁷⁸⁾とも同様であると考えられる。この研究では、毎日あるいは断続的な経口イバンドロネートの投与により、骨吸収マーカーは介入開始から3ヶ月までに約50~60%と大幅に減少しているが、骨形成マーカーは介入開始3ヶ月までの減少率は約30%となっており、骨吸収マーカーに比べると緩やかになっている。したがって、カルシウム配合レモン飲料を継続的に摂取することにより、薬物療法時と同様の変化が起きていると考えられる。

骨マトリックス関連マーカーである ucOC 濃度は、LECA 群で試験飲料摂取 11 ヶ月後に有意に減少していたことから、骨組織におけるビタミン K が骨吸収抑制および骨形成促進のために作用していると推測できる。ucOC は非 Gla 化オステオカルシンであり、カルシウムと結合不可能である⁵⁴⁾ため、ucOC 濃度の高値は骨でのビタミン K 作用不足、つまり骨形成抑制および骨吸収促進状態であることを意味している⁷⁹⁾。女性における ucOC の加齢変化を検討した研究⁸⁰⁾では、年齢とともに ucOC 濃度は高値となったと報告している。骨形成および骨吸収の亢進した⁸¹⁾高骨代謝回転の状態では、骨においてビタミン K が作用しておらず、ucOC が骨基質に取り込まれることなく血中に放出されて ucOC 濃度も高値となると推測される。本研究では、LECA 群において試験飲料摂取 11 ヶ月後で骨吸収および骨形成マーカーの増加を抑制した。骨代謝回転における ucOC 濃度を明らかにすることを本研究の目的とはしていないが、骨組織において、ビタミン K が骨吸収抑制および骨形成促進のために作用していると推測できる。

そのほか、骨の代謝に直接かかわる因子として副甲状腺ホルモン、カルシトニンなどがある。カルシトニンおよびエストロゲンは骨塩溶出を抑制して骨を保護するのに対し、副甲状腺ホルモンは骨塩溶出を亢進させる作用がある⁸²⁾。通常はこれらのホルモンが互いにバランスを保って骨代謝を調節しているが、加齢に伴い、骨を保護するカルシトニンお

よびエストロゲンの分泌が減少し、骨塩溶出を促進する副甲状腺ホルモンの分泌が亢進することで、骨粗鬆症の発症に拍車をかけることへつながると考えられる。しかし、高感度PTH濃度および血清総カルシウム濃度の経時的変化に有意差を認めているものの、これらの値は正常範囲内であり、本研究の対象者に副甲状腺機能亢進状態や高カルシウム血症のものはいなかったと考えられる。副甲状腺ホルモンである高感度PTH濃度の摂取11ヶ月後の変化割合は、3群ともマイナスの変化があったが、LECA群は対照群よりも有意に減少していた。副甲状腺ホルモンは、血中カルシウム濃度を感知し、それに応じて分泌を調整している⁸³⁾ため、LECA群で高感度PTH濃度が減少した割合が大きかったことは、血中カルシウム濃度が対照群・LE群よりも保たれていたと考えられる。つまり、対照群・LE群では血清総カルシウム濃度の値は正常範囲内ではあったが、骨からのカルシウム排出が行われていると考えられる。LECA群の血清総カルシウム濃度は、介入前と比較するとプラスの変化があったにもかかわらず、骨吸収は抑えられているという結果から、クエン酸によるカルシウム吸収が促進されたと推測される。骨は骨リモデリングによる過程を経て血中カルシウム濃度を一定に保っている⁸⁴⁾ため、骨代謝に関する項目の変化から、LECA群では、クエン酸によるキレート作用によるカルシウムの吸収が促進されたと推察でき、カルシウム配合レモン果汁飲料の11ヶ月間の継続摂取により、クエン酸のキレート作用がはたらき、カルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が保たれた結果、骨からのカルシウム供給が必要なくなり、LECA群で破骨細胞による骨吸収が抑制された。それに伴い骨芽細胞の合成による骨形成も抑制され、高回転型の骨代謝を抑制したことが推察された。

第5章

本研究の総括と今後の展望

本研究では、クエン酸のキレート作用を利用したレモン果汁飲料のカルシウム配合有無による骨への影響を明らかにするために、健常な閉経後女性を対象として11ヶ月間の介入により、躯幹骨（腰椎・大腿骨近位部）の骨密度および骨代謝に関連する項目にて骨の総合評価を行った。その結果、骨代謝回転の亢進の抑制、そして、骨密度の維持を明らかにした。

