

2) 糖尿病モデルラットを用いた抗糖尿病作用の評価方法

(独) 農研機構 果樹研究所 杉浦 実

はじめに

内分泌系疾患である糖尿病とは、糖代謝の異常によって起こるとされ、血液中のブドウ糖濃度が病的に高まることによって、様々な特徴的な合併症（網膜症・腎障害・神経障害・動脈硬化など）をきたす病気である。日本国内においても近年急激に増加しており、平成 14 年度の糖尿病実態調査では、「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性を否定できない人」をあわせると 1620 万人にも上ると推計されている。糖尿病には 1 型と 2 型があるが、日本人の糖尿病の 9 割以上は 2 型糖尿病であり、その発症には生活習慣が深く関与している。食事によって体内に摂取された糖質は小腸で分解されてブドウ糖となり、その後吸収される。ブドウ糖は身体活動のためのエネルギー源として利用されるが、すぐに利用されるものを除いては血液中に溶け込んで（血糖となって）、肝臓や筋肉や脂肪組織に運ばれ、そこで貯蔵される。そして、ブドウ糖が不足したときに再び取り出されてエネルギー源として利用される。このように糖質がエネルギーになるプロセスを糖代謝というが、その鍵を握っているのが膵臓から分泌されるインスリンである。インスリンは細胞側にあるインスリン受容体と結びつくことで、ブドウ糖を肝臓や筋肉や脂肪組織に取り込ませるように働く。糖尿病とは、この糖代謝のプロセスやシステムが正常に作動しないために起こってくる病気である。糖尿病における病態の悪化の抑制には血糖のコントロールが不可欠であり、血糖値のコントロールが悪いと、やがて糖尿病性合併症の進展につながる。本稿では、このような糖尿病に対する予防や改善効果を有する食品（食品成分）を評価するうえで、一次スクリーニング試験として汎用されるラットを用いた糖負荷試験の方法について解説する。

糖尿病モデル動物

目的とする食品（食品成分）の抗糖尿病作用を評価する上で、どのような作用を期待するかで用いる動物を選択する必要がある（表 1）。糖尿病モデル動物は 1 型モデルと 2 型モデルに大きく分かれるが、1 型糖尿病モデルラットはストレプトゾトシンやアロキ酸をラットの静脈内や腹腔内に投与することで、インスリン依存型の 1 型糖尿病モデルを誘発させることができる。一方、日本人の糖尿病患者の多くがインスリン非依存型の 2 型糖尿病であるが、2 型糖尿病モデルとしては Goto-kakizaki (GK) ラット等がある。実験の目的により、適切なモデルラットを選択する必要があるが、

表 1 主な糖尿病モデル動物とその特徴

タイプ	動物	主な特徴
1型	NOD マウス	白内障マウスを近交系化する過程で見出された。5 週齢からラ氏島への免疫担当細胞の浸潤が認められ、12 週齢以降に糖尿病を発症する。
	STZ ラット	Wistar系等の正常ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与して作成する。β 細胞の破壊によるインスリン分泌不全および高血糖を示す。STZ 投与量によって病態を調節可能である。
非肥満 2型	N-STZ ラット	1-2 日齢の新生児期のラット (Neonatal) に STZ を投与して作成する。インスリン分泌能低下による軽度の空腹時高血糖および耐糖能悪化を特徴とする。
	GK ラット	非近交系の Wistar ラットから耐糖能低下を指標に選抜交配して作成された。インスリン分泌能低下による空腹時高血糖および耐糖能悪化を示す。
肥満 2型	ob/ob マウス	レプチン遺伝子異常のインスリン抵抗性モデル。過食、肥満を引き起こし高血糖、高インスリン血症を示す。
	db/db マウス	レプチン受容体異常のインスリン抵抗性モデル。肥満、高血糖、高インスリン血症を示すが、加齢に伴いインスリン分泌能の低下を認める。
	KKAyマウス	耐糖能の悪化が認められる KK マウスに Ay 遺伝子を導入して確立されたインスリン抵抗性モデル。過食、肥満、高血糖、高インスリン血症を示す。
	Zucker fatty ラット	劣性の fa 遺伝子に由来するレプチン受容体異常モデル。過食、肥満であるが通常は正常血糖であり、前糖尿病状態である耐糖能異常モデルとしても位置付けされる。
	ZDF ラット	Zucker fatty ラットの選択交配によって確立された自然発症糖尿病モデル。過食、肥満、高血糖、高インスリン血症、インスリン抵抗性を示すが、加齢に伴いインスリン分泌能の低下を認める。
	Wistar Fatty ラット	耐糖能の障害が認められる Wistar kyoto ラットに Zucker fatty ラットの fa 遺伝子を導入して確立したインスリン抵抗性モデル。過食、肥満、高血糖、高インスリン血症を示す。

