

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 橈骨骨密度とビタミンD受容体遺伝子多型・生活習慣要因との関連に関する分子疫学研究  
(A Molecular epidemiological study on the relationship between bone mineral density of the distal radius, *vitamin D receptor* gene polymorphism, and lifestyle factors)

著者名 : 船越 弥生  
Yayoi Funakoshi

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻公衆衛生・医療科学 加藤 貴彦 教授

審査委員名 : 生命倫理学担当教授 浅井 篤  
運動骨格病態学担当教授 水田 博志  
病態生化学担当教授 山縣 和也  
法医学担当教授 西谷 陽子

2012年3月

## 目次

1. 要旨	1
2. 学位論文の骨格となる参考論文	3
1) 関連論文	3
2) その他の論文リスト	3
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	7
1) はじめに	7
2) 用語の定義	8
(1) 骨密度	8
(2) 遺伝子多型	8
(3) 骨代謝マーカー	9
(4) 閉経	10
3) 骨粗鬆症の疫学研究	11
(1) 骨粗鬆症の概念	11
(2) 骨粗鬆症の診断基準	12
(3) 骨粗鬆症の有病者数	13
(4) 大腿骨近位部骨折の患者数	13
(5) 骨粗鬆症性骨折の生命予後に関する研究	13
(6) 骨密度測定の意義	15
(7) 骨代謝マーカー測定の意義	17
(8) 骨密度に影響を与える要因	21
① 年齢、性	21

②	体格	22
③	運動	23
④	栄養	25
⑤	喫煙	26
⑥	飲酒	27
(9)	ビタミン D および VDR の作用機序	28
(10)	骨密度と VDR 遺伝子多型との関連	28
(11)	骨密度と生活習慣および VDR 遺伝子多型との関連	31
4)	本研究の意義と目的	33
5)	本研究の倫理的配慮	34
6.	実験方法	35
1)	対象者	35
(1)	男性	35
(2)	女性	35
2)	測定項目	36
(1)	体格測定	36
(2)	骨密度測定	36
(3)	骨代謝マーカー	36
(4)	VDR 遺伝子多型の解析	37
(5)	生活習慣に関するアンケート	38
3)	統計解析	38
7.	実験結果	40
1)	対象者の身体的特徴	40
2)	VDR 遺伝子多型の頻度	40
3)	VDR 遺伝子多型別の身体的特徴	41

4)	生活習慣および <i>VDR</i> 遺伝子型別の平均骨密度	42
	(1) 男性	42
	(2) 女性	44
5)	骨密度に関連する生活習慣要因および <i>VDR</i> 遺伝子多型	45
8.	考察	48
9.	結語	53
10.	参考文献	54

## 1. 要旨

**[目的]** 骨粗鬆症関連遺伝子として多数の遺伝子多型が同定されているが、骨密度に対する生活習慣と遺伝子多型との交互作用についての報告は極めて少なく不明な点が多い。本研究では、ビタミンD受容体 (*Vitamin D receptor, VDR*) 遺伝子多型を分析し、生活習慣や骨代謝マーカーとともに橈骨骨密度との関連を明らかにすることを目的とした。

**[方法]** 日本国内の某電気部品製造業の従業員 686 人 (男性 524 人、女性 162 人) に二重エネルギーX線吸収測定法による橈骨骨密度の測定およびポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) による *VDR* 遺伝子多型の分析を行った。生活習慣の情報は質問紙にて測定と同時に収集した。その他のデータは同時に行った問診および健康診断から得た。

**[結果]** 骨密度の平均値は男性では  $0.559 \pm 0.058 \text{ g/cm}^2$ 、女性では  $0.463 \pm 0.043 \text{ g/cm}^2$  であった。*VDR* 遺伝子の *TaqI* 多型頻度は、男性では *TT* 型 81.3%、*Tt* 型 17.9%、*tt* 型 0.8%、女性では *TT* 型 77.2%、*Tt* 型 22.8%、*tt* 型 0% であった。年齢と体格指数 (Body mass index, BMI) を調整した共分散分析の結果、女性では *Tt* 型群が *TT* 型群に比較し骨密度が有意に低値であったが、男性では有意差は認められなかった。*VDR* 遺伝子多型と骨代謝マーカーとの間に有意な関連はみられなかった。骨密度と生活習慣要因との関連を解析した結果、男性では過去の運動習慣、1週間に3~7回の現在の運動または毎日の飲酒習慣のある人は、それらの生活習慣がない人と比較して骨密度が有意に高値を示したが、女性ではすべての生活習慣因子に有意差を認めなかった。さらに、*VDR* 遺伝子多型を含めた解析によると、男性では1日2食または1日21本以上の喫煙習慣のある人では、*Tt + tt* 型群は *TT* 型群と比較して骨密度が有意に低値を示し、女性では飲酒習慣のある人では *Tt* 型群は *TT* 型群と比較して骨密度が有意に低値を示した。重回帰分析の結果から、骨

密度に影響する要因は、男性では BMI (coefficient = 0.006,  $p < 0.001$ )、過去の運動 (coefficient = 0.019,  $p < 0.05$ )、女性では年齢 (coefficient = 0.001,  $p < 0.05$ )、BMI (coefficient = 0.006,  $p < 0.001$ )、VDR 遺伝子多型 ( $TT$  vs.  $Tt$ ; coefficient =  $-0.016$ ,  $p < 0.05$ ) であった。

**[考察]** 男性で 1 日 2 食または 1 日 21 本以上の喫煙習慣のある人では、 $Tt + tt$  型群は  $TT$  型群と比較して骨密度が有意に低値を示し、女性で飲酒習慣のある人では、 $Tt$  型群は  $TT$  型群と比較して骨密度が有意に低値を示したことから、VDR 遺伝子多型によって骨密度に対する生活習慣の影響が異なる可能性が示唆された。男性では過去の運動習慣が、女性では VDR 遺伝子多型が骨密度との間に年齢、BMI およびその他の生活習慣とは独立した有意な関連が認められ、これらが骨密度を規定する要因であるものと考えられた。

**[結論]** 男性では過去の運動習慣が、女性では VDR 遺伝子多型が骨密度を規定する要因であるものと考えられた。また、骨密度に対する生活習慣の影響が VDR 遺伝子多型によって異なる可能性があることから、骨粗鬆症の予防には遺伝的背景を考慮した上で個人の体質に応じた保健指導を行うことが重要と考えられた。

## 2. 学位論文の骨格となる参考論文

### 1) 関連論文

#### ① Yayoi Funakoshi ・ Hisamitsu Omori ・ Takahiko Katoh

Association between bone mineral density and lifestyle factors or *vitamin D receptor* gene polymorphism in adult male workers: a cross-sectional study  
*Environ Health Prev Med.* 14: 328-335, 2009

#### 2. Yayoi FUNAKOSHI, Hisamitsu OMORI and Takahiko KATOH

Relation of Bone Mineral Density to *Vitamin D Receptor* Gene Polymorphism and Lifestyle Factors in Japanese Female Workers Aged 22-44 Years: A Cross-Sectional Study  
*J Nutr Sci Vitaminol.* 56, 27-33, 2010

### 2) その他の論文リスト

#### 1. Yayoi Funakoshi, Hisamitsu Omori, Hironori Yada, Takahiko Katoh

Relationship between changes of bone mineral density over seven years and A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene or lifestyle factors in Japanese female workers  
*Asia Pac J Clin Nutr.* 19: 534-539, 2010

#### 2. Yayoi Funakoshi, Hisamitsu Omori, Shuichi Mihara, Tohru Marubayashi and Takahiko Katoh

Association between Airflow Obstruction and the Metabolic Syndrome or Its Components in Japanese Men

*Intern Med.* 49: 2093-2099, 2010

3. Yayoi Funakoshi ▪ Hisamitsu Omori ▪ Hironori Yada ▪ Takahiko Katoh  
A1330V polymorphism of the *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* gene and bone mineral density in Japanese male workers

*Environ Health Prev Med.* 16: 106-112, 2011

4. Yayoi Funakoshi ▪ Hisamitsu Omori ▪ Shuichi Mihara ▪ Ayumi Onoue ▪ Yasuhiro Ogata ▪ Hisamichi Aizawa ▪ Takahiko Katoh  
C-reactive protein levels, airflow obstruction, and chronic kidney disease

*Environ Health Prev Med.* 17: 18-26, 2012

5. Yayoi Funakoshi ▪ Hisamitsu Omori ▪ Ayumi Onoue ▪ Shuichi Mihara ▪ Yasuhiro Ogata ▪ Takahiko Katoh  
Association between frequency of drinking alcohol and chronic kidney disease in men

*Environ Health Prev Med.* 2011 (in press) DOI: 10.1007/s12199-011-0238-6



### 3. 謝辞

本論文の作成にあたり、指導教員として懇切丁寧かつ多大なる御指導を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部公衆衛生・医療科学分野教授加藤貴彦先生に心より感謝の意を表します。ならびに、同分野の教員および大学院生の皆様には、御協力と御助言を賜りましたことに深厚なる謝意を表します。

#### 4. 略語一覧

本研究で用いる主な略語を以下にアルファベット順で記した。

ANCOVA : 共分散分析 (Analysis of covariance)

ANOVA : 一元配置分散分析 (Analysis of variance)

BAP : 血清骨型アルカリフォスファターゼ (Bone-specific alkaline phosphatase)

BMI : 体格指数 (Body mass index)

CTX : I型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド (C-telopeptide of type I collagen)

DEXA : 二重エネルギーX線吸収法 (Dual energy X-ray absorptiometry)

DNA : デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA)

DPD : デオキシピリジノリン (Deoxypyridinoline)

ICTP : I型コラーゲン C 末端テロペプチド (Pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen)

NIH : アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health)

NTX : I型コラーゲン架橋 N 末端テロペプチド (Type I collagen N-terminal telopeptide)

OC : オステオカルシン (Osteocalcin)

PCR-RFLP : ポリメラーゼ連鎖反応 - 制限酵素断片長多型 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)

PICP : I型プロコラーゲン架橋 C 末端プロペプチド (Type I procollagen C-terminal peptide)

QCT : 定量的 CT 法 (Quantitative computed tomography)

SNP : 一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism)

SD : 標準偏差 (Standard deviation)

VDR : ビタミン D 受容体 (Vitamin D receptor)

WHO : 世界保健機関 (World Health Organization)

YAM : 若年成人平均値 (Young adult mean)

## 5. 研究の背景と目的

### 1) はじめに

骨粗鬆症が生活習慣などの環境的な要因だけでなく遺伝的要因によっても影響を受けていることが、双生児や親子を対象とした疫学研究 [1, 2] により以前から指摘されてきたが、具体的な遺伝的要因については不明であった。遺伝子解析技術の飛躍的な進歩に伴い、骨密度に対する遺伝的要因の影響についてデオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) レベルでの解析が開始され、遺伝子上に存在する塩基配列の僅かな違いが骨密度を規定する可能性が示唆されている。このような DNA 塩基配列の違いを遺伝子多型と呼んでいる。ビタミン D 受容体 (*Vitamin D receptor, VDR*) 遺伝子多型は骨粗鬆症関連遺伝子の中で最も代表的なものの 1 つであり、1994 年に Morrison ら [3] が *VDR* 遺伝子多型と骨密度との関連性を初めて報告して以来、欧米を中心に最も広く研究されてきた [4]。 *VDR* 遺伝子多型と骨密度との有意な関連はメタアナリシスにより結論付けられているが [5]、人種や年齢構成によって再現されないことが指摘されており、未だその研究は不十分である。さらに、 *VDR* 遺伝子多型と生活習慣要因との相互作用を報告した疫学的研究が注目を集めているものの [6-9]、十分な研究は行われていない。そこで、まずは本博士論文で使用する用語の定義を明確にし、骨粗鬆症の概念や骨密度と骨折リスクなど、現時点で明らかになっている基本的な知見を要約した後、骨密度と生活習慣要因および *VDR* 遺伝子多型との関連に焦点をあてた最近の疫学研究の成果を検討することで本研究の必要性を明らかにしたい。

## 2) 用語の定義

### (1) 骨密度

骨密度とは、骨塩量 (g) を体積 (cm<sup>3</sup>) で除することによって得られる単位体積あたりの骨塩量 (g/cm<sup>3</sup>) である。単位体積あたりの真の骨密度として求めることができる唯一の測定法は、定量的 CT 法 (Quantitative computed tomography, QCT) であるが、その他の測定法に比べ被ばく線量が多いことから装置の普及が少なく、多数例での正常値の信頼性がまだ十分には得られていない。現在、病院などの多くの施設では、二重エネルギー X 線吸収法 (Dual energy X-ray absorptiometry, DEXA) [10] が用いられている。DEXA では、2 つの異なるエネルギーの X 線ビームを使用し、パルス高の解析によって、骨と軟部組織を区別して、骨塩量 (g) が測定される。さらに X 線を照射した方向からみた骨の投影面積 (cm<sup>2</sup>) が測定され、この骨塩量を投影面積で除したものが骨密度 (g/cm<sup>2</sup>) である。すなわち、DEXA 法で測定される骨密度とは、X 線を照射した際の投影面積を用いた単位面積あたりの骨塩量 (g/cm<sup>2</sup>) である。本研究では、橈骨 1/3 遠位における面積骨密度を、DEXA 法により測定することとし、その値を骨密度と定義した。

### (2) 遺伝子多型

同一種に属する生物であっても個々のゲノムの塩基配列は多種多様である。ひとの 23 組の染色体には塩基が 30 億対あり、数百カ所に一つの割合で塩基配列の違いが存在する。遺伝子多型は、塩基配列の違いが疾患発生に関連しない場合、もしくは関連があっても弱い場合に対する用語である。遺伝医学関連学会の「遺伝学的検査に関するガイドライン」では、ある遺伝子座において、塩基配列の異なるアレル (対立遺伝子) が複

数存在し、それが集団中で 1%以上の頻度で存在するとき、その遺伝子座は多型であると定義されている。塩基配列の変化は、1つの塩基が他の塩基に置き換わっている一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP)、1塩基から遺伝子全体が挿入欠失する多型、繰り返し配列の繰り返す数の違いの3タイプがある。SNPは、アミノ酸配列や転写調節領域の塩基配列の変化により遺伝子の機能に影響する可能性も高いので、疾患関連遺伝子の研究で特に注目されている。SNPが個人差の一部を説明できるのではないかという期待があるため、遺伝子多型が個別化医療(テーラーメイド医療)にとって必要な情報と考えられている。遺伝子型は変えることができないが、それを知ることにより行動変容の契機になりうるし、検査結果の解釈にも役立つ可能性がある。

### (3) 骨代謝マーカー

骨強度は、骨密度と骨の質が統合されて決定される。骨の質とは、骨の微細構造、骨代謝回転、微小ダメージの蓄積、石灰化の程度およびコラーゲンなどの骨基質の特性により規定されている [11]。骨は破骨細胞の骨吸収と骨芽細胞の骨形成によって骨代謝を繰り返している。この骨代謝のバランスをみる指標となるのが骨代謝マーカーであり、骨吸収マーカーと骨形成マーカーがある。血液や尿中に放出されるこれらの成分を測定すると、どの程度、骨吸収と骨形成が進んでいるかが分かり、骨密度の値と組み合わせて骨粗鬆症の診断に用いられる。骨代謝マーカーは、血液や尿による非侵襲的評価法であり、放射線被曝はない。