第1章では、本研究の緒言として、研究の背景、骨の構造・役割・機能、骨に重要な栄養素、骨粗鬆症、骨代謝マーカー、レモンのクエン酸による骨への効果、研究の目的について述べた。

骨粗鬆症による骨量減少とそれに伴って発症する骨折は、寝たきりの原因の一つであり、社会的に大きな問題となっている。

骨は、リン酸カルシウムの沈着した硬組織で構成されており、運動や身体支持といった機能を担う運動器の一部であるだけでなく、カルシウム代謝器官でもある。そして、骨リモデリングにより、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、生体のカルシウム恒常性を維持している。

女性は、閉経を迎えるとエストロゲンの消退により高骨代謝回転型の状態となり、骨量が急激に減少していくため、閉経後女性における骨粗鬆症の頻度はきわめて高く、重篤な合併症である骨折を引き起こしやすい。また、加齢による腸管からのカルシウム吸収の低下、ビタミンD不足、腎臓でのビタミンDの活性障害による吸収低下により負のカルシウムバランスになる。その代償として軽度の副甲状腺機能亢進状態となり、副甲状腺ホルモンの破骨細胞機能亢進により骨からのカルシウムが供給され血中カルシウム濃度が保たれることになる。以上のことから、閉経後骨粗鬆症予防のためには、高骨代謝回転を抑制することが重要である。

昨今、クエン酸のキレート作用を応用し、栄養素の機能を利用した骨代謝や骨密度に対する効果の研究が行われているが、カルシウム吸収についてクエン酸を含むレモンを用いた効果として、健康な人を対象とした骨密度や骨代謝の研究はあまり行われていない。

そこで本研究では、閉経後女性を対象として、医療機関と連携し、試験飲料を用いた患者臨床研究を行い、ミネラル成分を吸収するクエン酸のキレート作用の効果を検証することと、健常者における試験飲料を用いた介入試験を行い、骨密度と骨代謝への影響について検証することとした。これらの研究では、骨密度評価および骨代謝に関連する項目の評価にて骨の総合評価を行い、試験飲料の継続摂取による有効性について検証することとした。

第2章では、カルシウム配合レモン果汁飲料を用いた医療機関と連携した臨床研究について述べた。カルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料の摂取による、骨密度・骨代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、閉経後女性患者を対象として試験飲料を6ヶ月継続摂取した場合の有効性を検証した。試験飲料にはレモン果汁は30ml含まれており、LECA群のレモン果汁飲料カルシウム配合ありには350mgのカルシウムが含まれている。レモン果汁30mlは、堂本ら³⁷⁾が行った研究で血圧が有意に低くなる効果を得ており、通常の食品として摂取している範疇の量として健康被害の可能性については特に報告は無く、安全性に問題はない。カルシウムは、成人女性の1日の摂取目安量は700mg程度⁴⁶⁾であり、食事でのカルシウム摂取を加味して1日の摂取目安量の半分である350mgを摂取量とした。

試験飲料を6ヶ月間継続して摂取した結果、クエン酸のキレート作用によってカルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が一定濃度に保たれたことにより、骨からのカルシウム供給が必要なくなり、骨吸収マーカー（TRACP-5b濃度）が減少したことが推察された。そして骨形成マーカー（OC濃度）も飲料摂取6ヶ月後に減少が認められことから、破骨細胞の代謝マーカーであるTRAP-5b濃度が先に述べた（クエン酸の作用によりカルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が補充され一定濃度に保たれたという）理由で減少したことが考えられ、骨形成マーカー（OC濃度）も骨吸収抑制効果の結果として骨芽細胞の合成も抑制されたために減少したものと考えられる。以上のことから、骨代謝回転の亢進が抑制されたことが推察され、骨密度値は減少する年齢にもかかわらず減少は認められなかった。しかし、閉経後女性患者を対象としており、骨密度値がYAM70%未満のものも多