一般には血糖値の正常化作用を検討する場合には 2 型糖尿病モデルラットを用い、ストレプトゾトシン誘発性の 1 型糖尿病モデルラットは糖尿病性合併症に対する有効性を検証する際に用いられることが多い。何故ならストレプトゾトシン等の薬物誘発性 1 型糖尿病モデルラットでは、重篤な高血糖状態を呈するため、このようなモデル動物を用いて食品（食品成分）の血糖正常化作用を評価することは現実的ではない。糖尿病治療薬を開発する上での薬効評価では 1 型モデルも用いられるが、食品（食品成分）による抗糖尿病作用を期待するのなら、合併症を発症するほどの重篤な糖尿病モデル動物を使うよりも、高血糖状態が比較的軽度で糖負荷後の血糖上昇が顕著なモデルを用いた方が良い。また糖尿病の 3 大合併症として神経障害・腎障害・網膜症があるが、これらはいずれも慢性的な高血糖状態が続くことにより、血管内皮細胞が障害を受けることにより発症すると考えられている。そのため糖尿病性合併症に対する有効性を評価する際には、より合併症を発症しやすいモデルとしてストレプトゾトシン誘発性の 1 型糖尿病モデル動物等を用いる必要がある。

血糖上昇抑制を検討する際には、まず Wistar 系のような正常ラットを用いて糖負荷試験を行う。これは腸管からの糖の吸収抑制作用を評価する際に汎用される。また負荷する糖をブドウ糖かショ糖かを選択することで、後者の場合には糖の吸収抑制だけでなく、腸管における α-グルコシダーゼの阻害作用も同時に評価することができる。

また正常ラットを用いた急性的な作用を検討した後に、次に慢性投与による血糖正常化作用を検討する場合、GK ラット等の 2 型糖尿病モデルに被験物を慢性投与した後糖負荷試験を行うことで、糖負荷後のインスリン分泌不全やインスリン感受性が改善されるかを評価することができる。

プロトコール

1. 被験物の投与

目的とする食品あるいは食品成分の血糖上昇抑制作用を評価する際に急性的な作用を検討するのか、慢性的な作用を検討するのかでそれぞれ実験計画を立てる必要がある。急性的な作用を期待する場合は、通常は糖を負荷する前に被験物をあらかじめ投与しておき、糖負荷後の血糖値の変化を測定する。この場合、主に糖の吸収抑制を評価することになるため、糖尿病モデルラットを用いなくても Wistar 系ラット等の正常動物を用いれば良い。また被験物そのものが血糖値に影響するかどうかあらかじめ確認する必要がある。実験スケジュールの一例を図 1 に示す。一方、評価したい食品（食品成分）を慢性投与することで糖代謝にどのような影響を及ぼすかを評価する場合、数日から数週間に渡り被験物をラットに投与する。飼料や飲料水に一定濃度の被験物を混入して自由摂取させるか、あるいは毎日一定量をゾンデで強制経口投与する。慢性投与する場合の投与方法は被験物の量的な問題や安定性、また溶解性など様々なことを考慮して決める必要がある。一定期間の慢性投与の後、以下の糖負荷試験を行う。