#### (4) 閉経

閉経 (Menopausal) とは、ある一点を指す言葉であり、1981年に世界保健機関 (World Health Organization, WHO) が刊行した報告書 “Research on the menopause [12]” によれば、「卵巣における卵胞の消失による永久的な月経の停止」を意味する。一方、閉経期 (Perimenopause) は、同報告書において「内分泌的、生物学的、または臨床上の閉経の兆候が見られる閉経前の期間と閉経後の少なくとも 1 年間を含む」と定義されており、閉経前の不規則月経か不正出血かが明確でない時期や、後に閉経と判明する 1 年未満の無月経の時期を指す。さらに、閉経後 (Postmenopause) は「閉経した後の期間であるが、その開始点は無月経状態が 12 か月以上続いた後で判断される」と定義づけている。この定義は 1996 年の WHO の報告書 “Research on the menopause in the 1990s [13]” の中でも継承されている (図 1)。本邦においても、1998 年に日本産婦人科学会が刊行した報告書 “用語委員会報告 (「月経の定義」に関する委員会提案理由) [14]” の中で、閉経の定義は WHO と同様の定義を採用している。これらのことから、本研究では、WHO の定義に準じ、最終月経発来後 1 年以上が経過している状態を閉経後、月経発来が定期的である場合を閉経前と定義した。

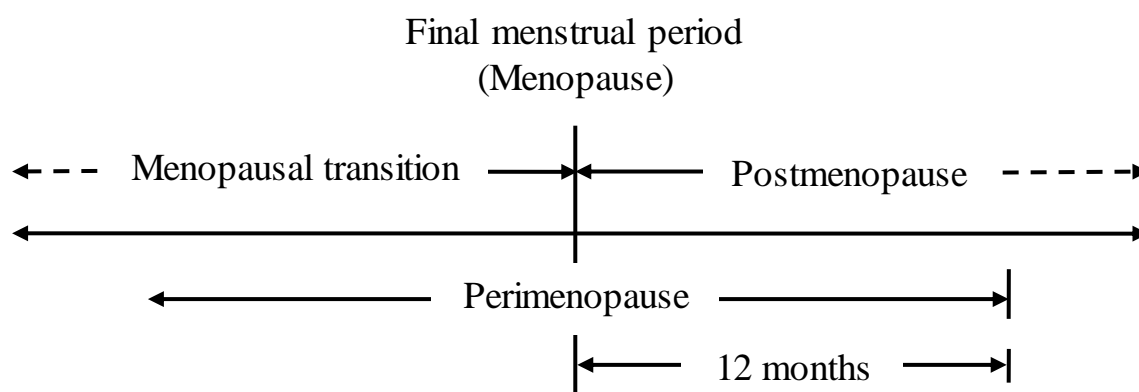


図1 閉経前後の期間 (WHO, 1996)

### 3) 骨粗鬆症の疫学研究

#### (1) 骨粗鬆症の概念

骨粗鬆症とは、低骨量と骨組織の微細構造の破綻によって特徴づけられ、骨の脆弱性亢進と骨折危険率の増大に結びつく疾患と定義される。この定義は 1993 年に香港で開催された世界骨粗鬆症学会におけるコンセンサス会議 [15] において提案され、翌 1994 年に WHO [16] で承認されたものである。その後の骨粗鬆症の臨床研究で、さらに病態が明らかにされたことにより、2000 年アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) コンセンサス会議が開かれ、骨密度の低下要因としては骨密度に加えて、骨質 (微細構造、骨代謝回転、微小骨折、石灰化) の関与を含めるほか、低骨密度以外の危険因子を明確化する方針が打ち出された。そこで、NIH コンセンサス会議において、骨粗鬆症の定義は「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」と改められた。骨強度は骨密度と骨質の 2 つの要因からなり、骨強度のほぼ 70% は骨密度で、残りの 30% は骨質で説明されるものとし、以前よりも骨質の重要性を強調したものとなっている [17]。

骨粗鬆症の疾病概念について初めて提唱されたのは、1941 年の Albright ら [18] による研究であった。Albright らは、骨粗鬆症患者の臨床象を検討したところ、その多くが自然閉経後に発生することをつきとめ、エストロゲン欠乏による閉経後骨粗鬆症として報告した。その後、Riggs ら [19] は、骨粗鬆症は加齢に伴う退行性変化であることから、退行性骨粗鬆症という名称を提唱し、閉経後骨粗鬆症を I 型、男女ともに生じる老人性骨粗鬆症を II 型とし、2 つの病型に分類した。現在では I 型と II 型を区別せず一括して閉経後骨粗鬆症とし、男性の骨粗鬆症を別に取り扱う説が提唱されている [20]。

## (2) 骨粗鬆症の診断基準

世界的コンセンサスが得られている診断基準として、WHO が作成した診断基準 [21] がある。この診断基準は、20～40 歳の骨密度の平均から -2.5 標準偏差 (Standard deviation, SD) 以下に減少したものを骨粗鬆症と診断するものである。日本では、1995 年に日本骨代謝学会が原発性骨粗鬆症診断基準を作成し、1996 年度、2000 年度に改定している。この診断基準は 20～44 歳の骨密度の平均値 (若年成人平均値) (Young adult mean, YAM) の 70% 値をカットオフ値としている [22]。双方の具体的な基準は異なるものの、骨密度が骨粗鬆症を診断する因子となっている (表 1)。大きな違いは、WHO 基準では骨密度評価のみで診断を行うが、日本骨代謝学会では骨密度のほかに X 線所見を基準に盛り込んでいる点、そして、除外診断の基準を明記している点にある。

表1 骨粗鬆症の定義

WHO (1994)	日本骨代謝学会 (2000)
●正常:骨量または骨密度が若年成人平均値 (20～40歳)を下回ること1SD以内	低骨量を来す骨粗鬆症以外の疾患または続発性骨粗鬆症を認めず、骨評価の結果が下記条件を満たす場合原発性骨粗鬆症と診断する
●低骨量:骨量または骨密度が若年成人平均値を下回ること1-2.5SDの範囲内	●正常:骨密度がYAM (若年成人平均値20～44歳)の80%以上、または脊椎X線像の骨粗鬆症化なし
●骨粗鬆症:骨量または骨密度が若年成人平均値を下回ること2.5SD以上	●骨量減少:骨密度がYAMの70%以上～80%未満、または脊椎X線像の骨粗鬆症化疑いあり
●重症骨粗鬆症:骨量または骨密度が若年成人平均値を下回ること2.5SD以上であり、骨脆弱性亢進による骨折が1つ以上存在	●骨粗鬆症:骨密度がYAMの70%未満、または脊椎X線像の脊椎X線像の骨粗鬆症化あり 脆弱性骨折 <sup>※</sup> の存在は骨粗鬆症とする

<sup>※</sup>低骨量(骨密度が若年成人平均値の80%未満、または脊椎X線像の骨粗鬆化あり)が原因で、軽微な外力によって発生した非外傷性骨折



### (3) 骨粗鬆症の有病者数

山本らは [23] 原発性骨粗鬆症診断基準（日本骨代謝学会 1996 年改訂版）を用いて、性・年齢別に骨粗鬆症域（YAM の 70% 未満）の頻度を求め、骨粗鬆症の有病者数を西暦 2000 年人口で換算し、推定骨粗鬆症域人口を求めた。その結果、40 歳以上の女性では 783 万人、男性では 226 万人、合計約 1,009 万人であり、骨量減少と診断される人は同様の計算で約 800 万人であることを報告した。また、山本らは、骨粗鬆症有病率の性・年代別分布から、男女とも年齢とともに有病率が増加し、女性は男性よりも 3 倍頻度が高いことを報告している。

### (4) 大腿骨近位部骨折の患者数

第 5 回大腿骨近位部骨折全国頻度調査成績 [24] によると、2007 年の大腿骨近位部骨折の年間推計発生患者数は、148,100 人（男 31,300 人、女性 116,800 人）であり、1992 年の 76,600 人（男性 18,700 人、女性 57,900 人）、1997 年の 92,400 人（男性 20,800 人、女性 71,600 人）、2002 年の 117,900 人（男性 25,300 人、女性 92,600 人）と患者数が増加している。

### (5) 骨粗鬆症性骨折の生命予後に関する研究

骨粗鬆症性骨折のみの生命予後に関する研究は少ない。60 歳以上のオーストラリア人男女（男性  $n = 1,898$ 、女性  $n = 2,413$ ）を対象とした前向きコホート研究 [25] では、5 年間の追跡調査を行い、骨粗鬆症性骨折の発生率と骨折後の死亡率を調査した。その

結果、5年間で発生した骨折絶対リスクは1000人年あたり男性14.4、女性29.5で、女性は男性の約2倍高いことを報告した。骨折者482人（男性n=137、女性n=345）のうち、追跡期間中に105人（男性n=47、女性n=58）の死亡が確認され、一般人口と比較した年齢補正後の標準化死亡比は、大腿骨頸部骨折が男性3.17（95%信頼区間（以後95%CI）：2.90-3.44）、女性2.18（95%CI：2.03-2.32）、椎骨骨折が男性2.38（95%CI：2.17-2.59）、女性1.66（95%CI：1.51-1.80）、重傷骨折が男性2.22（95%CI：1.91-2.52）、女性1.92（95%CI：1.70-2.14）、軽傷骨折が男性1.45（95%CI：1.25-1.65）、女性0.75（95%CI：0.66-0.84）であり、骨折後の死亡は男性が女性よりも高いことを報告した。さらにBlucら[26]は、オーストラリア人の骨粗鬆症患者1,295人（60歳以上；男性n=343、女性n=952）を対象として、死亡率に関する18年間の追跡調査を行った。その結果、追跡期間中に658人（男性n=197人、女性n=461人）の死亡が確認され、一般人口と比較した骨折部位別年齢調整標準化死亡比は、大腿骨頸部骨折が男性3.51（95%CI：2.65-4.66）、女性2.43（95%CI：2.02-2.93）、椎骨骨折が男性2.12（95%CI：1.66-2.72）、女性1.82（95%CI：1.52-2.17）、重傷骨折が男性1.70（95%CI：1.23-2.36）、女性1.65（95%CI：1.31-2.08）、軽傷骨折が男性1.33（95%CI：0.99-1.80）、女性1.42（95%CI：1.19-1.70）であり、長期間の追跡により、男性の骨折は生命予後が悪いことが報告された。

本邦においては、中村ら[27]が、大腿骨頸部骨折の発生率と骨折後の生命予後について鳥取県住民を調査した。その結果、3年間で発生した35歳以上の人口集団（男性n=470,453、女性n=556,242）における年間人口10万人あたり的大腿骨頸部骨折の発生率は男性47.6、女性124.8であり、女性は男性の2.6倍高いことが報告された。

さらに、大腿骨頸部骨折患者（男性n=131、女性n=386）を最長4年追跡した結果、調査期間中の死亡率（粗死亡率）は男性11.5%、女性11.7%で、男女差が認められなかったが、Cox比例ハザード解析の結果、男性が女性に対して2.059（95%CI：1.078-3.931）、10歳年長者が年少者に対して1.804（95%CI：1.293-2.517）、痴呆の合併者が非合併者に対して1.898（95%CI：1.022-3.527）と死亡する確率が高いことが報告された。粗死亡率に男

女差が認められなかった理由として、生命予後を悪化させる要因である痴呆および高齢者が女性に多かったために見かけ上の男女性が生じなかったのではないかと推論されている。以上のオーストラリアおよび本邦の疫学研究の結果から、骨折の発生率は女性のほうが2.0～2.6倍高いものの骨折後の死亡リスクは男性のほうが2.1～3.5倍高いことが明らかになった。

#### (6) 骨密度測定の意義

骨密度から骨折危険率を推定する試みは、1990年代の初めから Ross ら [28] により提唱されていた。つまり、骨密度の低値は骨折のリスク要因と位置付けられ、これらの報告が WHO による骨粗鬆症の概念や診断基準の構築に反映されている。近年、骨密度が骨粗鬆症骨折の発生を予測するという研究報告がいくつか発表されている。47～56歳の女性3,068人を3.6年間追跡したフィンランドの大規模コホート研究 [29] では、骨密度の1SD低下における骨折の相対危険度が算出された。その結果、骨折発生の相対危険度は、脊椎および大腿骨頸部骨密度の1SD低下で1.4 (95% CI: 1.2-1.6)、骨粗鬆症性骨折の相対危険度は脊椎および大腿骨頸部骨密度の1SD低下で1.6 (95% CI: 1.3-2.0)、その他の骨折の相対危険度は脊椎骨密度1SD低下で1.4 (95% CI: 1.2-1.6)、大腿骨頸部骨密度1SD低下で1.3 (95% CI: 1.1-1.5) であったことが報告された。

Duppe ら [30] による大規模前向きコホート研究では、20～78歳の女性1,076人が20～25年追跡され、前腕骨密度1SDに対する骨折の相対危険度が算出された。その結果、40～70歳以上において、前腕骨密度が1SD低下すると、大腿骨頸部骨折相対危険度は1.66 (95% CI: 1.13-2.46)、椎体骨折は1.79 (95% CI: 1.22-2.62)、全骨折は1.33 (95% CI: 1.20-1.73) と増加することが報告された。また、前腕骨密度1SDあたりの遠位橈骨端骨折の相対危険度は、40～70歳以上では10年後で1.75 (95% CI: 1.11-2.76)、30～50歳では

20年後で1.90 (95% CI: 1.02-3.55) のピークを示し、その後、年齢が高くなるに従って低くなった。高齢になると、骨折発生において転倒などの骨密度以外の因子の関与が大きくなる可能性も考えられるが、骨密度は10～20年後の骨折も有意に予測することが示唆された。この他にも欧米では骨密度と骨折との関係についての前向き調査が多数報告されている。1985年～1994年までに発表された11件の研究を対象としたメタアナリシス [31] では、閉経周辺期・閉経後女性において骨密度の測定部位（橈骨近位、橈骨遠位、大腿骨頸部、脊椎、踵骨）毎に骨密度1SD低下における骨折の相対危険度が算出された。その結果、大腿骨頸部骨折に関しては、大腿骨頸部自体の骨密度と最も関連が強く、相対危険度は2.6 (95% CI: 2.0-3.5) であった。総じて、大腿骨頸部骨折は、大腿骨頸部骨密度が最もよく予知するが、その他のどの測定部位の骨密度も、ほぼ同じ程度に将来の骨粗鬆症に関連した骨折を予測することが結論された。

本邦にあたっては、広島コホート集団の男女2,356人（年齢47～95歳）を対象に4年間追跡し、骨密度1SD低下における脊椎骨折の相対危険度を解析したFujiwaraらの大規模コホート研究 [32] がある。脊椎骨折の相対危険度は、腰椎骨密度1SD低下で1.54 (95% CI: 1.26-1.88)、大腿骨頸部骨密度1SD低下で1.78 (95% CI: 1.37-2.33) であり、骨密度1SDにおける脊椎骨折の相対危険度は、日本人においても欧米人と同様の傾向であることが報告された。また、男性は女性に比べ骨折の発生率は低い、同じ骨密度におけるリスクはほぼ同じであった。

男性を対象にした骨密度と骨折の関係を縦断的に調べた研究は比較的少ない。Mussolinoらの大規模コホート研究 [33] では、45～74歳の欧米人男性2,879人を最大22年追跡した結果、大腿骨頸部骨折の危険因子を調整した相対危険度は、踵骨骨密度1SD低下で1.73 (95% CI: 1.11-2.68) と有意に増加することを報告した。さらに、55歳以上の男女7,046人（男性n=2,778、女性n=4,278）を3.8年間追跡したオランダの大規模コホート研究 [34] では、大腿骨頸部骨折の年齢補正された相対危険度は、大腿骨頸部骨密度1SD低下において女性2.5 (95% CI: 1.8-3.6)、男性3.0 (95% CI: 1.7-5.4)であった。つまり、