く、骨粗鬆症予防の観点から、健常な閉経後女性を対象とした検証が必要だと考えられる。この研究では、前腕骨遠位部の骨密度値を評価したが、骨粗鬆症による骨折を評価するには、DEXA 法による腰椎や大腿骨といった躯幹骨の骨密度評価が推奨されている。さらに、カルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料の摂取によりカルシウム吸収が促進されたことが推察されるが、レモン成分による効果なのか、レモンのクエン酸によるキレート作用のカルシウム吸収促進効果なのかを明らかにする必要がある。そのため、上記の課題を解決し、健常者を対象とした長期的な介入試験が必要とされた。

第3章では、対象とした健常な閉経後女性を、カルシウム配合レモン果汁飲料を摂取する (LECA) 群、カルシウム配合なしレモン果汁飲料を摂取する (LE) 群、試験飲料を摂取しない対照群の3群に分類し、試験飲料の継続的な摂取が骨密度へ及ぼす影響について検討した。

介入群の LECA 群および LE 群には、二重盲検法により試験飲料を配布し、11ヶ月間継続摂取した。その結果、腰椎骨密度値の変化に交互作用が認められ、摂取11ヶ月後の変化割合は、LECA 群はプラス、LE 群及び対照群はマイナスの変化があり、LECA 群と対照群、LE 群と対照群、LECA 群と LE 群との間に有意差が認められた。大腿骨近位部骨密度値の変化に交互作用が認められ、摂取11ヶ月後の変化割合は、LECA 群はプラス、LE 群および対照群はマイナスの変化があり、LECA 群と対照群、LECA 群と LE 群との間に有意差が認められた。これは試験飲料を継続摂取することで、クエン酸によるキレート作用によってカルシウムの吸収が促進され、血中カルシウム濃度が一定濃度に保たれた結果と考えられる。腰椎骨密度値と大腿骨近位部骨密度値の変化割合において、LE 群と LECA 群との間にも有意差が認められたため、レモン果汁のみの飲料を摂取するより、レモン果汁にカルシウムを配合した飲料を摂取したほうが効果的であると考えられる。骨密度が減少する時期にもかかわらず、維持できていたことや、海綿骨が主体である腰椎と皮質骨が主体である大腿骨の両部位において効果が見られたことは、大変意義のあることである。

第4章では、第3章と同様に、対象とした健常な閉経後女性を、カルシウム配合レモン果

汁飲料を摂取する (LECA) 群、カルシウム配合なしレモン果汁飲料を摂取する (LE) 群、試験飲料を摂取しない対照群の 3 群に分類し、試験飲料の継続摂取が骨代謝に与える影響について検討した。

介入群の LECA 群および LE 群には、二重盲検法により試験飲料を配布し、11 ヶ月間継続摂取した。その結果、骨吸収マーカーの TRACP-5b 濃度について、交互作用が認められ、摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群はマイナス、LE 群及び対照群はプラスの変化があり、LECA 群は、対照群および LE 群との間に有意差が認められた。骨形成マーカーの OC 濃度について、交互作用が認められ、摂取 11 ヶ月後の変化割合は、LECA 群は LE 群よりも有意に減少していた。さらに BAP 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともプラスの変化があったが、LECA 群は対照群および LE 群よりも有意に小さかった。骨マトリックス関連マーカーの ucOC 濃度の経時的変化は、LECA 群で有意差が認められた。これらの結果は、レモンの酸味の主成分であるクエン酸によるキレート作用が関連していると考えられ、LECA 群の ucOC 濃度の変化から、ビタミン K が骨吸収抑制および骨形成促進のために作用していると推測できた。骨の代謝に関わっている副甲状腺ホルモンである高感度 PTH 濃度の摂取 11 ヶ月後の変化割合は、3 群ともマイナスの変化があったが、LECA 群は対照群よりも有意に減少していたことから、他の 2 群よりも血中カルシウム濃度が保たれていたと考えられる。これらの骨代謝に関する項目の変化から、LECA 群では、クエン酸によるキレート作用によるカルシウムの吸収が促進されたと推察できる。カルシウム配合レモン果汁飲料の 11 ヶ月間の継続摂取により、クエン酸のキレート作用がはたらき、カルシウム吸収が促進され、血中カルシウム濃度が保たれた結果、骨からのカルシウム供給が必要なくなり、LECA 群で破骨細胞による骨吸収が抑制された。それに伴い骨芽細胞の合成による骨形成も抑制され、高回転型の骨代謝を抑制したことが推察された。