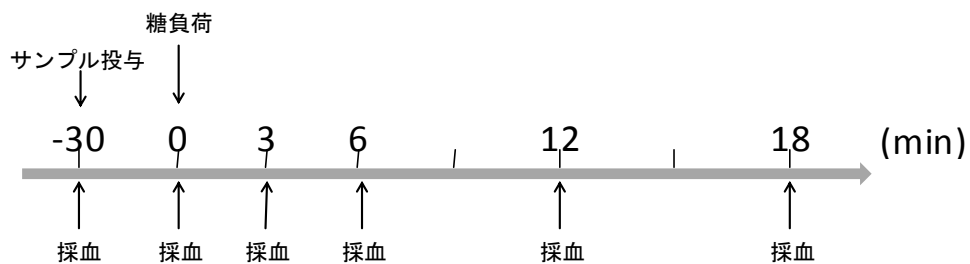


図 1 薬物投与と採血スケジュール（一例）

2. 糖の負荷

ラットに糖を負荷する際は、生理食塩水（0.9% NaCl）で調整したブドウ糖をラットの体重 kg 当たり 2g の用量でゾンデを用いて投与する。経口投与する容量は体重 kg 当たり 10ml になるように調製する。ショ糖を用いる場合には体重 kg 当たり 2~4g を投与する。またブドウ糖液を経口投与ではなく腹腔内投与すると、ブドウ糖は腸管からの吸収を経ずに門脈経由で体循環血流に乗る。そのため被験

物の血糖上昇抑制作用が腸管での糖の吸収抑制かどうかを判断することができる。即ち経口ブドウ糖負荷試験では効果が認められたのに腹腔内ブドウ糖負荷試験で効果が認められなかった場合には、主に糖の吸収抑制作用によるものであったと判断できる。腹腔内投与はラットの場合、21～25G の注射針を用いて投与する。投与用量はラットでは経口投与の場合は体重 kg 当たり 10ml、腹腔内投与の場合も 10ml が一般的であるが、経口投与の場合は 20～40ml、腹腔内投与で 20ml 位までの投与が可能である。ただし容量が多くなるほど、投与する糖液の濃度は下がるため、血糖値の上昇度合いも当然ながら異なってくる。そのため再現性を得るためにも投与する薬液の濃度は一定にした方がよい。

3. 採血方法

糖負荷試験を行う場合は経時的に採血し、血糖値の変化を測定する必要がある。ラットから採血出来る部位としては、頸静脈・外側足根静脈・大腿静脈・舌下静脈眼窩静脈叢などがあるが、麻酔を必要とせず繰り返し採血しやすい部位として尾静脈がよく用いられる。ラットの尾には背側・腹側の上下に動脈、左右の両側に静脈が走っている(図2)。採血は、外側尾静脈より注射針の付いた注射筒を用いて行うか、カミソリ等で尾静脈を浅く切り込む。麻酔は不要であり、そのため、この採血経路は特に反復採血に適している。採血後は切った箇所を圧迫することで止血することができる。全血で 100 μ l ほどの採血が可能である。採血した血液は目的に応じた処理方法でエッペンチューブ等に入れる。最初の採血は心臓から遠い尾の先端側から採血し、2回目は1回目の採血部位よりも上部(心臓に近い方向)の反対側の静脈から採血を行う(図3)。3回目以降も順次左右の静脈を交互に切り採血を行う。このようにすれば一匹のラットから 10 回程度の反復採血が可能となる。ラットの尾静脈からの採血で注意しなくてはならないことは深く切りすぎないことである。動脈にまで達するほど深く切りすぎてしまうと動脈血が溢れ出て止血が困難になる場合がある。

採取した血液はそのまま放っておくと血球細胞により血糖が消費されるため、直ちにフッ化ナトリウム等の解糖阻止剤を用いるか過塩素酸で処理する必要がある。あるいは氷冷することで解糖が進むのを抑える。ただし採取した血液はそのままでは凝固が進むので、ヘパリンで血液凝固を阻止し、その後は速やかに遠心操作により血漿を分離する必要がある。