男性の骨密度の骨折予測力は、女性と同等であることが報告された。

Johnell ら [35] は骨密度と骨粗鬆症性骨折に関する前向きコホート研究の 12 件を対象としたメタアナリシスを行っている。対象は 38,973 人 (平均年齢 64.6 歳; 男性 n = 9,891、女性 n = 29,082) の集団で、最大追跡期間 16.3 年のうちに骨粗鬆症性骨折の発生は 2,606 人であった。解析の結果、SD の低下が -1、-2、-3、-4 のように 1SD 低下する毎に骨粗鬆症性骨折の相対危険度はそれぞれ 1.73 (95% CI: 1.59-1.89)、1.84 (95% CI: 1.60-2.12)、1.96 (95% CI: 1.61-2.39)、2.10 (95% CI: 1.63-2.71) と増加することが報告された。大腿骨頸部骨密度がどのくらい将来まで大腿骨頸部骨折を予測するかについては、時間が経過するほど骨折予測力は低下するものの、10 年後の骨折も有意に予測していた。これらの研究結果から、骨密度は骨折リスクを決定する重要な要因であることが示唆された。

#### (7) 骨代謝マーカー測定の意味

近年、骨代謝マーカー値が骨粗鬆症による骨折を予測するという可能性が疫学研究により検証されつつある。75 歳以上の女性 7,598 人 (平均年齢 82.5 歳) を平均 22 カ月追跡したフランスの大規模コホート研究 EPIDOS Study [36] では、骨形成マーカーのオステオカルシン (Osteocalcin, OC) と血清骨型アルカリフォスファターゼ (Bone-specific alkaline phosphatase, BAP)、デオキシピリジノリン (Deoxypyridinoline, DPD)、I 型コラーゲン架橋 N 末端テロペプチド (Type I Collagen N-Terminal Telopeptide, NTX)、I 型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド (C-telopeptide of type I collagen, CTX) の新規骨折予測を前向きに調査している。追跡期間中に 126 人の大腿骨頸部骨折が生じた。DPD と CTX は大腿骨頸部骨折患者が非骨折者よりも高く、閉経前基準範囲の上限を超える DPD と CTX の高値は、大腿骨頸部骨折リスクを増加させ、オッズ比は 1.9 (95% CI: 1.1-3.2) と 2.2 (95% CI: 1.3-3.6) であった。一方、骨形成マーカー (OC と BAP) と大腿骨頸部骨折との間に

は有意な関係がなかった。Garnero らのフランスの大規模コホート研究 OFELY Study [37] では、50~89 歳の閉経後女性 435 人を平均 5 年追跡し、骨形成マーカーの OC、BAP、I 型プロコラーゲン架橋 C 末端プロペプチド (Type I procollagen C-terminal peptide, PICP) と骨吸収マーカーの CTX、NTX、DPD の新規骨折予測を前向きに検討された。追跡期間中の骨折者は 55 人、非骨折者は 380 人であった。骨代謝マーカーのそれぞれ 4 分位において、最上位群では最下位群と比較し、骨折の相対危険度は、BAP が 1.9 (95% CI: 1.13-3.4)、尿中 CTX が 2.3 (95% CI: 1.3-4.1)、血中 CTX が 1.9 (95% CI: 1.05-3.6) であることが報告された。BAP が骨折と関連するというこの結果は、EPIDOS Study による結果と異なるが、Ross ら [38] も同様に平均 69 歳の対象者において、BAP と骨折(脊椎骨折と非脊椎骨折)との有意な関連を報告した。Ross はこの点に関し、対象年齢がこの研究では約 9 歳若いこと、対象とした骨折を大腿骨頸部骨折のみにせず、さまざまな骨折とした点が両研究の違いの原因であるかもしれないと考察している。すなわち、骨形成マーカーの中でも BAP は骨折リスク評価に有用である可能性が残されている。しかし、これらの大規模コホート研究は、高齢女性や閉経後女性を対象としており、男性については調査されていない。

本邦では、白木ら [39] は平均年齢 65.5 歳の閉経後日本人女性 1,721 人において、骨形成マーカー (OC、BAP) および骨吸収マーカー (DPD、NTX) の値がその測定後に起こる新規骨折を予測するか否かについて平均観察期間の 961 日の追跡調査を行った。追跡期間中の新規骨折者は 363 人 (新規骨折発生率 21.1%) であった。新規骨折者が非骨折者に比べ高値を示した骨代謝マーカーは、DPD と NTX であった。一方、骨形成マーカーである OC や BAP は、新規骨折者と非骨折者との間で有意差を示しておらず、新規骨折発生に対する判別効率は骨吸収マーカーに比べ明らかに劣っていた。また、DPD は新規脊椎骨折や新規大腿骨頸部骨折が 3 年以内に発生した例でコントロール群に対し有意の高値を示したが、3 年以降に発生した例では有意差を示さないことを報告した。さらに、吉村ら [40] は、40~79 歳の日本人男女 256 人を 10 年間追跡し、新規骨折予測を前

向きに検討した。ベースライン時に脊椎椎体骨折がなかったが 10 年目に骨折を認めたもの、あるいはベースライン時に脊椎椎体骨折が認められたが 10 年目に骨折個数が増加していたものを新規骨折と定義し、累積脊椎椎体骨折発生の有無を目的変数に、骨形成マーカー（OC、PICP）および骨吸収マーカー（ICTP、DPD）の 4 つの骨代謝マーカーを説明変数とし、年齢を補正して男女別にロジスティック回帰分析を行ったところ、女性における DPD のオッズ比が 1.74 (95% CI: 1.21-2.50) であることを報告した。すなわち、DPD は将来の脊椎椎体骨折の重要な予測要因であることが示唆された。

このように、骨代謝マーカーが骨粗鬆症による骨折の予測因子であるという研究が発表されるとともに、骨代謝マーカーと骨密度との関連についても報告されている。Garnero ら [41] は、653 人の健康女性について骨形成マーカー（OC、BAP、PICP）および骨吸収マーカー（NTX、CTX）と骨密度との関係を横断的に検討している。高齢女性において、骨密度測定値を四分割して、それぞれの群における OC、NTX、CTX を比較すると、骨密度が高いほどこの 3 つのマーカー値は低いことを認めた。さらに、骨密度に対して、身長、年齢、閉経からの年数および骨代謝マーカーがどの程度説明するかについて検討したところ、閉経前および閉経後 20 年以内では、これらの因子は骨密度の変動の 10% 以下しか説明しなかったが、閉経からの年数が経過するにしたがって骨代謝マーカーの骨密度に対する寄与は大きくなり、閉経後 30 年で 52% まで上昇することを報告した。さらに、Rogers ら [42] は、49～62 歳（平均年齢 57 歳）の閉経後女性 60 人を対象に骨代謝マーカーが骨密度の変化を予測できるかについて検証した。骨形成マーカー（BAP、PICP、PINP）および骨吸収マーカー（NTX、DPD）の 5 つの骨代謝マーカーと 2～4 年間の腰椎骨密度変化率との関連について検討した結果、骨密度と骨代謝マーカーは  $-0.35 \sim -0.53$  の有意な相関を報告した。

本邦では伊木ら [43] が、1,153 人の日本人女性を対象として、骨形成マーカー（OC、BAP）および骨吸収マーカー（CTX、DPD）の 4 つの骨代謝マーカーと 3 年間の前腕骨、腰椎、大腿骨頸部の骨密度変化との関連を検討している。対象者を 40 歳以上の有経者

194 人、60 歳未満の閉経者 178 人、60 歳代 208 人、70 歳代 189 人、および閉経前後にあたる 45～59 歳 310 人の各群に分けて解析した結果、40 歳以上の有経者と 60 歳未満の閉経者では OC、CTX、DPD が、それぞれ高い群ほど骨密度が大きく低下する有意な関連を示したが、60 歳代、70 歳代では有意な関連は認められなかった。40～59 歳では、OC、CTX で比較的関連が強く、BAP と DPD では前腕のみで有意な関連を示した。部位別では前腕で最も明らかな関連がみられ、年齢別では閉経期から閉経後 10 年、年齢にして 45～59 歳において最も強い関連が認められたことを報告した。一方、日本人男性を対象とした骨密度の加齢変化に関する報告は少ないが、吉川ら [44] よる縦断的検討では、日本人男性 443 人（平均年齢  $54.3 \pm 10.4$  歳）を対象として骨形成マーカー（OC、I 型コラーゲン C 末端テロペプチド（Pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen, ICTP）、PINP）および骨吸収マーカー（NTX、DPD）と平均 4.8 年間の腰椎、大腿骨頸部および橈骨の骨密度変化率との関連について検討している。その結果、DPD と腰椎および大腿骨頸部の骨密度変化率との間に有意な負の相関が認められた（それぞれ  $r = -0.376, -0.462$ ）。これらの報告により、骨代謝マーカーによる骨折リスクおよび低骨密度の評価においては骨吸収マーカー、特に DPD が有効であることが示唆された。また、骨吸収マーカーに比べ劣っているものの、骨形成マーカーの中でも BAP は骨折リスクおよび低骨密度の評価に有用である可能性が示唆された。しかしながら、同じ骨代謝マーカーでも研究結果は異なり、必ずしも一貫性がないことが指摘される。研究結果の不一致の原因として、少ない対象人数や人種、年齢、骨代謝マーカーの種類やカットオフ値の違い、骨折部位や評価方法の違いなどの要因が考えられる。



## (8) 骨密度に影響を与える要因

### ① 年齢、性

1993 年香港で開催された骨粗鬆症のコンセンサス会議 [15] では、骨量の加齢変化および性差について次のように述べている。「骨量は児童期・青年期に増加し、30 歳代～40 歳代前半に最大骨量を示し、その後、徐々に減少する。成人では全ての年齢層において、女性は男性より骨量が少なく、閉経後 5 年で急速な減少を示す。女性において、加齢による骨量の減少は年間約 1% であるが、閉経後初期では年間 3～5% の減少もまれではない。一生で失う最大骨量は、女性で 30～40%、男性で 20～30% である。骨粗鬆症が発症するかどうかは、最大骨量の程度と閉経後および加齢に伴う骨量の減少によって決まる。骨粗鬆症の予防は最大骨量を最大にして、閉経後と加齢に伴う骨量減少を軽減することである。」

Soda ら [45] による 15 歳以上の日本人女性 386 人を対象とした横断研究の成績では、日本人女性の最大骨密度は 35～45 歳にあり、骨密度は 30 歳までは年齢とともに増加するが、閉経後 10 年の間で急速に減少し、その後、徐々に減少することが報告された。

日本人女性を対象として、閉経前後における骨量変化を調べた研究はいくつかある。Zhang ら [46] は、31～69 歳の日本人女性 172 人を対象として、骨量の加齢変化について、10 年間にわたり追跡している。その結果、閉経前の期間に有意な骨密度の減少はなかったが、閉経後初期では年間 1.59% 減少し、骨密度の減少率は閉経後後期で失速した。重回帰分析の結果、骨密度減少の影響要因として、閉経と加齢が最も影響力のある要因であった。Hagino ら [47] は 21～74 歳 (平均年齢  $47.5 \pm 11.3$  歳) の日本人女性を平均 4.2 年追跡した結果、閉経前 49 人、閉経初期 16 人、閉経後後期 52 人の年間骨密度減少率は、それぞれ  $-0.61$ ,  $-1.95$ ,  $-1.88$  であり、骨密度の最も急激な低下は閉経初期であることを報告した。

一方、日本人成人男性における骨密度の加齢変化は、報告数が少ない。吉川ら [44] による縦断的検討では、日本人男性 443 人（平均年齢  $54.3 \pm 10.4$  歳）を対象として平均 4.8 年追跡した結果、骨密度の年間変化率は腰椎  $0.405 \pm 1.56\%$ 、大腿骨頸部  $-0.249 \pm 1.12\%$ 、橈骨  $-0.517 \pm 0.89\%$  であり、加齢とともに腰椎では有意な増加、大腿骨頸部と橈骨では有意な減少が示された。また、女性では閉経後に急激な骨密度減少がみられやすく、特に腰椎に急激な骨密度減少がみられるため、閉経後骨粗鬆症の早期発見には一般に腰椎骨密度が用いられるが、男性では中高年における腰椎の退行性変化が女性よりも強く、骨粗鬆症の診断には適さないことが示唆された。

Nakamura ら [48] による縦断研究では、日本人女性 5,281 名（平均年齢  $48.2 \pm 12.8$  歳）と男性 1,062 人（平均年齢  $53.5 \pm 10.9$  歳）を対象として、骨密度の加齢変化に関する調査が行われた。その結果、最大骨密度は女性では 40～44 歳、男性では 30～34 歳であった。さらに、50 歳以降の骨密度の年間減少率は、女性で  $-1.6\%$  / 年、男性で  $-0.87\%$  / 年であり、女性の骨減少率は男性よりも 1.7 倍速く、骨獲得と骨損失には性差があることが報告された。特に女性では、閉経後の骨密度の減少が必須なので、閉経期までに最大骨量を獲得し、将来の骨粗鬆症のリスクを最小にする予防戦略が必要であることが示唆された。

## ② 体格

Zhang ら [46] は、10 年の前向き研究により、閉経後の日本人女性 153 人において、肥満者は非肥満者と比較して骨密度の年間減少率が少ないことを報告し、脂肪組織は骨損失を抑制する可能性を示唆した。また、Salamone ら [49] による無作為臨床試験では、体重減少（食行動修正と運動推進）のためにライフスタイル介入プログラムに参加した 236 人の閉経前女性 44～50 歳の骨密度について調査が行われた。その結果、18 ヶ月後の

体重は介入群 (n = 115) で  $3.2 \pm 4.7$  kg の減少、コントロール群 (n = 121) で  $0.42 \pm 3.6$  kg 増加し、骨密度の年間減少率は、介入群がコントロール群に比べて高いことが報告された ( $0.81 \pm 1.3\%$  loss vs.  $0.42 \pm 1.1\%$  loss;  $p < 0.001$ )。このことから、体重の減少は骨密度を低下させることが示唆された。体重が骨に及ぼすメカニズムとして高体重は低体重よりメカニカルストレスが多く負荷されることにより骨密度が高められるとされている [50]。さらに Reid [51] は、「脂肪—骨」の関連性に関するメカニズムとして、脂肪量が増えると膵  $\beta$  細胞から分泌されるホルモン (インスリン、アミリン、プレプチン) や脂肪細胞から分泌されるホルモン (エストロゲン、レプチン) が増え、これらのホルモンによって骨芽細胞が活性化され、破骨細胞の活性が抑えられるという仮説を立てている。体重の高値は高骨密度と関連するが、体格指数 (Body mass index, BMI) の高値は日本人において心臓病のリスクを高める [52] ことから、一般的な健康のためには適切な BMI を勧めるべきである。

### ③ 運動

アメリカスポーツ医学会が成人期の骨の健康を維持するために推奨している運動処方として、①種目：体重負荷持久的活動 (テニス、階段を上がる、ジョギング)、ジャンプを含む活動 (バレーボール、バスケットボール)、レジスタンス運動 (ウエイトリフティング)、②強度：骨負荷力に関して、中～高強度、③頻度：体重負荷持久的運動を 1 週間に 3～5 回、レジスタンス運動を 1 週間に 2～3 回、④運動時間：体重負荷持久的活動、ジャンプを含む活動、全ての大筋群を対象としたレジスタンス運動の組み合わせを 1 日あたり 30～60 分としている [53]。Kelley ら [54] による 8 件の研究成果をまとめたメタアナリシスでは、男性 225 人を対象として運動が骨密度へ及ぼす影響が検討された。その結果、様々な運動やスポーツによる機械的刺激が骨密度を高めることが報告された。