本研究の結果は、クエン酸のキレート作用による食事中的カルシウム吸収も促している可能性が推察できるが、個々の食事調査をしておらず、生活習慣などの不均質があることは否定できず、今後食事調査を行い確かな論証が必要である。そして、本研究の第3章と第4

章における対象者は、医療機関の患者や施設入所者ではなく、健康調査への自由意志による参加者であるため、対象者が健康状態の良い者あるいは健康意識の高い者に偏っている可能性がある。

また、カルシウムのみを摂取する群は設けなかった。日本においては、骨折の予防、もしくは骨密度の維持・低下抑制を目的としたカルシウムサプリメント投与をおこなう大規模な無作為化臨床試験は行われおらず⁸⁵⁾、カルシウムサプリメント投与に関するエビデンスが確立されていない。Bolland ら⁸⁶⁾の報告では、26 件のカルシウムサプリメント摂取によるランダム化比較試験において、股関節・前腕骨の骨折リスクの低下を認めていない。また、健康な閉経後女性を対象としたカルシウム・ビタミンD補給と骨折リスクについて検討した研究⁸⁷⁾で、炭酸カルシウム(1日あたり最大1000mg)とビタミンD(1日あたり最大600IU)補給による股関節骨折発生率は、プラセボ群と比較して有意ではなく、全骨折、椎骨骨折、前腕あるいは手首骨折の発生率に有意な減少はなく、腎臓結石のリスクを増加させたという報告がある。食事とサプリメントからのカルシウム摂取量と冠動脈石灰化リスクの研究⁸⁸⁾において、カルシウムサプリメントを使用すると冠動脈石灰化の発症リスクが上昇する(約540mg~1200mgの摂取でリスクが5~23%高くなる)可能性があるとの報告もある。このように、カルシウムのみを摂取では骨折のリスクを低下させることはできないというエビデンスがあること、カルシウムサプリメントの投与による不利益が発生するリスクが考えられること、本研究の目的としてクエン酸を含むレモン果汁のカルシウムへの作用としたため、カルシウムのみを摂取する群は設定しなかった。しかしながら、普段通りの生活を送り、試験飲料を飲むことによって得た本研究の結果は、新規的であると考えられる。さらに、今回の対象者の体格条件は、わが国の他の調査における同年齢の平均値⁸⁹⁾に近似した値であった。それゆえ、少なくとも対象者の体格条件からみた本研究結果の一般閉経後女性への外的妥当性が示唆された。

閉経後女性において、クエン酸を含むレモン果汁飲料にカルシウム配合させることによって、クエン酸のキレート作用により、カルシウムの吸収促進に伴い骨吸収が抑制された。

さらに、骨吸収抑制に伴い骨芽細胞の合成による骨形成も抑制され、高回転型の骨代謝を抑制したことが推察された。そしてそれが腰椎、大腿骨近位部の両部位の骨密度に反映されているという新たな知見を得た。骨粗鬆症に対しては、現在、薬物療法がおこなわれているが、問題点として、骨粗鬆症（YAM 70%未満）の診断がなければ処方されないこと、治療薬であるビスフォスフォネート製剤は、起床時にコップ1杯(約180cc)の水でかまずに服用し、服用後は少なくとも30分は臥床できず、水以外のものを摂取できないなど内服方法が煩雑であること、先行研究において経口連日製剤の継続率は高くなかったという報告⁹⁰⁻⁹²⁾もあり、コンプライアンスが悪いことなどが挙げられる。本研究のカルシウム配合レモン飲料は疾患、診断の有無にかかわらず摂取することができ、摂取時間や摂取方法の指定や制限がなく継続摂取することが容易である。

以上より、本研究ではカルシウムを配合したクエン酸を含むレモン果汁飲料の骨粗鬆症予防の効果の可能性について新たな知見を得た。

謝 辭

本学位論文作成に当たり、多大なるご指導を賜りました公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 飯田忠行教授、公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 原田俊英教授に厚く御礼申し上げます。

また、お忙しい中、副査として本学位論文への御高見を賜るとともに、御教示くださいました公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 小野武也教授、公立大学法人県立広島大学総合学術研究科生命システム科学専攻 沖貞明教授に心より感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり、多くの御支援・御教示および調査への協力をしていただきました公立大学法人県立広島大学 石崎文子名誉教授、公立大学法人県立広島大学保健福祉学部 青井聡美教授、広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宮口英樹教授、広島修道大学健康科学部 新田由美子教授、公立大学法人県立広島大学保健福祉学部 金指美帆先生、ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社研究開発本部基盤研究開発部 井上孝司様、ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社研究開発本部基盤研究開発部 平光正典様、大阪大学大学院医学系研究科 三宅隆准教授、県立安芸津病院関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