またフッ化ナトリウムや過塩素酸で処理した血液試料は血糖値のみの測定にしか使えないため、インスリン等のサイトカインを測定する場合には血漿か血清を得るための処理を行わなければならない。

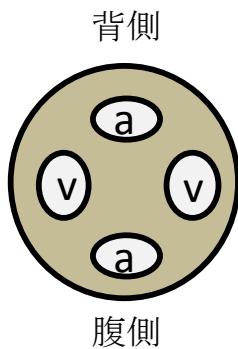


図2 ラット尾の血管配置
(a: 動脈, v: 静脈)

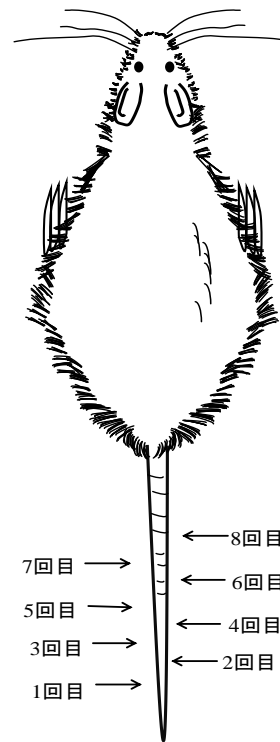


図3 ラット尾静脈からの採血方法
心臓から遠い部位の尾静脈から
左右交互に切り進めて採血を行う。

4. 血糖値の測定

次に上述した方法でサンプリングした血液試料を用いて血糖値を測定する方法であるが、現在、簡便に血糖値を測定する種々の方法がある。一般に臨床検査分野で用いられる測定は、ATP の存在下でヘキソキナーゼ (HK) の作用によりアデノシン-5'-二リン酸 (ADP) 及びグルコース-6-リン酸を生成し、更にその後、グルコース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) 及び NADP との反応によって生成した NADPH の 340nm における吸光度の増加を測定し、グルコース量を求める。自動分析装置と専用の試薬を用いることで簡便に血糖値の測定は可能である。一方、自動分析装置が無くても、分光光度計があれば市販の測定キットを用いれば可能である。またより簡便に行う方法として、糖尿病患者が自分で血糖値を測定するために開発された、携帯型自己血糖値測定器を用いることも可能である。この方法だと 10 マイクロリットルほどの全血で済むので、ラットの尾静脈から僅かに出血させた血液で直ちに血糖値を測定することができる。

5. サイトカイン類の測定

インスリンは膵臓ランゲルハンス島 (膵島) の β 細胞から分泌されるペプチドホルモン的一种で、主として炭水化物の代謝を調整する。骨格筋におけるブドウ糖、

アミノ酸、カリウムの取り込み促進とタンパク質合成の促進、肝臓における糖新生の抑制、グリコーゲンの合成促進・分解抑制、脂肪組織における糖の取り込みと利用促進、脂肪の合成促進・分解抑制など、全体として異化を抑制して各種貯蔵物質の新生を促進する働きがある。インスリンの他に糖代謝を調整するホルモンとしてグルカゴンがある。グルカゴンはインスリンとは逆に貯蔵燃料を動員する異化ホルモンであり、膵臓ランゲルハンス島の A 細胞(α 細胞)で生合成、分泌される。食品(食品成分)の抗糖尿病作用を検討する際に、血糖値とともにこれらのペプチドホルモンの血中濃度を測定することは重要である。これらサイトカイン類の測定は、現在、モノクローナル抗体をプレートに固相化した様々な測定キットが市販されており、血漿あるいは血清を用いた測定が簡便に行える。