Heinonen ら [55] のランダム化比較試験では、閉経前女性 (35~45 歳) 98 人をトレーニング群とコントロール群に無作為に割り付け、トレーニング群にはハイインパクトの運動 (バスケットボールやトランポリンなどの走る動作や跳ねる動作の運動) を 18 ヶ月間継続させ、トレーニングが骨密度を高めるかどうかを調査した。その結果、トレーニング群では、大腿骨頸部とその他の重量負荷部位における骨密度が有意に増加したが、重量負荷のない部位では有意な増加は見られなかった。Sinaki ら [56] も、96 人の閉経前女性 30~40 歳の欧米人女性を運動群とコントロール群に無作為に割り付けて、運動群は 1 週間に 1 回の重量負荷プログラムを 3 年間実施した。3 年目には運動群の 34%、コントロール群の 22% がドロップアウトした。3 年間の結果では運動群はコントロール群に比べて筋力は上昇していたが骨密度には差がなかった。これらの研究結果により、閉経前女性において、中等度程度の重量負荷運動は骨密度には効果は見られないが、ハイインパクトな運動は重量負荷の骨密度を増加させることが示唆された。すなわち、閉経前女性では、運動処方ハハイインパクトであることが重要であり、軽度~中等度の運動ではたとえ長期間持続しても骨への影響が少ないことが示唆された。

Högström ら [57] は、スウェーデン人の医学生、男性 62 人 (平均年齢 28 歳)、女性 62 人 (平均年齢 25 歳) を対象として、運動習慣が骨密度へ及ぼす影響を性別に検討した。1 週間当たりの運動時間と運動強度を調査し、身体活動レベルで高負荷、中負荷、低負荷の 3 群に分け、骨密度との関連を調査した結果、男性において、1 週間の運動の総時間と骨密度が正の関連を示したが、女性では、運動と骨密度との関連は認められなかった。運動レベルが男性と女性では異なる影響を骨密度へ与える仮説として、女性の場合は、骨密度に影響するほどの負荷の高い運動をしなかった可能性があることが示唆されている。

一方、減量を目的とした運動が骨密度にどのような影響を及ぼすかについて検討した Villareal ら [58] の介入研究がある。この研究は平均年齢  $57 \pm 3$  歳、平均 BMI  $27 \pm 2 \text{ kg/m}^2$  のアメリカ人男女 48 人 (男性  $n = 18$ 、女性  $n = 30$ ) を対象として、運動による減量と食

事のカロリー制限による減量では、どちらの方法のほうが骨密度の減少率が高いのかを検討した。食事カロリーを最初の3ヶ月は16%、続く9ヶ月を20%減少させた群(n=19)と、従来と同じカロリーの食事を取り、運動によってエネルギー消費量を最初の3ヶ月は16%、続く9ヶ月を20%増やした群(n=19)、従来の生活習慣を維持した群(n=10)の3群に分け、1年後に体重と骨密度を測定した結果、食事でカロリーを減らした群では、体重が平均8.2kg減少し、骨密度も2%減少した。一方、運動をしてカロリーを消費した群は、体重が平均6.7kg減少したが、骨密度に変化はなかった。また、生活習慣を維持した群は、体重も骨密度もほとんど変化はなかった。運動による減量では骨密度が保たれるが、食事のカロリー制限による減量では骨密度が減少することを示した研究であるが、サンプル数が少ないために男女差の比較検討はされておらず、継続的な調査が必要である。

#### ④ 栄養

Sasakiら[59]による日本人女性380人を対象とした横断研究では、カルシウム摂取量と骨密度との関連が調査された。その結果、閉経前女性(n=243、29~60歳)においてはカルシウム摂取量と骨密度とは有意な相関を示したが、閉経後(n=137、39~60歳)では有意でなかったことが報告された。フラミンガムのコホート研究[60]では、28~62歳の男女5,209人の食事パターンと骨密度との関連について調査された。①肉・乳製品・パン群、②肉・菓子パン群、③菓子パン群、④アルコール群、⑤菓子群、⑥果物・野菜・シリアル群の6区分された食事パターンにおいて、果物・野菜・シリアル群は男性の高骨密度と関連し、菓子群は男女の低骨密度と関連した。また、果物・野菜・シリアル群ではマグネシウム、ビタミンC、ビタミンKの摂取量が最も多かった。Okuboら[61]も、日本国内5地区における農業に従事する閉経前の日本人女性291人(40~55歳)につい

て、食事パターンと骨密度との関連を調査している。この研究では栄養調査の結果から、①健康食群、②日本型食事群、③欧米型食事群、④野菜と肉の食事群の4つの食事パターンに分類し、それぞれの食事パターンの摂取量が最も少ないグループから最も多いグループまで5分割して骨密度を比較した。その結果、緑黄色野菜・キノコ・魚介類・果物の摂取量が多いことで特徴づけられる健康的な食事パターンが多いほど有意に骨密度が高かった ( $p = 0.045$ )。これに対し、食用油、脂肪や肉の摂取量が多い欧米型食事パターンが多いほど骨密度が低い傾向にあった ( $p = 0.08$ )ことを報告している。Itoh ら [62] は、20～79歳の日本人男性349人と女性406人を対象としてタンパク質摂取量と尿中カルシウム排泄量との関連を調べた結果、高タンパク食は尿中カルシウム排泄量を増加させることを報告し、高タンパク食が骨密度を低下させる可能性を示唆した。しかしながら、Sellmeyer ら [63] は、65歳以上の欧米人女性742人の植物性タンパク質に対する動物性タンパク質の比率と骨密度との関連を調査したところ、骨密度の年間減少率は、動物性タンパク質の比率の高い群が低い群と比較して有意に低く、この影響は年齢、エネルギー摂取量、総カルシウム摂取量、エストロゲンの使用、運動、喫煙、体重、飲酒、総タンパク質量を調整しても変わらなかったことを報告した。タンパク質の摂取が骨へ及ぼす影響は一致した見解が得られていないが、2007年にWHOは野菜や果物のアルカリ化の影響が少ないときタンパク質中の含硫アミノ酸、メチオニン、システインの酸が骨のカルシウムを流出させるため骨密度が低下すると結論付けている [64]。

## ⑤ 喫煙

18～20歳のノルウェー人男性1,068人を対象とした大規模研究 [65] の成績では、骨密度は喫煙者が非喫煙者よりも低いことが報告された。本邦にあたっては、Hagiwara ら [66] が男性1,736人(20～64歳)を対象に骨密度の決定要因を解析し、喫煙は年齢、BMIお

よび飲酒量の因子と独立して低骨密度に関与していることを報告した。

Law ら [67] は、喫煙者 (n = 2,156) と非喫煙者 (n = 9,705) の間での女性の骨密度の相違に関する 29 件の横断的研究論文を対象としたメタアナリシスを行っている。その結果、閉経前の喫煙・非喫煙者間に骨密度の差はなかったが、閉経後の喫煙者は、非喫煙者と比較して年齢とともに 10 年で 2% の骨密度の減少を認めたことを報告した。これらことから、喫煙は低骨密度と関連することが示唆された。

## ⑥ 飲酒

Felson ら [68] はフラミンガムの研究対象のうち、1,154 人を対象として、アルコール摂取量と骨密度との関連を調査した。アルコール摂取量は <1 oz (29.57 ml) / 週; ≥1 oz (29.57 ml) ~3 oz (88.71 ml) / 週; ≥3 oz (88.71 ml) ~7 oz (206.99 ml) / 週; ≥7 oz (206.99 ml) / 週 (女性のみ) ; ≥14 oz (414 ml) / 週 (男性のみ) の 4 区分に分けられた。その結果、アルコール摂取量が少なくとも 7 oz / 週飲用している女性の骨密度は 1 oz / 週未満と比較して 7.7% 高かった。一方男性では、少なくとも 14 oz / 週飲用者の骨密度は 1 oz / 週未満と比較して 3.9% 高かったことを報告した Berg ら [69] による最近のメタアナリシスでは、骨折のリスク比は飲酒習慣のない群に比べ、1 日に 0.5~1.0 杯では 0.80 (95% CI: 0.71-0.91) と有意に低かったが、1 日に 2 杯以上では 1.39 (95% CI: 1.08-1.79) と有意に高いことが報告された。また、適量を規定するには十分なエビデンスが得られていないとしながらも、飲酒と大腿骨頸部骨密度との間には有意な正相関を認めていることが示された。これらことから、適量の飲酒は骨代謝に対し何らかの有益な作用を及ぼすが、逆に過度の飲酒は悪影響を及ぼす可能性が示唆される。しかしながら、現時点では作用機序や作用出現までの正確な摂取量は明らかにされていない。

#### (9) ビタミン D および VDR の作用機序

カルシウムは骨代謝にとって重要な栄養素である。ビタミン D は腸管からのカルシウム吸収、副甲状腺ホルモン分泌、骨代謝回転の亢進を引き起こすことで、カルシウム代謝バランスを正に保ち、骨量を高め、維持するのに重要な働きをする。食事から摂取あるいは皮膚で合成されたビタミン D は、肝臓の 25-水酸化酵素で 25 位が水酸化される。さらに腎臓の近位尿細管に発現する  $1\alpha$ -水酸化酵素により 1 位が水酸化され、活性型ビタミン D ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ ) となる。活性型ビタミン D は小腸、副甲状腺、骨、腎臓などの標的器官の核内に存在する VDR と結合し、生体のカルシウムの調節や骨代謝に関与している遺伝子の発現を制御している [70]。

#### (10) 骨密度と VDR 遺伝子多型との関連

VDR は核内受容体スーパーファミリーに属し、ビタミン D の効果発現系において重要な役割を果たす 427 個のアミノ酸配列を有するタンパク質である [71]。ビタミン D は、骨およびカルシウム代謝の有力な制御因子である [72]。VDR 遺伝子は第 12 染色体上に存在する VDR をコードする遺伝子であり、長約 75 kb で 11 のエクソンから構成されている。タンパク質をコードするのはエクソン 2 から 8 つのエクソンである [71]。おもな VDR 遺伝子多型の部位を図 2 に示した。



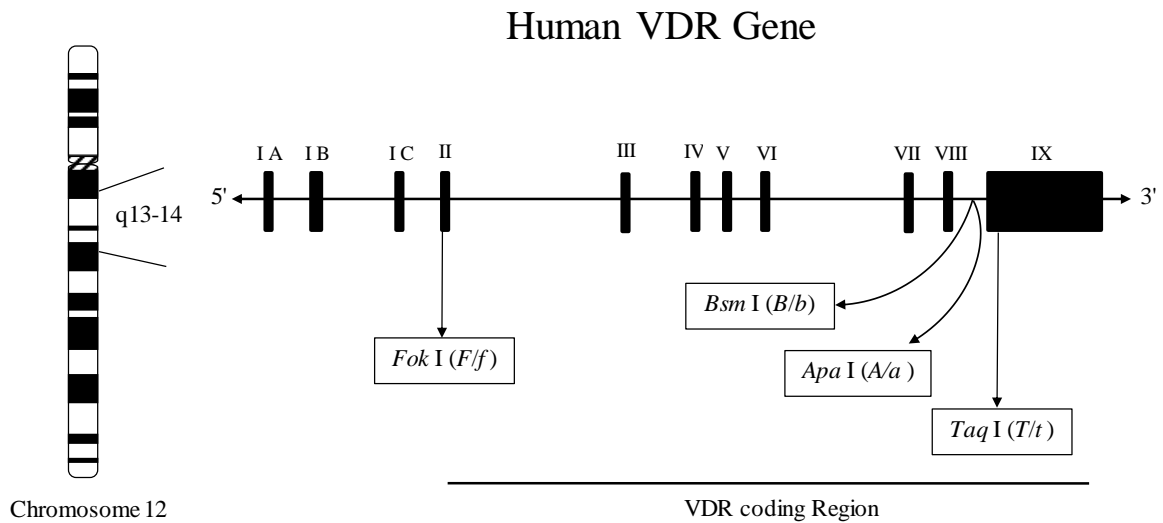


図2 VDR 遺伝子多型の部位 (Haussler et al. 1998から改変)

VDR 遺伝子多型を用いた骨密度の遺伝的要因の検討は、1994 年に Morrison ら [3] が第 8 エクソンと第 9 エクソンの間のイントロン領域内での制限酵素 *BsmI* による切断の可否によって多型を検出し、VDR 遺伝子多型と骨密度との関連が報告されたことにより端を発する。制限酵素 *BsmI* で切断されない対立遺伝子を *B*、切断される対立遺伝子を *b* とした場合、骨密度が *BB* 型で最も低く *bb* 型で最も高いことを示した。その後、Spector ら [73] は、第 9 エクソンに存在する制限酵素 *TaqI* で判別される多型を検出し、制限酵素の認識部位を持たずに切断されない対立遺伝子を *T*、認識部位を持ち切断される対立遺伝子を *t* とした場合、骨密度が *tt* 型で最も低く *TT* 型で最も高いことを報告した。また、制限酵素 *ApaI* [74] や制限酵素 *FokI* [75] で切断される多型と骨密度との関連が相次いで報告された。その後も欧米を中心に他施設での追試が行われたが、人種や年齢構成によって上記相関は再現されないことが指摘された。たとえば、Salamone ら [76] は、44～50 歳のアメリカ人閉経前女性 470 人において、*bb* 型は低骨密度と有意に関連することを報告した。Morrison らのデータに否定的な見解が相次いで報告された中で、Dawson-Hughes ら [77] は、閉経後のアメリカ人女性 60 人を対象として、カルシウム制限食を与え、その後、腸のカルシウム吸収能力を調査した。その結果、*BB* 型の人では

*bb*型の人と比較して低カルシウム食に対する腸のカルシウム吸収能力の増加が弱かったことを報告した。この事実は、*BB*型の人が低カルシウムという環境に対し、うまく適応できないという可能性を示唆している。また、Kielら [78] はカルシウム摂取量と遺伝子型の相互が骨密度に及ぼす影響を検討した。その結果、*VDR* 遺伝子多型の骨密度に及ぼす影響は、食事中のカルシウム摂取量に依存することを報告した。当初、Morrisonらのデータに否定的な見解が相次いだのは、調査対象のカルシウム摂取量がたまたま多かったためとも考えられる。

Keenら [79] は、195人の女性について*VDR* 遺伝子多型 (*TaqI*) と骨密度の年間減少率との関連を調査した結果、*TT*型 71人 (平均年齢  $52.8 \pm 3.7$  歳)、*Tt*型 96人 (平均年齢  $52.5 \pm 3.5$  歳)、*tt*型 28人 (平均年齢  $52.6 \pm 3.3$  歳) において、年齢に伴って変化する骨密度の変化は、*VDR* 遺伝子多型との有意な関連がないことを報告し、骨密度は主に最大骨量の段階で*VDR* 遺伝子多型の影響を受ける可能性を示唆した。この仮説は、その後Riggsらの報告によって支持される。Riggsら [80] は30歳以上 (平均年齢  $65.8 \pm 5.9$  歳) のアメリカ人女性 182人 (健康対照者 139人、閉経後骨粗鬆症患者 43人) を対象に、*VDR* 遺伝子多型 (*TaqI*、*BsmI*、*ApaI*) が骨密度へ及ぼす影響を調査した。その結果、*VDR* 遺伝子多型 (*TaqI* および *ApaI*) は骨密度と有意な関連を示した (*TaqI*,  $p = 0.036$ ; *BsmI*,  $p = 0.118$ ; *ApaI*,  $p = 0.041$ )。その影響は、若年女性 (閉経前女性) で最も大きく、年齢とともに減少し、70歳になると有意な関連が見られなくなった。一方、閉経後骨粗鬆症患者では、有意な関連は認められなかった (*TaqI*,  $p = 0.13$ ; *BsmI*,  $p = 0.21$ ; *ApaI*,  $p = 0.09$ )。