文献

- 1) 厚生労働省, 平成 27 年度 介護保険事業状況報告 (年報) 概要
https://www.mhlw.go.jp/topics/kaigo/osirase/jigyo/15/dl/h27_gaiyou.pdf 参照日 2018.07.23.
- 2) 厚生労働省, 平成 28 年 (2016) 国民生活基礎調査の概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa16/dl/16.pdf> 参照日 2020.09.09.
- 3) 伊木雅之. 地域保健におけるエビデンスに基づく骨折・骨粗鬆症予防ガイドライン. 東京, 財団法人 日本公衆衛生協会, 2004; 3-7.
- 4) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会(委員長 折茂肇), 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版, 2015.
- 5) 高柳広. 骨研究がわかる シグナル研究から広がる骨代謝と生体制御のクロストーク. 東京, 羊土社, 2005; 58-64.
- 6) Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanism. Trends Endocrinology metabolism, 2012; 23(11), 582-590.
- 7) 竹田秀. 骨代謝の調節機構. 日本腎臓学会誌, 2014; 56(8), 1188-1195.
- 8) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明. 骨の科学. 東京, 医歯薬出版, 1985.
- 9) Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. Calcified Tissue International, 1984; 36, s37-s45.
- 10) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Journal of American Medical Association, 2001; 285(6): 785-795.
- 11) 東浩太郎. 骨粗鬆症のメカニズム. 日本老年医学会雑誌, 2019; 56, 116-123.
- 12) 太田博明, 野沢志朗. 閉経後骨粗鬆症－エストロゲンの低下と骨吸収の亢進を中心に. 医学のあゆみ, 1995; 175(2), 131-135.
- 13) 山崎薫, 井上哲郎. 閉経後骨粗鬆症, (折茂肇ほか編. 最新骨粗鬆症.)東京, ライフサイエンス出版株式会社, 1999; 47-51.
- 14) Banba N, Change by the Aging -Internal secretion metabolism-. Dokkyo Journal of Medical Sciences, 2008; 35(3), 209-218.
- 15) 三浦雅一. [医学検査のあゆみ] 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの実践的活用方法について. モダンメディア, 2016; 62(9), 298-303.
- 16) 太田博明. [新しい検査法] 骨形成マーカー「骨型アルカリホスホターゼ」測定の意義と測定法に関する新たな進展. モダンメディア, 2012; 58(5), 143-148.
- 17) 辻王成, 浦門操, 小柳英一, 篠原道雄, 久重雅由, 成尾政一郎, 成尾政圀. TRACP-5b 検体の安定性に関する問題点についての検討. 整形外科と災害外科, 2012; 61(4), 788-792.
- 18) 辻王成, 浦門操, 小柳英一, 篠原道雄, 久重雅由, 成尾政一郎, 成尾政圀. 骨粗鬆症治療における骨代謝マーカーの比較－TRACP-5b と血清 NTX－. 整形外科と災害外科, 2011; 60(3), 473-476.
- 19) 市村正一. 低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC). 骨粗鬆症治療, 2009; 8(1), 65-69.
- 20) 小林正. ビタミン D とカルシウム代謝. 栄養学雑誌, 1997; 55(5), 217-229.

- 21) 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 総論 ミネラル (多量ミネラル)
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000114400.pdf> 参照日 2020-12-11.
- 22) Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects, *Physiological Reviews*, 2016; 96(1), 365-408.
- 23) National Institutes of Health/ Office of Dietary Supplements/ Fact Sheet for Health Professionals/Vitamin D
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/Nov.9.2019.Introduction.1/33>. 参照日 2020.12.02
- 24) 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 総論 ビタミン (脂溶性ビタミン)
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000042635.pdf> 参照日 2020.09.23.
- 25) 坂本亘, 池田隆幸, 藤井義博. 骨粗鬆症と栄養素, 藤女子大学福祉研究所年報. 2006; 1(1), 8-24.
- 26) Leveille SG, LaCroix AZ, Koepsell TD, Beresford SA, Belle GV, Buchner DM. Dietary vitamin and bone mineral density in postmenopausal women in Washington State, USA. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 1997; 51(5), 479-485.
- 27) Hall SL, Greendale GA. The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI Study. *Calcified Tissue International*, 1998; 63(3), 183-189.
- 28) Penniston KL, Nakada SY, Holmes RP, Assimos DG. Quantitative assessment of citric acid in lime juice, and commercially – available fruit juice products. *Journal of Endourology*, 2008; 22(3), 567-570.
- 29) Lacour B, Taedivel S, Drüeke T. Stimulation by citric acid of calcium and phosphorous bioavailability in rats fed a calcium-rich diet. *Miner and Electrolyte Metabolism*, 1997; 23(2), 79-87.
- 30) Charles Y. C. Pak, Jean A. Harvey, Ming Chue Hsu, Enhanced calcium bioavailability from a solubilaized form of calcium citrate. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1987; 65, 801-805.
- 31) Miller JZ, Smith DL, Flora L, Slemenda C, Jiang XY, Johnston CC Jr. Calcium absorption from calcium carbonate and a new form of calcium (CCM) in healthy male and female adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1988; 48(5), 1291-1294.
- 32) Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1982; 35(4), 783-808.
- 33) Kochanowski BA. Effect of calcium citrate-malate on skeletal development in young, growing rats. *The Journal of Nutrition*, 1990; 120(8), 876-881.
- 34) Hua P, Xiong Y, Yu Z, Liu B, Zhao L. Effect of *Chlorella Pyrenoidosa* Protein Hydrolysate-Calcium Chelate on Calcium Absorption Metabolism and Gut Microbiota Composition in Low-

- Calcium Diet-Fed Rats. *Marine Drugs*, 2019; 17(6), 348.
- 35) 新居住孝, 福田和弘, 清蔭亮子, 坂井堅太郎, 山本茂. しらす干しカルシウムの可溶化に及ぼす柑橘果汁の影響-in vitro での検討-. *日本栄養・食糧学会誌*, 1997; 50(6),439-443.
- 36) Jehle S, Hulter HN, Krapf R. Effect of potassium citrate on bone density, microarchitecture, and fracture risk in healthy older adults without osteoporosis: a randomized controlled trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013; 98(1): 207-217.
- 37) 堂本時夫, 瀧川厚, 石崎文子, 青井聡美, 十河正典, 飯田忠行, 住廣香里, 白岩加代子, 加藤洋司, 三宅由希子, 石原克秀, 池田ひろみ, 中村悟, 安武繁, 小山矩. 瀬戸内島嶼部の柑橘栽培農家中高年女性における骨密度および生活習慣病関連指標. *人間と科学 県立広島大学保健福祉学部誌*, 2010; 10(1), 67-73.
- 38) 稲葉雅章, 西澤良記. 骨粗鬆症 骨粗鬆症の検査, 診断の進歩. *日本内科学会雑誌*, 2008; 97(10), 76-82.
- 39) 鈴木康夫. 新しい検査の意義と使い方 骨代謝マーカー. *日本内科学会誌*, 2007; 96(10), 31-38.
- 40) 吉田顕. 閉経後早期女性におけるラロキシフェンの骨代謝回転改善効果の検討. *Osteoporosis Japan*, 2006; 14(3), 503-506.
- 41) Wallach S, Cohen S, Reid DM, Hughes RA, Hosking DJ, Laan RF, Doherty SM, Maricic M, Rosen C, Brown J, Barton I, Chines AA. Effects of risedronate treatment on bone density and vertebral fracture in patients on corticosteroid therapy. *Calcified Tissue International*, 2000; 67(4), 277-285.
- 42) Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, Harbour RT, Caldwell LM, Creed G. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011; 7, CD000333.
- 43) Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Osteoporosis: underrated, underdiagnosed and undertreated. *The Medical Journal of Australia*, 2004; 180(5), S18-22.
- 44) Hirota T, Nara M, Ohguri M, Manago E, Hirota K. Effect of diet and lifestyle on bone mass in Asian young women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992; 55(6), 1168-1173.
- 45) Nordin BEC. The effect of calcium supplementation on bone loss in 32 controlled trials in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 2009; 20(12), 2135-2143.
- 46) 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2015 年版) の概要. <http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000041955.pdf> 参照日 2015.6.26.
- 47) Matsumoto T, Hokari T, Hashizume M, Yamaguchi M. Effect of Sargassum horneri Extract on Circulating Bone Metabolic Markers: Supplemental Intake Has an Effect in Healthy Humans. *Journal of Health Science*, 2008; 54(1), 50-55.
- 48) 栗原晶子, 津川尚子, 田中清, 藤井美野里, 河合信子, 迎幸子, 加藤讓, 小島康子, 高橋香, 小村一誠, 加川鈴子, 井上章, 野池利彰, 木戸詔子, 岡野登志夫. 日本人施設入居高齢者におけるビタミン D3 介入試験. *Osteoporosis Japan*, 2010; 18(1), 21-26.