*VDR* 遺伝子多型と骨密度に関する代表的なメタアナリシスは4篇ある。Cooper [81] らは、*VDR* 遺伝子多型 (*BsmI*) と骨密度との関連についてオーストラリア、ヨーロッパ、アメリカ、および日本の16件の疫学研究を対象としたメタアナリシスを行った。その結果、*VDR* 遺伝子多型が持つ骨密度決定への寄与率は約2%であり、統計的な有意差は認められなかったものの、*VDR* 遺伝子多型と骨密度との有意な関連は、若年女性を対象とした場合に検出されやすいことを報告した。一方、Gongら [5] は、*VDR* 遺伝子の *BsmI*、

*TaqI*、*ApaI*、*FokI* の多型と骨密度との関連を調査した 75 件の疫学研究を対象としたメタアナリシスにより、これらの多型が骨密度に関連すると結論づけたものの、有経女性に比べ閉経女性を対象とした場合には年齢調整を行ってもやや関連が検出されにくく、さらに閉経女性の中でも骨粗鬆症患者を含む集団は含まない集団と比較して、関連が検出される割合はより低くなると述べている。Thakkestian ら [82] は、*VDR* 遺伝子多型 (*BsmI*) と骨密度との関連を調査した 39 件の疫学研究を対象としたメタアナリシスによる評価を実施し、*VDR* 遺伝子多型 (*BsmI*) は骨密度と関連することを報告した。さらに Thakkestian ら [83] は *BsmI*、*ApaI*、*TaqI* のハプロタイプ解析を実施した後にメタアナリシスを行った結果、骨密度との有意な関連を報告している。これらの報告から、*VDR* 遺伝子多型は、閉経前女性において骨密度との関連が強くみられ、骨量損失よりも最大骨量と関連することが示唆された。多数の研究結果を数量的、総括的に評価したメタアナリシス研究においても、*VDR* 遺伝子多型は骨密度と関連することが示唆されているが、これらの報告はすべて女性のみを対象にした研究であり男性における関連は明確になっていない。

#### (11) 骨密度と生活習慣および *VDR* 遺伝子多型との関連

これまでに骨密度の遺伝的要因と生活習慣的要因に関する疫学研究として、4 つの研究がなされてきた。1999 年の Rubin ら [6] による 677 人のカナダ人女性 (18~35 歳) の横断研究では、*VDR* (*BsmI*、*ApaI*、*TaqI*) 遺伝子多型と生活習慣を調査し、骨密度獲得と関連する要因を検討した。その結果、大腿骨頸部骨密度獲得の有意な要因は、*VDR* 遺伝子多型 (*ApaI* の *aa* 型)、低年齢、高体重、高身長、思春期と現在での高い身体活動、骨粗鬆症の家族歴無しであった。一方、腰骨骨密度獲得の有意な要因は、高年齢、高体重、思春期の高い身体活動、骨粗鬆症の家族歴無しであった。McGuigan ら [7] によるイギ

リスの横断研究においても *VDR* 遺伝子多型 (*BsmI*)、エストロゲン遺伝子多型、*Ia1* 型コラーゲン遺伝子多型と生活習慣を調査し、骨密度獲得との関連について 20 歳代の男性 244 人、女性 216 人で検討されている。それによると脊椎骨密度の有意な要因は男性ではエストロゲン遺伝子多型 (*pp* 型)、高体重、高い身体活動、高エネルギー摂取であり、女性では *VDR* 遺伝子多型 (*bb* 型)、高体重、高炭水化物摂取であった。一方、大腿骨頸部骨密度の有意な要因は、男性では高い身体活動、飲酒、高体重であり、女性ではエストロゲン受容体遺伝子多型 (*pp* 型)、高ビタミン D 摂取、高体重であった。また、本邦にあたっては、Fujita ら [8] が女性 157 人 (20~37 歳) を対象に *VDR* 遺伝子多型 (*ApaI*、*TaqI*) と生活習慣を調査し、骨密度獲得と関連する要因を解析した。その結果、全身骨密度獲得の有意な要因は、*VDR* 遺伝子型 (*TaqI* の *TT* 型)、正常月経、運動歴有りであった。また、腰骨骨密度獲得の有意な要因は、*VDR* 遺伝子型 (*TaqI* の *TT* 型)、正常月経、高い身体活動、高身長、高 BMI、であった。一方、脊椎骨密度獲得の有意な要因は *VDR* 遺伝子型 (*TaqI* の *TT* 型)、正常月経、運動歴有り、低年齢、高体重であることを報告した。さらに、Hayakawa ら [9] は、日本人女性 140 人 (16~44 歳) を対象とし、*VDR* 遺伝子 (*BsmI*、*FokI*)、エストロゲン受容体遺伝子、カルシトニン受容体遺伝子、副甲状腺ホルモン遺伝子、オステオカルシン遺伝子、アポリポタンパク E 遺伝子、および脂肪酸結合タンパク質 2 遺伝子の多型と生活習慣を調査し、骨密度に関連する要因を解析した。それによると、全身骨密度獲得の有意な要因は、副甲状腺ホルモン遺伝子 (*TT* 型)、オステオカルシン遺伝子 (*HH* 型)、高 BMI、正常月経、高い身体活動であった。また、腰骨骨密度獲得の有意な要因は、オステオカルシン遺伝子 (*HH* 型)、高 BMI であった。一方、橈骨骨密度獲得の有意な要因は、アポリポタンパク E 遺伝子 (*E2/4* 型と *E3/4* 型)、高 BMI、運動であることを報告した。*VDR* 遺伝子多型と骨密度との関連について、本邦の報告 2 篇 [8, 9] では、一致する結果が得られておらず、さらなる調査が必要である。一方、男性を対象とした研究は McGuigan ら [7] の 1 篇のみであり、日本人男性の骨密度に対する *VDR* 遺伝子多型の影響は不明である。

#### 4) 本研究の意義と目的

骨密度の低値は、骨粗鬆症の重大なリスク要因である。骨密度は遺伝要因と生活習慣要因の影響を受ける。そこで、筆者は、遺伝要因として *VDR* 遺伝子多型に注目し、生活習慣要因とともに文献研究を行った。その結果、これらの要因の相互関連性を検討した報告は4篇しかなく、また日本人男性を対象とした報告は皆無であった。加えて、日本人男性の *VDR* 遺伝子多型が骨密度と関連するかについても未だ検討されておらず、これらの課題は研究に値すると考えられる。また、女性において閉経後の骨密度の減少は必須なので、骨粗鬆症の一次予防として閉経期までにできる限り多くの最大骨量を獲得し、将来の骨粗鬆症のリスクを最小にする予防戦略が必要である。そこで、本研究では閉経前女性および成人男性を対象として *VDR* 遺伝子多型解析を行い、骨密度に関連した生活習慣との交互作用を男女別に検討し、さらに骨密度を規定する要因についても横断的デザインを用い検討することを目的とした。*VDR* 遺伝子多型は *TaqI* の他にも *FokI*、*BsmI*、*ApaI* などの多型が存在する。なかでも *BsmI* と *TaqI* は報告数が多く、これら2つの多型は連鎖不平衡が確認されていることから密接に関連している [74]。本邦において、骨密度と生活習慣および *VDR* 遺伝子多型との関連を報告した唯一の研究 [8] は、*ApaI* と *TaqI* の多型を解析しており、骨密度との有意な関連は *TaqI* のほうで確認されていることから、本研究では *TaqI* の多型に注目し解析を行うこととする。骨代謝マーカーによる低骨密度の評価においては日本人男性を対象とした骨密度の加齢変化に関する研究 [44] で、特に *DPD* は骨密度変化率との間に有意な負の相関が認められたとの報告があることや、骨形成マーカーの中で *BAP* は低骨密度の評価に有用であり、また、骨粗鬆症の保険診療で使用可能となっていることから、本研究では *DPD* と *BAP* を測定することとする。今回の研究により、遺伝子レベルで骨粗鬆症のハイリスク群が明らかになり、効果的な骨粗鬆症の予防介入をするための対象者の選定に役立つものと期待される。また、骨密度に対する遺伝子多型と生活習慣との交互作用が明らかとなり、テーラーメイド型保健指導法

の開発にも貢献できる点も、骨粗鬆症の早期予防の観点から重要な知見を提示すると考えられる。さらに、行動変容ツールとしての遺伝子診断の応用展開の可能性も期待され、骨粗鬆症予防対策にとって意義があると考えられる。

#### 5) 本研究の倫理的配慮

本研究のプロトコールは遺伝子解析のガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」[84]に従っており、熊本大学大学院医学部倫理委員会に承認された。対象者からは遺伝子解析についての書面によるインフォームドコンセントを得た。また、問診や健康診断のデータを研究へも使用することに関しては、すべての対象者に説明し同意を得た。

## 6. 実験方法

### 1) 対象者

#### (1) 男性

日本国内の某電気機械器具製造工場の男性従業員 1,055 人のうち、定期健康診断（労働安全衛生規則第 44 条に基づく健康診断）を受診した 60 歳未満の男性従業員 1,029 人に対し調査を依頼した。遺伝子解析の同意を得られたものは 841 人（81%）であった。そのうち、50 歳以上の者、身体計測値または臨床検査値に欠損のある者、遺伝子多型の判定不能者、質問紙の無回答項目が半数以上の者の計 317 人を除外し 524 人を分析の対象とした。

#### (2) 女性

男性と同一工場の女性従業員 338 人のうち、定期健康診断（労働安全衛生規則第 44 条に基づく健康診断）を受診した 44 歳未満の閉経前女性 323 人に対し調査を依頼した。遺伝子解析の同意を得られたものは 217 人（67%）であった。そのうち、身体計測値または臨床検査値に欠損のある者、遺伝子多型の判定不能者、質問紙の無回答項目が半数以上の者の計 55 人を除外し、同意の得られた 162 人を分析の対象とした。

## 2) 測定項目

### (1) 体格測定

身長は身長計を用いて 0.1 cm 単位で測定し、体重は体重計を用いて 0.1 kg 単位で測定した。また、身長と体重から BMI を算出した。

### (2) 骨密度測定

骨密度は DXA (Osteometer 製 DTX200) を使用して利き腕の反対の橈骨前腕遠位側で測定した。DTX200 の測定精度は 1.0%以内であった。調整手順は機械のガイダンスに従って実施した。橈骨の骨密度は、大腿骨頸部骨折のリスクを示す指標として有用であることが報告されている [85]。

### (3) 骨代謝マーカー

対象者は 9 時間以上の絶食後、空腹状態で採血と採尿を受けた。血液サンプルからは血清骨型アルカリフォスファターゼ (Bone-specific alkaline phosphatase, BAP) を、尿サンプルからはデオキシピリジノリン (Deoxypyridinoline, DPD) を酵素免疫測定法により測定した。DPD は尿中クレアチニン値で補正した。DPD は骨吸収マーカーとして、BAP は骨形成マーカーとしての有用性が示されている [86]。



#### (4) VDR 遺伝子多型の解析

VDR 遺伝子多型はポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) により決定した。ゲノム DNA は、DNA Extractor WB kit (和光純薬工業) を用いてフェノール・クロロフォルム法により末梢白血球から抽出した。VDR の *TaqI* 遺伝子多型解析のため、Riggs らの方法 [80] に従いプライマー 5' cag agc atg gac agg gag caa 3' (forward) と 5' gca act cct cat ggc tga ggt ctc 3' (reverse) を使用し、PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) 法による DNA の増幅を行った。PCR は、template DNA 2  $\mu$ l, 3' primer 0.2  $\mu$ l, 5' primer 0.2  $\mu$ l, 10 X Ex Taq Buffer ( $Mg^{2+}$  free) 2  $\mu$ l,  $MgCl_2$  1.6  $\mu$ l, dNTP 1.6  $\mu$ l, Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Co., Ltd, New Jersey, USA) 0.1  $\mu$ l,  $D_2O$  12.3  $\mu$ l の total 20  $\mu$ l の反応系で、94 °C for 1 min, 57°C for 1min, 72°C for 1 min, 35 cycles で行った。その後、PCR product 20  $\mu$ l, *TaqI* 0.4  $\mu$ l, 10 X RB Buffer 1.5  $\mu$ l,  $D_2O$  3.1  $\mu$ l, 65°C for 3 hours で制限酵素 *TaqI* による切断を行い、3%アガロースゲル [87] で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後に UV 照射を行った。電気泳動にて *TT* 型は、495-, 245-bp のバンド、*Tt* 型は 495-, 290-, 245-, 205-bp のバンド、*tt* 型は 290-, 245-, 205-bp のバンドにより識別することが可能であった [87] (図 3)。

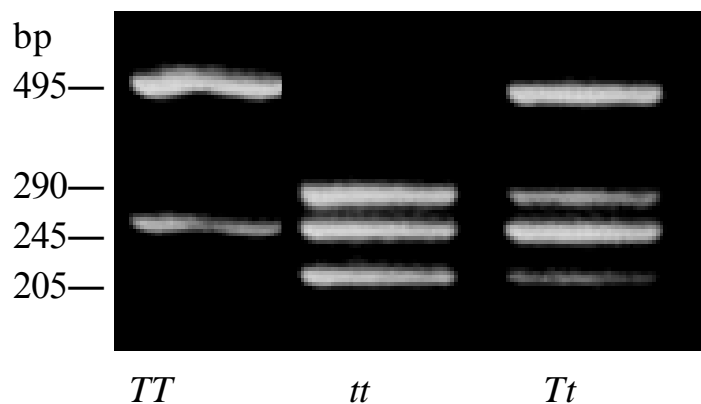


図3 VDR 遺伝子の制限酵素*TaqI* による切断の有無による遺伝子型

### (5) 生活習慣に関するアンケート

骨密度測定後の保健指導を主な目的とする自記式問診票を用い、これまでの先行研究により骨密度との関連が報告されている生活習慣（運動、食事、喫煙および飲酒）について調査した。質問項目は、運動習慣については、過去の運動（“していなかった”、“していた”）、現在の運動（“していない”、“1週間に1~2回”、“1週間に3~7回”）とした。食習慣については、毎日の牛乳飲用（“していない”、“している”）、1日の食事回数（“3食”、“2食以下”）、ダイエット経験（“ない”、“ある”）とした。喫煙習慣は（“吸わない”、“1日に20本以下”、“1日に21本以上”）、飲酒習慣は（“飲まない”、“時々飲む”、“毎日飲む”）とした。過去の運動は20歳までの運動習慣、現在の運動は1週間当たりの運動頻度とした。

### 3) 統計解析

結果は平均 ± 標準偏差で表示し、カテゴリカル変数は頻度として表した。ハーディー・ワインベルグの法則の一致は、カイ2乗適合度検定によって決定した。男女間の年齢、身体計測値、骨密度、骨代謝マーカーの平均値の差の検定には Student's *t*-test を用いた。生活習慣または VDR 遺伝子型による骨密度の差の検定には、年齢と BMI を調整した共分散分析 (Analysis of covariance, ANCOVA) を用いて分析し、独立変数間の交互作用が有意でないことを確認した。骨密度に関連する要因を調べるため、骨密度を従属変数、各変数（骨代謝マーカーを除く）を独立変数として重回帰分析を行った。分散拡大要因が 10 以上を示すと説明変数間に強い線形関係が存在し、多重共線性の問題が発生すると考えられている [88]。この問題を回避するため、採択する変数の分散拡大要因が 10 以上を示す場合、またはその変数を採択することによって、他の変数の分散拡大要因が

10 以上を示す場合、その変数は採択しないこととした。有意水準 5%未満をもって統計的に有意ありとした。すべての統計分析は、SPSS 15.0 software を使用した。