- 49) Kamel S, Fardellone P, Meddah B, Lorget-Gondelmann F, Sebert JL, Brazier M. Response of several markers of bone collagen degradation to calcium supplementation in postmenopausal women with low calcium intake. *Clinical Chemistry*, 1998; 44(7), 1437-1442.
- 50) 日本骨粗鬆症学会. 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用に関する指針検討委員会. 骨粗鬆症における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン(2004年版), *Osteoporosis Japan*, 2004; 12(2), 191-207.
- 51) 鈴木康夫. I.新しい検査の意義と使い方 5. 骨代謝マーカー. *日本内科学会雑誌*, 2007; 96(10), 2152-2158.
- 52) Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996; 11(2), 150-159.
- 53) Seeman E, Delmas PD. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England Journal of Medicine*, 2006; 354(21), 2250-2261.
- 54) 岸川陽一. 骨粗鬆症の治療における ucOC (低カルボキシル化オステオカルシン) 検査の実際. *整形外科と災害外科*, 2011; 60(3), 477-479.
- 55) 市村正一. 低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC). *骨粗鬆症治療*, 2009; 8(1), 65-69.
- 56) 山崎薫, 井上哲郎. 閉経後骨粗鬆症. (折茂肇ほか編, 最新骨粗鬆症.) 東京, ライフサイエンス出版株式会社, 1999; 47-51.
- 57) 大蔵健義, 一瀬邦弘, 田中邦明, 渡部秀樹, 堀中俊孝, 三ツ矢和弘, 榎本英夫, 稲葉憲之. 女性の記憶機能に関する知見補遺とエストロゲンが記憶に及ぼす影響についての検討. *日本更年期医学会雑誌*, 1998; 6, 34-42.
- 58) 五来逸雄. 加齢による骨代謝の変化とエストロゲンの生理学的意義に関する研究. *日本産婦人科学会雑誌*, 1997; 49(8), 537-545.
- 59) 飯田忠行, 石崎文子, 早志真澄, 石川 浩章, 小山 矩, 澤田 昭三, 岸田 典子. 閉経が骨代謝指標と骨密度に及ぼす影響 骨代謝指標の有用性についての検討. *臨床化学*, 2001; 30(20), 43-48.
- 60) Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, Petak SM, Bachrach LK, Shepherd JA, Downs RW Jr. International Society for Clinical Densitometry: Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004; 89(8): 3651–3655.
- 61) Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, and Vogt TM. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *The Lancet*, 1993; 341: 72–75.
- 62) 福永仁夫. 骨密度測定と骨粗鬆症の臨床研究. *川崎医会誌一般教養*, 2010; 36, 1-9.
- 63) 福永仁夫, 曾根照喜. 骨密度の測定. *日本内科学会雑誌*, 2005; 94(4), 670-674.
- 64) 山本恵子. 高齢者の骨折が生活に及ぼす影響. *茨城県立医療大学紀要*, 1996; 1, 55-64.
- 65) Smith EL, Gilligan C, Smith PE, Sempos CT. Calcium supplementation and bone loss in middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1989; 50(4), 833-842.

- 66) Reid IR, Ames RW, Evans MC, Sempos CT. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *The American Journal of Medicine*, 1995; 98(4), 331–335.
- 67) 鈴木隆雄. 骨量の自然史と骨粗鬆症, 骨折の予防戦略. *日本臨牀*, 2004; 62(2), 225-232.
- 68) 日本骨代謝学会 骨粗鬆症診断基準検討委員会. 原発性骨粗鬆症の診断基準(1996年度改訂版). *Osteoporosis Japan*, 1996; 4, 643-653.
- 69) Gonnelli S, Cepollaro C, Pondrelli C, Martini S, Montagnani A, Monaco R, Gennari C. Bone turnover and the response to alendronate treatment in postmenopausal osteoporosis. *Calcified Tissue International*, 1999; 65, 359–364.
- 70) Ross PD, Kress BC, Parson RE, Wasnich RD, Armour KA, Mizrahi IA. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporosis International*. 2000; 11(1),76-82.
- 71) Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Bréart G, Meunier PJ, Delmas PD. Delmas. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women; EPIDOS prospective study. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 1996; 11, 1531–1538.
- 72) Yamamura J, Aoe S, Toba Y, Moyouri M, Kawakami H, Kumegawa M, Itabashi A, Takada Y. Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002; 66(3), 702-704.
- 73) Aoe S, Toba Y, Yamamura J, Kawakami H, Yahiro M, Kumegawa M, Itabashi A, TAKADA Y. Controlled trial of effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001; 65(4), 913-918.
- 74) Aoe S, Koyama T, Toba Y, Itabashi A, Takada Y. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. *Osteoporosis International*, 2005; 16, 2123-2128.
- 75) 堀内登. 副甲状腺ホルモンの構造と機能. *日本骨代謝学会雑誌*, 1985; 3(1), 16-28.
- 76) Riggs BL. Pathogenesis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1987; 156(5), 1342–1346.
- 77) Pfeilschifter J, Bonewald L, Mundy GR. Characterization of the latent transforming growth factor beta complex in bone. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 1990; 5, 49–58.
- 78) Delmas PD, Recker RR, Chesnut CH III, Skag A, Stakkestad JA, Emkey R, Gilbride J, Schimmer RC, Christensen C. Daily and intermittent oral ibandronate normalize bone turnover and provide significant reduction in vertebral fracture risk: results from the BONE study. *Osteoporosis International*, 2004; 15(10), 792–798.
- 79) Villa JKD, Diaz MAN, Pizziolo VR, Martino HSD. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017; 57(18), 3959–3970.
- 80) Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its

- relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcified Tissue International*, 1998; 62(4), 286–289.
- 81) Nguyen TV, Center JR, Eisman JA. Osteoporosis: underrated, underdiagnosed and undertreated. *The Medical Journal of Australia*, 2004; 180(5), S18–22.
- 82) 江澤郁子. 老人とカルシウム. *家政学雑誌*, 1985; 36(11), 898-902.
- 83) 井上大輔. 4.副甲状腺・カルシウム代謝異常. *日本内科学会雑誌*, 2003; 92(4), 570-576.
- 84) Peacock M. Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clinical journal of the American society of Nephrology*, 2010; 5, S-23-30.
- 85) 久保田恵. カルシウム摂取による骨折・骨粗鬆症予防のエビデンス. *日本衛生学雑誌*, 2003; 58(3), 317-327.
- 86) Bolland MJ, Leung W, Tai V, Bastin S, Gamble GD, Grey A, Reid IR. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ*, 351:h4580, 2005.
- 87) Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SAA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner PL, et al. for the Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *The New England Journal of Medicine*, 2006; 354:669-683.
- 88) John JBA, Kruszka B, Delaney JAC, He K, Burke GL, Alonso A, Bild DE, Budoff M, Michos ED. Calcium intake from diet and supplements and the risk of coronary artery calcification and its progression among older adults: 10-year follow-up of the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Journal of the American Heart Association*, 2016; 5(10): e003815.
- 89) Public welfare statistics handbook. Mean of Height, the Weight, Sex, Annual× Age distinction [Internet]. Ministry of Health, Labour and Welfare (2017) Available from: https://www.mhlw.go.jp/toukei/youran/indexyk_2_1.html. 参照日 2019.5.10.
- 90) 大谷晃司. 骨粗鬆症に対する薬物治療 - 服薬コンプライアンスあるいはアドヒアランスの検討. *別冊整形外科*, 2007; 52, 292-296.
- 91) 田中郁子,早川克彦,大島久二. アンドロネートのコンプライアンス - クリニックにおける骨粗鬆症診療実態調査 -. *Osteoporosis Japan*, 2009; 17, 252-255.
- 92) 山路倫三, 山路敦子.ビスフォスフォネートの連日投与製剤とのアドヒアランスの比較. *整形外科*, 2010; 61, 319-321.