## 7. 実験結果

### 1) 対象者の身体的特徴

平均年齢は男性 $37.3 \pm 5.4$ 歳、女性 $30.7 \pm 5.3$ 歳であった。平均骨密度は男性 $0.559 \pm 0.058$  g/cm<sup>2</sup>、女性 $0.463 \pm 0.043$  g/cm<sup>2</sup>であった。対象者の身体的特徴を男女で比較した結果、すべての測定値において有意な男女差が認められた (表 2)。

表2 対象者の身体的特徴

	男性 (n = 524)	女性 (n = 162)	<i>p</i> <sup>*</sup>
年齢 (歳)	$37.3 \pm 5.4$	$30.7 \pm 5.3$	<0.001
身長 (cm)	$169.9 \pm 5.8$	$157.8 \pm 5.5$	<0.001
体重 (kg)	$67.7 \pm 9.8$	$53.2 \pm 9.7$	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$23.4 \pm 3.0$	$21.4 \pm 3.8$	<0.001
骨密度 (g/m <sup>2</sup> )	$0.559 \pm 0.058$	$0.463 \pm 0.043$	<0.001
DPD (nmol/mmol・CRE)	$3.7 \pm 1.2$	$5.5 \pm 1.6$	<0.001
BAP (U/L)	$25.5 \pm 8.0$	$18.4 \pm 4.7$	<0.001

値は平均値 ± 標準偏差で記載

Student's *t*-test

### 2) VDR 遺伝子多型の頻度

VDR 遺伝子多型の分布はハーディー・ワインベルグの法則に従った (男性  $p = 0.45$ , 女性  $p = 0.10$ )。VDR 遺伝子多型の頻度は、男性 *TT* 型 81.3%、*Tt* 型 17.9%、*tt* 型 0.8%、女

性 *TT* 型 77.2%、*Tt* 型 22.8%、*tt* 型 0%であり、過去に日本人を対象とした研究 (*T* allele frequency 0.80, *t* allele frequency 0.20) [8] と類似していた (表 3)。

表3 *VDR* 遺伝子多型の頻度

遺伝子型; n (%)	男性 (n=524)	女性 (n=162)
<i>TT</i>	426 (81.3)	125 (77.2)
<i>Tt</i>	94 (17.9)	37 (22.8)
<i>tt</i>	4 (0.8)	0 (0)

### 3) *VDR* 遺伝子多型別の身体的特徴

*VDR* 遺伝子多型で比較した身体的特徴の結果を表 4 に示した。日本人では *tt* 型の頻度が低いので、ヘテロ型 (*Tt*) とホモ型 (*tt*) を組み合わせて *TT* 型群と *Tt* + *tt* 型群の 2 群に区分した。女性では、年齢と BMI を調整した骨密度は、*Tt* 型群が *TT* 型群と比較して有意に低値を示したが、男性では差は認められなかった。年齢、身長、体重、BMI、DPD および BDP については、男女ともに有意な群間差は認められなかった。

#### 4) 生活習慣および VDR 遺伝子型別の平均骨密度

表4 VDR 遺伝子多型別の身体的特徴

	男性 (n = 524)		女性 (n = 162)	
	TT (n = 426)	Tt + tt (n = 98)	TT (n = 125)	Tt (n = 37)
年齢 (歳)	37.5 ± 5.5	36.6 ± 5.0	30.5 ± 5.1	31.5 ± 5.8
身長 (cm)	169.8 ± 5.9	170.4 ± 5.7	157.4 ± 5.3	159.3 ± 5.9
体重 (kg)	67.9 ± 10.0	66.6 ± 9.0	52.9 ± 10.2	54.2 ± 7.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 3.1	22.9 ± 2.6	21.4 ± 4.0	21.4 ± 3.0
骨密度 (g/m <sup>2</sup> )	0.561 ± 0.059	0.552 ± 0.056	0.466 ± 0.043	0.453 ± 0.043*
DPD (nmol/mmol・CRE)	3.7 ± 1.2	3.6 ± 1.1	5.5 ± 1.7	5.3 ± 1.5
BAP (U/L)	25.6 ± 8.3	25.1 ± 6.9	18.2 ± 4.8	19.3 ± 4.3

値は平均値 ± 標準偏差で記載

\* $p < 0.05$ ; 年齢とBMIを調整した共分散分析

#### (1) 男性

表 5 に男性の骨密度に及ぼす生活習慣要因と VDR 遺伝子多型の影響を示した。年齢と BMI を調整した ANCOVA の結果、過去の運動、1 週間に 3~7 回の現在の運動または毎日の飲酒習慣のある人は、それらの生活習慣がない人と比較して骨密度が有意に高値を示した。1 日 2 食以下または 1 日 21 本以上の喫煙習慣のある人では、Tt + tt 型群は TT 型群と比較して骨密度が有意に低値を示した。その他の要因（毎日の牛乳飲用およびダイエット歴）と骨密度との間には有意な関連は認められなかった。

表 5 生活習慣およびVDR遺伝子型別の平均骨密度(男性)

	全体 (n = 524)		TT (n = 426)		Tt + tt (n = 98)	
	n (%)	骨密度	n (%)	骨密度	n (%)	骨密度
過去の運動						
していない	104 (19.9)	0.537 ± 0.059	82 (19.3)	0.540 ± 0.060	22 (22.7)	0.528 ± 0.056
していた	418 (80.1)	0.565 ± 0.057 <sup>a</sup>	343 (80.7)	0.566 ± 0.057 <sup>b</sup>	75 (77.3)	0.560 ± 0.054 <sup>c</sup>
現在の運動						
していない	278 (54.2)	0.553 ± 0.058	220 (52.8)	0.554 ± 0.059	58 (60.4)	0.547 ± 0.053
1週間に1~2回	180 (35.1)	0.564 ± 0.058	149 (35.7)	0.564 ± 0.059	31 (32.3)	0.563 ± 0.057
1週間に3~7回	55 (10.7)	0.575 ± 0.057 <sup>a</sup>	48 (11.5)	0.579 ± 0.054 <sup>b</sup>	7 (7.3)	0.548 ± 0.075
毎日の牛乳飲用						
していない	420 (80.2)	0.560 ± 0.058	345 (81.0)	0.562 ± 0.059	75 (76.5)	0.553 ± 0.057
している	104 (19.8)	0.554 ± 0.057	81 (19.0)	0.556 ± 0.058	23 (23.5)	0.549 ± 0.054
1日の食事回数						
3食	427 (81.5)	0.561 ± 0.058	347 (81.5)	0.561 ± 0.059	80 (81.6)	0.560 ± 0.055
2食以下	97 (18.5)	0.551 ± 0.058	79 (18.5)	0.560 ± 0.058	18 (18.4)	0.514 ± 0.043 <sup>d,e</sup>
ダイエット経験						
ない	425 (81.1)	0.556 ± 0.057	344 (80.8)	0.557 ± 0.058	81 (82.7)	0.549 ± 0.054
ある	99 (18.9)	0.574 ± 0.060	82 (19.2)	0.575 ± 0.059	17 (17.3)	0.566 ± 0.065
喫煙						
吸わない	200 (38.7)	0.556 ± 0.055	160 (38.1)	0.556 ± 0.056	40 (41.2)	0.554 ± 0.052
1日に1~20本	254 (49.1)	0.560 ± 0.060	204 (48.6)	0.561 ± 0.060	50 (51.6)	0.555 ± 0.058
1日に21本以上	63 (12.2)	0.562 ± 0.061	56 (13.3)	0.568 ± 0.060	7 (7.2)	0.514 ± 0.054 <sup>f</sup>
飲酒						
飲まない	155 (30.4)	0.551 ± 0.061	129 (31.3)	0.552 ± 0.061	26 (26.5)	0.545 ± 0.060
時々飲む	141 (27.6)	0.554 ± 0.057	116 (28.2)	0.558 ± 0.057	25 (25.5)	0.538 ± 0.060
毎日飲む	214 (42.0)	0.565 ± 0.056 <sup>a</sup>	167 (40.5)	0.560 ± 0.059	47 (48.0)	0.563 ± 0.050

値は平均値 ± 標準偏差で記載

$p < 0.05$ ; 年齢とBMIを調整した共分散分析

<sup>a</sup> していない(全体)との比較

<sup>b</sup> していない(TT)との比較

<sup>c</sup> していない(Tt + tt)との比較

<sup>d</sup> 2食以下(TT)との比較

<sup>e</sup> 3食(Tt + tt)との比較

<sup>f</sup> 1日に21本以上(TT)との比較

## (2) 女性

表 6 に女性の骨密度に及ぼす生活習慣要因と *VDR* 遺伝子多型の影響を示した。調査票は男性と同様のものを使用した。女性の対象者は少なかったため、カテゴリを次のように再編成した；過去の運動（“していなかった”、“していた”）、現在の運動（“していない”、“している”）、毎日の牛乳飲用（“していない”、“している”）、1日の食事回数（“3食”、“2食以下”）、ダイエット経験（“ない”、“ある”）、喫煙（“吸わない”、“吸う”）、飲酒（“飲まない”、“飲む”）。現在の運動は1週間に1回以上の運動習慣とした。年齢とBMIを調整したANCOVAの結果、飲酒習慣のある人では、*Tt*型群は*TT*型群と比較して骨密度が有意に低値を示した。その他の要因（過去・現在の運動、毎日の牛乳飲用、1日の食事回数、ダイエット経験および喫煙）と骨密度との間には有意な関連は認められなかった。



表 6 生活習慣およびVDR 遺伝子型別の平均骨密度(女性)

	全体 (n = 162)		TT (n = 125)		Tt (n = 37)	
	n (%)	骨密度	n (%)	骨密度	n (%)	骨密度
過去の運動						
していなかった	59 (36.6)	0.465 ± 0.049	49 (39.2)	0.468 ± 0.050	10 (27.8)	0.449 ± 0.045
していた	102 (63.4)	0.462 ± 0.040	76 (60.8)	0.464 ± 0.039	26 (72.2)	0.454 ± 0.043
現在の運動						
していない	124 (80.0)	0.464 ± 0.045	96 (80.0)	0.467 ± 0.045	28 (80.0)	0.452 ± 0.042
している	31 (20.0)	0.460 ± 0.036	24 (20.0)	0.461 ± 0.031	7 (20.0)	0.459 ± 0.052
毎日の牛乳飲用						
していない	117 (72.2)	0.464 ± 0.045	93 (74.4)	0.466 ± 0.045	24 (64.9)	0.455 ± 0.047
している	45 (27.8)	0.459 ± 0.038	32 (25.6)	0.464 ± 0.039	13 (35.1)	0.449 ± 0.034
1日の食事回数						
3食	117 (72.2)	0.463 ± 0.045	94 (75.2)	0.466 ± 0.045	23 (62.2)	0.452 ± 0.042
2食以下	45 (27.8)	0.462 ± 0.040	31 (24.8)	0.465 ± 0.038	14 (37.8)	0.455 ± 0.045
ダイエット経験						
ない	54 (33.3)	0.459 ± 0.042	40 (32.0)	0.457 ± 0.041	14 (37.8)	0.466 ± 0.046
ある	108 (66.7)	0.465 ± 0.044	85 (68.0)	0.470 ± 0.044	23 (62.2)	0.455 ± 0.040
喫煙						
吸わない	124 (76.5)	0.460 ± 0.044	97 (77.6)	0.464 ± 0.044	27 (73.0)	0.447 ± 0.043
吸う	38 (23.5)	0.471 ± 0.039	28 (22.4)	0.471 ± 0.040	10 (27.0)	0.470 ± 0.039
飲酒						
飲まない	98 (64.1)	0.463 ± 0.045	74 (62.7)	0.464 ± 0.044	24 (68.6)	0.461 ± 0.047
飲む	55 (35.9)	0.462 ± 0.041	44 (37.3)	0.469 ± 0.042	11 (31.4)	0.438 ± 0.030*

値は平均値 ± 標準偏差で記載

\*  $p < 0.05$ ; 年齢とBMI を調整した共分散分析 (TTとの比較)

## 5) 骨密度に関連する生活習慣要因および VDR 遺伝子多型

骨密度を従属変数、年齢、BMI、VDR 遺伝子多型、過去の運動、現在の運動、毎日の牛乳飲用、1日の食事回数、ダイエット経験、喫煙、および飲酒を独立変数とした重回帰分析の結果を表7と表8に示した。分散拡大要因を用いて、モデルに用いる独立変数に多重共線性が発生しているか確認を行ったところ、身長と体重に多重共線性が発生していたため、この2つの変数を除外して解析を行った。この回帰モデルの分散拡大要因は男性で1.71未満、女性で1.20未満であった。調整済みR<sup>2</sup>乗は男性で14.8%、女性で25.3%であった。男性では、BMI (coefficient = 0.006,  $p < 0.001$ )、過去の運動 (coefficient =

0.019,  $p < 0.05$ ) が骨密度との間に有意で独立した関連が認められた (表 7)。女性では年齢 (coefficient = 0.001,  $p < 0.05$ )、BMI (coefficient = 0.006,  $p < 0.001$ )、VDR 遺伝子多型 (*TT* vs. *Tt*; coefficient = -0.016,  $p < 0.05$ ) が骨密度との間に有意で独立した関連が認められた (表 8)。

表 7 骨密度に関連する要因の重回帰分析 (男性)

変数	係数	標準誤差	標準化係数	t	p
年齢 (歳)	0.000	0.001	0.02	0.282	0.78
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.006	0.001	0.33	7.582	<0.001
VDR 遺伝子多型 <sup>a</sup>	-0.001	0.006	-0.01	-0.217	0.83
過去の運動 <sup>b</sup>	0.019	0.006	0.13	2.955	<0.05
現在の運動 <sup>c</sup>	0.004	0.005	0.03	0.775	0.44
毎日の牛乳飲用 <sup>d</sup>	0.003	0.008	0.02	0.425	0.67
1日の食事回数 <sup>e</sup>	0.006	0.006	0.04	0.978	0.33
ダイエット経験 <sup>f</sup>	0.004	0.006	0.03	0.570	0.57
喫煙 <sup>g</sup>	0.007	0.005	0.06	1.382	0.17
飲酒 <sup>h</sup>	0.008	0.005	0.07	1.608	0.11

調整済みR<sup>2</sup>乗 = 0.148

<sup>a</sup> VDR 遺伝子多型: 0(*TT*型)、1(*Tt* + *tt*型)

<sup>b</sup> 過去の運動: 0(していなかった)、1(していた)

<sup>c</sup> 現在の運動: 0(していない)、1(している)

<sup>d</sup> 毎日の牛乳飲用: 0(していない)、1(している)

<sup>e</sup> 1日の食事回数: 0(2食以下)、1(3食)

<sup>f</sup> ダイエット経験: 0(ない)、1(ある)

<sup>g</sup> 喫煙: 0(吸わない)、1(吸う)

<sup>h</sup> 飲酒: 0(飲まない)、1(飲む)

表 8 骨密度に関連する要因の重回帰分析(女性)

変数	係数	標準誤差	標準化係数	t	p
年齢(歳)	0.001	0.001	0.18	2.387	<0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.006	0.001	0.49	6.375	<0.001
VDR 遺伝子多型 <sup>a</sup>	-0.016	0.007	-0.15	-2.079	<0.05
過去の運動 <sup>b</sup>	0.003	0.007	0.03	0.419	0.676
現在の運動 <sup>c</sup>	-0.003	0.008	-0.03	-0.432	0.667
毎日の牛乳飲用 <sup>d</sup>	0.000	0.007	0.00	0.039	0.969
1日の食事回数 <sup>e</sup>	-0.008	0.007	-0.08	-1.091	0.277
ダイエット経験 <sup>f</sup>	-0.005	0.007	-0.05	-0.640	0.523
喫煙 <sup>g</sup>	0.013	0.008	0.12	1.649	0.101
飲酒 <sup>h</sup>	-0.006	0.007	-0.07	-0.941	0.348

調整済みR2乗 = 0.253

<sup>a</sup> VDR 遺伝子多型: 0(TT型)、1(Tt型)

<sup>b</sup> 過去の運動: 0(していなかった)、1(していた)

<sup>c</sup> 現在の運動: 0(していない)、1(している)

<sup>d</sup> 毎日の牛乳飲用: 0(していない)、1(している)

<sup>e</sup> 1日の食事回数: 0(2食以下)、1(3食)

<sup>f</sup> ダイエット経験: 0(ない)、1(ある)

<sup>g</sup> 喫煙: 0(吸わない)、1(吸う)

<sup>h</sup> 飲酒: 0(飲まない)、1(飲む)

## 8. 考察

年齢と BMI を調整した共分散分析の結果から、女性の *Tt* 型群は *TT* 型群に比較し骨密度が有意に低値を示した。男性において、過去の運動、1 週間に 3~7 回の現在の運動または毎日の飲酒習慣のある人は、それらの生活習慣がない人と比較して骨密度が有意に高値を示すことが判明した。さらに、*VDR* 遺伝子多型を含めた解析によると、男性では 1 日 2 食または 1 日 21 本以上の喫煙習慣のある人では、*Tt+tt* 型群は *TT* 型群と比較して骨密度が有意に低値を示した。一方、女性では飲酒習慣のある人では、*Tt* 型群は *TT* 型群と比較して骨密度が有意に低値を示すことが判明した。重回帰分析の結果、男性では過去の運動、女性では *VDR* 遺伝子多型が骨密度との間に年齢、BMI およびその他の生活習慣要因と独立した関連が認められ、これらが骨密度を規定する要因であるものと考えられた。

女性の *VDR* 遺伝子多型と骨密度との有意な関連は、20~37 歳の日本人 [8]、18~35 歳のカナダ人 [6]、20 歳代のイギリス人 [7] を対象とした先行研究と一致した。*VDR* はステロイド受容体遺伝子ファミリーに所属し、ビタミン D の活性の大部分を調整する核転写因子である [71]。ビタミン D はカルシウム吸収、骨吸収、骨細胞分化、副甲状腺ホルモン分泌を調整することで、カルシウムホメオスタシスの中心的役割を果たす [4]。*VDR* は *VDR* 遺伝子のプロモーター領域にあるビタミン D 応答配列によってオステオカルシン遺伝子発現を活性化し [89]、*VDR* 遺伝子はビタミン D の受容体として骨代謝回転を調整する [72]。*VDR* 遺伝子多型の骨密度に及ぼす分子生物学的機序については現在のところ明らかではないが、Dawson-Hughes ら [77] は人における短期吸収実験において、腸管からのカルシウム吸収について *VDR* 遺伝子型の違いを報告していることから、*VDR* 遺伝子多型の腸管でのカルシウム吸収への関与が、骨密度の違いに影響する一因となっていると考えられる。

VDR 遺伝子多型と骨密度との関連を調査した 75 件の研究を対象としたメタアナリシス [5]では、VDR 遺伝子多型が骨密度に関連すると結論づけられており、この関連は閉経後女性よりも閉経前女性のほうが著しく強いことから、VDR 遺伝子多型は骨損失よりも骨量獲得と関連する可能性が示唆されている。また、Riggs ら [80] は、VDR 遺伝子多型が骨密度に及ぼす影響は、若年女性（閉経前女性）で最も大きく、年齢とともに減少し、70 歳になると有意な関連が見られなくなることを報告した。Soda ら [45] は、日本人女性の最大骨密度は 35~45 歳にあり、30 歳代までは骨密度は年齢とともに増加傾向にあることを報告している。本研究対象の女性の平均年齢は  $30.7 \pm 5.3$  歳であり、骨量獲得の時期にある集団と言える。これらのことから VDR 遺伝子多型は、閉経前の日本人女性において骨密度の指標になる可能性が示唆された。すなわち、骨粗鬆症予防としての個人の骨粗鬆症の危険因子を検討する際の一つの遺伝マーカーになる可能性を秘めていると考えられる。一方、男性ではイギリス人男性を対象とした研究 [7] の結果と一致して、VDR 遺伝子多型は骨密度の規定要因ではなかった。しかしながら、1 日 2 食または 1 日 21 本以上の喫煙習慣のある人では、 $Tt + tt$  型群は  $TT$  型群と比較して骨密度が有意に低値を示した。また、女性では飲酒習慣のある人では、 $Tt$  型群は  $TT$  型群と比較して骨密度が有意に低値を示すことが判明した。このことより、骨密度に及ぼす生活習慣の影響が VDR 遺伝子多型によって異なる可能性が示唆された。

骨の約 80~90%は、カルシウムとリンから構成されており、正常な骨代謝のためには、他にもタンパク質、マグネシウム、亜鉛、銅、鉄、ビタミン D、A、C、K のような食事成分が必要とされる [90]。平成 13 年の国民栄養調査 [91] によると、欠食者は非欠食者と比較してこれらの栄養素の摂取量が少ないことが報告されている。さらに、Yaegashi ら [92] は、大腿骨頸部骨折の発生率とカルシウム、マグネシウム、ビタミン D およびビタミン K の摂取量との関連を調査した。その結果、大腿骨頸部骨折の発生率とこれらの栄養素の摂取量との間に負の相関関係が認められた。これら

の報告から、欠食は骨代謝に必要な栄養素の欠乏を招き、結果として骨密度を低下させる可能性が推察される。本研究において、欠食（1日2食以下）による低骨密度は男性の  $Tt + tt$  型群で特異的に確認された。ビタミン D の欠乏がカルシウム吸収を低下させるとの報告 [93] があることから、特に  $Tt + tt$  型群では VDR を介する反応性が変化していることにより、骨密度の低下を促進する可能性が示唆された。

喫煙は低骨密度のリスクファクターであることがこれまでの研究により明らかにされている [65-67]。喫煙が骨代謝に影響を及ぼすメカニズムは明らかではないが、喫煙者では腸管におけるカルシウム吸収の減少が認められるという報告 [94] や喫煙者は非喫煙者と比較して血清 25-ヒドロキシビタミン D 濃度が低いという報告 [95, 96] がある。さらに、カルシウム吸収率は喫煙者で低く、1日20本以上の喫煙者ではさらに低率を示すことが報告されている [95]。本研究の結果では、喫煙による低骨密度は、1日21本以上の喫煙者において  $Tt + tt$  型群で特異的に確認された。喫煙習慣のある人では血清ビタミン D 濃度が低くなる可能性があり、特に  $Tt + tt$  型群では VDR を介する反応性が変化していることにより、骨密度の低下が促進される可能性が示唆された。

女性において飲酒習慣のある人では、 $Tt$  型群は  $TT$  型群と比較して骨密度が有意に低値を示したことから、飲酒が骨密度へ及ぼす影響は VDR 遺伝子多型に依存する可能性がある。閉経前女性では、過度の飲酒が骨形成を妨げ、低骨密度をきたすことが指摘されている [97]。また、アルコール中毒患者では、ビタミン D 代謝障害により食事カルシウムの吸収不足を引き起こし、骨密度の低下を促進することが報告されている [98, 99]。一方、適度の飲酒が骨代謝に及ぼす影響は不明である。メタアナリシスでは、骨折の相対危険度は飲酒習慣のない群に比べ、1日に0.5~1.0杯では有意に低く、1日に2杯以上では有意に高いことが報告されている [69]。飲酒には用量依存効果が存在することが指摘されている [100]。本研究では飲酒量の調査は行っていないため、飲酒量と骨密度との関連を明らかにすることは出来なかった。一方、男性

では *VDR* 遺伝子型とは無関係に毎日の飲酒習慣のある人は、全く飲まない人と比較して骨密度が有意に高値を示した。飲酒が骨密度へ及ぼす影響に性差が認められた理由として、女性は男性に比較し体格が小さく、体内水分量も少ないことから、男性と同じ量のアルコールを摂取しても血中アルコール濃度が高いこと、また、女性ホルモンのエストロジオールが胃粘膜におけるアルコール脱水素酵素活性の働きを抑制し、アルコール代謝を阻害する要因となることが示唆されている [101]。特に女性の *Tt* 型の人では過度の飲酒により肝臓でのアルコール代謝が活発になり、*TT* 型の人よりも、より強くビタミン *D* の代謝が阻害され、食事カルシウムの吸収不足を引き起こし、骨密度の低下を促進する可能性が示唆された。

男性の骨密度を規定する要因は過去の運動習慣であった。過去の運動習慣は骨密度に強く影響することが報告されている [102]。12~15 歳の日本人男女 263 人を対象とした研究では、思春期において 1 週間に 2 回以上の運動を行った人では骨密度が高値を示した [103]。さらに *Karlsson* ら [104] のレビューでは、欧米人の男女を対象として運動が骨密度へ及ぼす長期の影響を評価している。その結果、運動が骨密度に及ぼす最も有益な効果は成長期に獲得されることを報告した。骨形成はメカニカルストレスによって刺激を受ける [105]。特に成長期における運動歴の重要性が指摘されている [53]。しかしながら、本研究では女性の運動習慣と骨密度との間に有意な関連は認められなかった。先行研究によれば、閉経前女性において、軽度~中等度程度の重量負荷運動は、たとえ長期間持続しても骨への影響が少ない [56] が、ハイインパクトな運動は骨密度を増加させる [55] との報告がある。また、運動習慣が骨密度へ及ぼす影響を性別に検討した研究 [57] では、男性において 1 週間の運動の総時間と骨密度が正の関連を示したが、女性ではこの関連はみられなかった。その理由として女性の場合は、骨密度に影響するほどの負荷の高い運動をしていなかったことが指摘されている。男性で運動習慣のある群において骨密度が高値を示したのは、運動によるメカニカルストレスが一因であることが示唆された。本研究では運動の時間、種類、継続期間など

の調査を行っていないため、運動負荷が骨密度に及ぼす影響を明らかにすることはできなかつた。今後は運動に関するさらなる詳細な調査の必要性が示唆された。

本研究では、*VDR* 遺伝子多型は骨代謝マーカーとの間に有意な関連はみられなかつた。*VDR* 遺伝子多型と骨代謝マーカーとの関連を報告した研究は著者が知る限り見当たらない。一方、骨代謝マーカーと骨密度との有意な関連は、骨減少が認められる50歳以上の男性 [44] および閉経後女性 [41, 42] において確認されている。本研究の対象者は比較的若く、骨減少を反映していない集団であるため、有意な関連は認められなかつたのかもしれない。今後は骨減少を反映する集団を対象として *VDR* 遺伝子多型と骨代謝マーカーとの関連を調査する必要性が示唆された。



## 9. 結語

男性では過去の運動習慣が、女性では *VDR* 遺伝子多型が骨密度を規定する要因であるものと考えられた。また、骨密度に対する生活習慣の影響が *VDR* 遺伝子多型によって異なる可能性があることから、骨粗鬆症の予防には遺伝的背景を考慮した上で個人の体質に応じた保健指導を行うことが重要と考えられた。今後はこのような骨粗鬆症の遺伝的高リスク群に対してどのようなヘルスプロモーションを行っていくかが重要な課題であり、さらなる前向きコホート研究により食事や運動などの生活習慣要因との関連から骨代謝の経時的変化を考慮して検討していく必要性が示唆された。

## 10. 参考文献

1. Pocock, NA., Eisman, JA., Hopper JL, Yeates, MG., Sambrook, PN., and Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest.* 80: 706-710, 1987.
2. Tylavsky, FA., Bortz, AD., Hancock, RL., and Anderson, JJ. Familial resemblance of radial bone mass between premenopausal mothers and their college-age daughters. *Calcif Tissue Int.* 45: 265-272, 1989.
3. Morrison, NA., Qi, JC., Tokita, A., Kelly, PJ., Crofts, L., Nguyen, TV., Sambrook, PN., and Eisman, JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature.* 20: 284-287, 1994.
4. Ralston, SH. The genetics of osteoporosis. *OJM.* 90: 247-251, 1997.
5. Gong, G., Stern HS., Cheng, SC., Fong, N., Mordeson, J., Deng, HW., and Recker, RR. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int.* 9: 55-64, 1999.
6. Rubin, LA., Hawker, GA., Peltekova, VD., Fielding, LJ., Ridout, R., and Cole, DE. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res.* 14: 633-643, 1999.
7. McGuigan, FE., Murray, L., Gallagher, A., Davey-Smith, G., Neville, CE., Van't Hof, R., Boreham, C., and Ralston, SH. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women. *J Bone Miner Res.* 17: 1273-1279, 2002.
8. Fujita, Y., Katsumata, K., Unno, A., Tawa, T., and Tokita, A. Factors affecting peak bone density in Japanese women. *Calcif Tissue Int.* 64: 107-111, 1999.
9. Hayakawa, Y., Yanagi, H, Hara, S., Amagai, H., Endo, K., Hamaguchi, H., and Tomura, S.

- Genetic and environmental factors affection peak bone mass in premenopausal Japanese women. *Environ Health Prev Med.* 6: 177-183, 2001.
10. Orimo, H., Hayashi, Y., Fukunaga, M., Sone T., Fujiwara S., Shiraki M. Kushida K., Miyamoto, S., Soen, S., Nishimura, J., Oh-Hashi, Y., Hosoi, T., Gorai, I., Tanaka, H., Igai, T., and Kishimoto, H; Osteoporosis Diagnostic Criteria Review Committee: Japanese Society for Bone and Mineral Research. Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *J Bone Miner Metab.* 19: 331-337, 2001.
  11. 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ガイドライン (2004 年度版)」, *Osteoporos Jpn.* 12: 191-207, 2004.
  12. World Health Organization. Research on the menopause. *World Health Organ Tech Res Ser.* 670: 1-120, 1981.
  13. World Health Organization. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 866: 1-107, 1996.
  14. 岩崎寛和, 玉田太朗 「用語委員会報告 (「月経の定義」) に関する委員会提案理由)」 *日産婦誌*, 40: 814-815, 1998.
  15. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 94: 646-650, 1993.
  16. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 843: 1-129, 1994.
  17. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 285: 785-795, 2001.
  18. Albright, F., Smith, PH., and Richardson, AM. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *JAMA.* 116: 2465-2474, 1941.
  19. Riggs, BL and Melton, LJ, 3rd. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med.* 314:

- 1676-1686, 1986.
20. 吉村典子, 中塚喜義, 中村利孝 「骨粗鬆症の病型分類の考え方: Back to Albright.」, *Osteoporosis Jpn.*, 13: 5-11, 2005.
  21. Kanis, JA., Melton, LJ, 3rd., Christiansen, C., Johnston, CC., and Khaltayev, N. The Diagnosis of Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 9: 1137-1141, 1994.
  22. 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 (2000 年度改定版)」, 日本骨代謝学会雑誌, 8: 76-82, 2001.
  23. 山本逸雄 「骨粗鬆症人口の推定」, *Osteoporosis Japan*, 7: 10-11, 1999.
  24. 折茂肇, 八重樫由美, 小野田敏行, 福島靖正, 細井孝之, 坂田清美 「第 5 回大腿骨近位部骨折全国頻度調査成績—2007 年における新発生患者数の推定と 20 年間の推移—」, 日本医事新報, 4492: 73-77, 2010.
  25. Center, JR., Nguyen, TV., Schneider, D., Sambrook, PN., and Eisman, JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet.* 353: 878-882, 1999.
  26. Bliuc, D., Nguyen, ND., Milch, VE., Nguyen, TV., Eisman, JA., and Center, JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA.* 301: 513-521, 2009.
  27. 中村達彦 「鳥取県における大腿骨頸部骨折の疫学的研究」, 日整会雑誌, 67: 189-200, 1993.
  28. Ross, PD., Wasnich, RD., and Davis, JW. Fracture prediction models for osteoporosis prevention. *Bone.* 11: 327-331, 1990.
  29. Huopio, J., Kröger, H., Honkanen, R., Saarikoski, S., and Alhava E. Risk factors for perimenopausal fractures: a prospective study. *Osteoporosis Int.* 11: 219-227, 2000.
  30. Duppe, H., Gardsell, P., Nilsson, B., and Johnell O. A single bone density measurement can predict fractures over 25 years. *Calcif Tissue Int.* 60: 171-174, 1997.

31. Marshall, D., Johnell, O., and Wedel, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ*. 312: 1254-1259, 1996.
32. Fujiwara, S., Kasagi, F., Masunari, N., Naito, K., Suzuki, G., and Fukunaga, M. Fracture prediction from bone mineral density in Japanese men and women. *J Bone Miner Res*. 18: 1547-1553, 2003.
33. Mussolino, ME., Looker, AC., Madans, JH., Langlois, JA., and Orwoll, ES. Risk factors for hip fracture in white men: the NHANES 1 Epidemiologic Follow-up Study. *J Bone Miner Res*. 13: 918-924, 1998.
34. De, Laet, CE., Van, Hout, BA., Burger, H., Weel, AE., Hofman, A., and Pols, HA. Hip fracture prediction in elderly men and women: validation in the Rotterdam study. *J Bone Miner Res*. 13: 1587-1593, 1998.
35. Johnell, O., Kanis, JA., Oden, A., Johansson, H., De, Laet C., Delmas, P., Eisman, JA., Fujiwara, S., Kroger, H., Mellstrom, D., Meunier, PJ., Melton, LJ, 3 rd., O'Neill, T., Pols, H., Reeve, J., Silman, A., and Tenenhouse A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res*. 20: 1185-1194, 2005.
36. Garnero, P., Hausherr, E., Chapuy, MC., Marcelli, C., Grandjean, H., Muller, C., Cormier, C., Bréart, G., Meunier, PL., and Delmas, PD. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res*. 11: 1531-1538, 1996.
37. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., and Delmas, PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res*. 15: 1526-1536, 2000.
38. Ross, PD., Kress, BC., Parson, RE., Wasnich, RD., Armour, KA., and Mizrahi IA. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporos Int*. 11: 76-82, 2000.

39. 白木正孝 「閉経後婦人の骨折予後判定における骨代謝マーカーの意義」, *Osteoporosis Jpn*, 12: 52-55, 2004.
40. 吉村典子, 中塚喜義 「骨代謝マーカーによる骨粗鬆症及び骨粗鬆症性骨折の予測(報告)」, *Osteoporos Jpn*, 13: 903-910, 2005.
41. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Chapuy, MC., and Delmas, PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 11: 337-349, 1996.
42. Rogers, A., Hannon, RA., and Eastell, R. Biochemical markers as predictors of rates of bone loss after menopause. *J Bone Miner Res.* 15: 1398-1404, 2000.
43. 伊木雅之, 秋葉隆, 西野治身, 松本俊夫, 鏡森定信, 香川芳子, 松崎俊久, 米島秀夫, 丸茂文昭 (for JPOS Study Group) 「健常日本人女性における骨代謝マーカーによる骨密度変化の予測—JPOS Cohort Study—」, *Osteoporosis Jpn*, 10: 270-273, 2002.
44. 吉川邦彦 「日本人成人男性における骨密度の加齢変化: 骨代謝マーカーとの関連」, *川崎医学会誌*, 33: 35-42, 2007.
45. Soda, MY., Mizunuma, H., Honjo, S., Okano, H., Ibuki, Y., and Igarashi, M. Pre- and postmenopausal bone mineral density of the spine and proximal femur in Japanese women assessed by dual-energy x-ray absorptiometry: a cross-sectional study. *J Bone Miner Res.* 8: 183-189, 1993.
46. Zhang, HC., Kushida, K., Atsumi, K., Kin, K., and Nagano, A. Effects of age and menopause on spinal bone mineral density in Japanese women: a ten-year prospective study. *Calcif Tissue Int.* 70: 153-157, 2002.
47. Hagino, H., Yamamoto, K., Teshima, R., Kishimoto, H., and Kagawa, T. Radial bone mineral changes in pre- and postmenopausal healthy Japanese women: cross-sectional and longitudinal studies. *J Bone Miner Res.* 7: 147-152, 1992.

48. Nakamura, K., Tanaka, Y., Saitou, K., Nashimoto, M., and Yamamoto, M. Age and sex differences in the bone mineral density of the distal forearm based on health check-up data of 6343 Japanese. *Osteoporosis Int.* 11: 772-777, 2000.
49. Salamone, LM., Cauley, JA., Black, DM., Simkin-Silverman, L., Lang, W., Gregg, E., Palermo, L., Epstein, RS., Kuller, LH., and Wing, R. Effect of a lifestyle intervention on bone mineral density in premenopausal women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 70: 97-103, 1999.
50. Keen, RW. Effects of lifestyle interventions on bone health. *Lancet.* 354: 1923-1924, 1999.
51. Reid, IR. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone.* 31: 547-555, 2002.
52. Cui, R., Iso H., Toyoshima, H., Date, C., Yamamoto, A., Kikuchi, S., Kondo, T., Watanabe, Y., Koizumi, A., Wada, Y., Inaba, Y., and Tamakoshi, A; JACC Study Group. Body mass index and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC study. *Stroke.* 36: 1377-1382, 2005.
53. Kohrt, WM., Bloomfield, SA., Little, KD., Nelson, ME., and Yingling, VR; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Med Sci Sports Exerc.* 36: 1985-1996, 2004.
54. Kelley, GA., Kelley, KS., and Tran, ZV. Exercise and bone mineral density in men: a meta-analysis. *J Appl Physiol.* 88: 1730-1736, 2000.
55. Heinonen, A., Kannus, P., Sievänen, H., Oja, P., Pasanen, M., Rinne, M., Uusi-Rasi, K., and Vuori I. Randomised controlled trial of effect of high-impact exercise on selected risk factors for osteoporotic fractures. *Lancet.* 348: 1343-1347, 1996.
56. Sinaki, M., Wahner, HW., Bergstralh, EJ., Hodgson, SF., Offord, KP., Squires, RW., Swee, RG., and Kao, PC. Three-year controlled, randomized trial of the effect of

- dose-specified loading and strengthening exercise on bone mineral density of spine and femur in nonathletic, physically active women. *Bone*. 19: 233-244, 1996.
57. Högström, M., Nordström, A., Alfredson, H., Lorentzon, R., Thorsen, K., and Nordström P. Current physical activity is related to bone mineral density in males but not in females. *Int J Sports Med*. 28: 431-436, 2007.
58. Villareal, DT., Fontana, L., Weiss, EP., Racette, SB., Steger-May, K., Schechtman, KB., Klein, S., and Holloszy, JO. Bone mineral density response to caloric restriction-induced weight loss or exercise-induced weight loss: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*. 166: 2502-2510, 2006.
59. Sasaki, S and Yanagibori, R. Association between current nutrient intakes and bone mineral density at calcaneus in pre- and postmenopausal Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 47: 289-294, 2001.
60. Tucker, KL., Chen H., Hannan, MT., Cupples, LA., Wilson, PW., Felson, D., and Kiel, DP. Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr*. 76: 245-252, 2002.
61. Okubo, H., Sasaki, S., Horiguchi, H., Oguma, E., Miyamoto, K., Hosoi, Y., Kim, MK., and Kayama, F. Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen. *AM J Clin Nutr*. 83: 1185-1192, 2006.
62. Itoh, R., Nishiyama, N., and Suyama, Y. Dietary protein intake and urinary excretion of calcium: a cross-sectional study in a healthy Japanese population. *Am J Clin Nutr*. 67: 438-444, 1988.
63. Sellmeyer, DE., Stone, KL., Sebastian, A., and Cummings, SR. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increase the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Am J Clin Nutr*. 73: 118-122, 2001.



64. Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1-265, 2007.
65. Lorentzon, M., Mellström, D., Haug, E., and Ohlsson, C. Smoking is associated with lower bone mineral density and reduced cortical thickness in young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 497-503, 2007.
66. Hagiwara, S and Tsumura, K. Smoking as a risk factor for bone mineral density in the heel of Japanese men. *J Clin Densitom.* 2: 219-222, 1999.
67. Law, MR and Hackshaw, AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ.* 315: 841-846, 1997.
68. Felson, DT., Zhang, Y., Hannan, MT., Kannel, WB., and Kiel, DP. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 142: 485-492, 1995.
69. Berg, KM., Kunins, HV., Jackson, JL., Nahvi, S., Chaudhry, A., Harris, KA, Jr., Malik, R., and Arnsten, JH. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med.* 121: 406-418, 2008.
70. Haussler, MR., Whitfield, GK., Haussler, CA., Hsieh, JC., Thompson, PD., Selznick, SH., Dominguez, CE., and Jurutka, PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 13: 325-349, 1988.
71. Baker, AR., McDonnell, DP., Hughes, M., Crisp, TM., Mangelsdorf, DJ., Haussler, MR., Pike, JW., Shine, J., and O'Malley, BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 3294-3298, 1988.
72. Ralston, SH. Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Curr Opin Pharmacol.* 3: 286-290, 2003.
73. Spector, TD., Keen, RW., Arden, NK., Morrison, NA., Major, PL., Nguyen, TV., Kelly, PJ., Baker, JR., Sambrook, PN, and Lanchbury, JS. Influence of vitamin D receptor genotype

- on bone mineral density in postmenopausal women: a twin study in Britain. *BMJ*. 27: 1357-1360, 1995.
74. Tokita, A., Matsumoto, H., Morrison, NA., Tawa, T., Miura, Y., Fukamauchi, K., Mitsuhashi, N., Irimoto, M., Yamamori, S., Miura, M., Watanabe, T., Kuwabara, Y., Yabuta, K., and Eisman, JA. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 11: 1003-1009, 1996.
75. Arai, H., Miyamoto, K., Taketani, Y., Yamamoto, H., Iemori, Y., Morita, K., Tonai, T., Nishisho, T., Mori, S., and Takeda, E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*. 12: 915-921, 1997.
76. Salamone, LM., Glynn, NW., Black, DM., Ferrell, RE., Palermo, L., Epstein, RS., Kuller, LH., and Cauley, JA. Determinants of premenopausal bone mineral density: the interplay of genetic and lifestyle factors. *J Bone Miner Res*. 11: 1557-1565, 1996.
77. Dawson-Hughes, B., Harris, SS., and Finneran, S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 80: 3657-3661, 1995.
78. Kiel, DP., Myers, RH., Cupples, LA., Kong, XF., Zhu, XH., Ordovas, J., Schaefer, EJ., Felson, DT., Rush, D., Wilson, PW., Eisman, JA., and Holick, MF. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res*. 12: 1049-1057, 1997.
79. Keen, RW., Major, PL., Lanchbury, JS., and Spector, TD. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone loss. *Lancet*. 15: 990, 1995.
80. Riggs, BL., Nguyen, TV., Melton, LJ, 3rd., Morrison, NA., O'Fallon, WM., Kelly, PL., Egan, KS., Sambrook, PN., Muhs, JM., and Eisman, JA. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and

- osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 10: 991-996, 1995.
81. Cooper GS and Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res.* 11: 1841-1849, 1996.
82. Thakkinstian, A., D'Este, C., Eisman, J., Nguyen, T., and Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res.* 19: 419-428, 2004.
83. Thakkinstian, A., D'Este, C., and Attia, J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 15: 729-734, 2004.
84. 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」 2001 [cited 2009 Jan 24]; Available from: URL: <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/161228genomu.pdf>
85. Bouxsein, ML., Palermo, L., Yeung, C., and Black, DM. Digital X-ray radiogrammetry predicts hip, wrist and vertebral fracture risk in elderly women: a prospective analysis from the study of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 13: 358-365, 2002.
86. Nishizawa, Y., Nakamura, T., Ohta, H., Kushida, K., Gorai, I., Shiraki, M., Fukunaga, M., Hosoi, T., Miki, T., Chaki, O., Ichimura, S., Nakatsuka, K., and Miura M; Committee on the Guidelines for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis Japan Osteoporosis Society. Guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2004). *J Bone Miner Metab.* 23: 97-104, 2005.
87. Hamasaki, T., Inatomi, H., Katoh, T., Ikuyama, T., and Matsumoto T. Clinical and pathological significance of vitamin D receptor gene polymorphism for prostate cancer which is associated with a higher mortality in Japanese. *Endocr J.* 48: 543-549, 2001.
88. Borm, GF., Fransen, J., and Lemmens, WA. A simple sample size formula for analysis of covariance in randomized clinical trials. *J Clin Epidemiol.* 60: 1234-1238, 2007.
89. Morrion, NA., Shine, J., Fragonas, JC., Verkest, V., McMenemy, ML., and Eisman JA.

- 1.25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science*. 246: 1158-1161, 1989.
90. Ilich, JZ and Kerstetter, JE. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J Am Coll Nutr*. 19: 715-737, 2000.
91. 健康・栄養情報研究会編 「国民栄養の現状 平成13年国民栄養調査結果」 第一出版, 2002. pp. 106.
92. Yaegashi, Y., Onoda, T., Tanno, K., Kuribayashi, T., Sakata, K., and Orimo, H. Association of hip fracture incidence and intake of calcium, magnesium, vitamin D, and vitamin K. *Eur J Epidemiol*. 23: 219-225, 2008.
93. Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr*. 35: 783-808, 1982.
94. Krall EA and Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decrease intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res*. 14: 215-220, 1999.
95. Laaksi, I., Ruohola, JP., Tuohimaa, P., Auvinen, A., Haataja, R., Pihlajamäki H., and Ylikomi, T. An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am J Clin Nutr*. 86: 714-717, 2007.
96. Brot, C., Jorgensen, NR., and Sorensen, OH. The influence of smoking on vitamin D status and calcium metabolism. *Eur J Clin Nutr*. 53: 920-926, 1999.
97. Heaney, RP., Abrams S., Dawson-Hughes, B., Looker, A, Marcus, R., Matkovic, V., and Weaver, C. Peak bone mass. *Osteoporosis Int*. 11: 985-1009, 2000.
98. Bjørneboe, GE., Bjørneboe, A., Johnsen, J., Skyllv, N., Oftebro, H., Gautvik, KM., Høiseth, A., Mørland, J., and Drevon, CA. Calcium status and calcium-regulating hormones in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 12: 229-232, 1988.
99. Clark, K and Sowers, MR. Alcohol dependence, smoking status, reproductive characteristics, and bone mineral density in premenopausal women. *Res Nurs Health*. 19:

399-408, 1996.

100. Friday, KE and Howard, GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*. 40: 562-565, 1991.
101. Frezza, M., di Padova, C., Pozzato, G., Terpin, M., Baraona, E., and Lieber, CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med*. 322: 95-99, 1990.
102. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会. 代表 折茂肇 「骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン」, 東京: ライフサイエンス出版, 2006. pp. 34, 38.
103. Tamaki, J., Ikeda, Y., Morita, A., Sato, Y., Naka, H., and Iki, M. Which element of physical activity is more important for determining bone growth in Japanese children and adolescents: the degree of impact, the period, the frequency, or the daily duration of physical activity? *J Bone Miner Metab*. 26: 366-372, 2008.
104. Karlsson, MK. Physical activity, skeletal health and fractures in a long term perspective. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 4: 12-21, 2004.
105. Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, SR., Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt DT., and Noda M. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*. 18: 1706-1715, 2003.