実施例：ミカンエキスを GK ラットに慢性投与した後のブドウ糖腹腔内負荷試験

最後に一例として我々が行った GK ラットを用いた糖負荷試験の実施例を紹介する。これまでの疫学研究の結果から、ミカンが糖尿病をはじめとする様々な生活習慣病の予防に有効である可能性が見出されており、またこれら生活習慣病とミカン摂取との関連は幾つかの動物実験においてもその有効性が確認されている。そこで GK ラットの耐糖能に及ぼすミカンの効果を検討した。5 週齢の GK ラットにミカンエキスを添加した飼料を自由摂取させ、実験開始 5 及び 10 週後にブドウ糖腹腔内負荷試験を行った。図 4 に飼育期間中の体重変化、図 5 に非絶食状態での血糖値変化を示した。ミカンエキスを投与した群においては糖尿病対照群(GK ラット)と比べて体重の変化に差は認められなかった。非絶食状態での血糖値は、糖尿病対照群においては緩慢な血糖値上昇が観察されたが、ミカンエキス投与群においては血糖値の上昇が抑えられる傾向が観られ、投与開始 10 週後において有意な血糖値の上昇抑制効果が認められた。また投与開始 5 及び 10 週後のブドウ糖腹腔内負荷試験では、5 週後の試験では有意な血糖値の上昇抑制作用は認められなかったが、10 週後の試験において、ブドウ糖負荷 30 分後の血糖値の上昇が糖尿病対照群に比べて有意に抑制された。この試験においては、実験開始時から GK ラットの非絶食状態での血糖値は正常群に比べて有意に高値を示したが、その後も血糖値は緩慢に上昇し続けた。糖負荷試験においては飼育開始 5 週後よりも 10 週後の方が糖負荷後の血糖上昇は大きかった。ミカンエキスの効果は 5 週後では効果が認められなかったものの、10 週後の試験において有意な血糖値の上昇抑制が認められた。このことから、食品(食品成分)の有用性を見出すためには投与期間の設定が重要な要因になるものと考えられる。

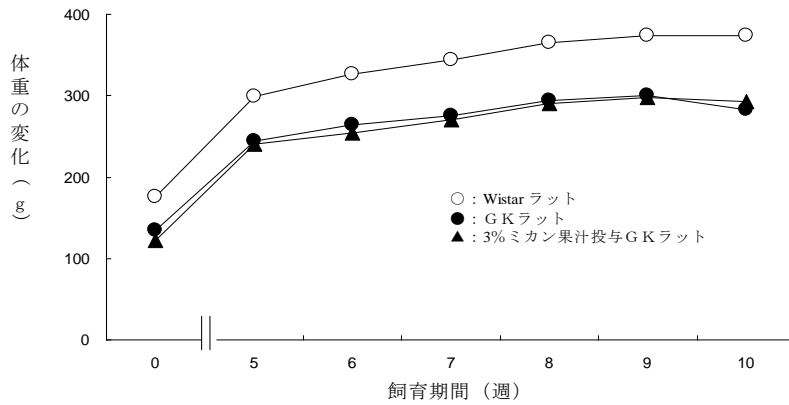


図 4 GK (Goto-kakizaki) ラットの体重変化

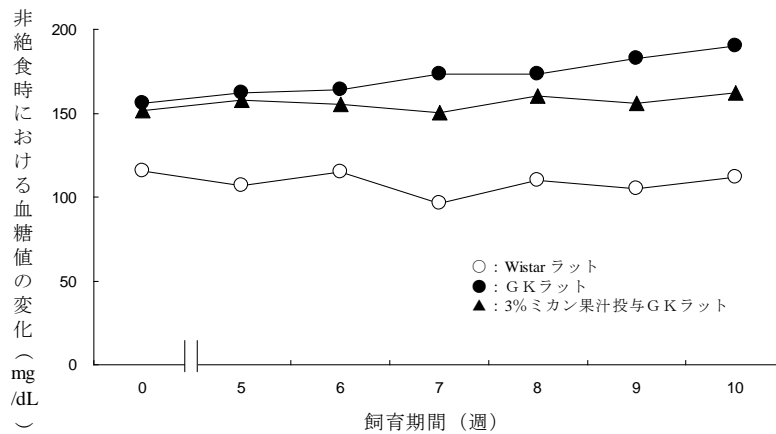


図 5 GK (Goto-kakizaki) ラットの非摂食時血糖値に及ぼすミカンエキスの効果

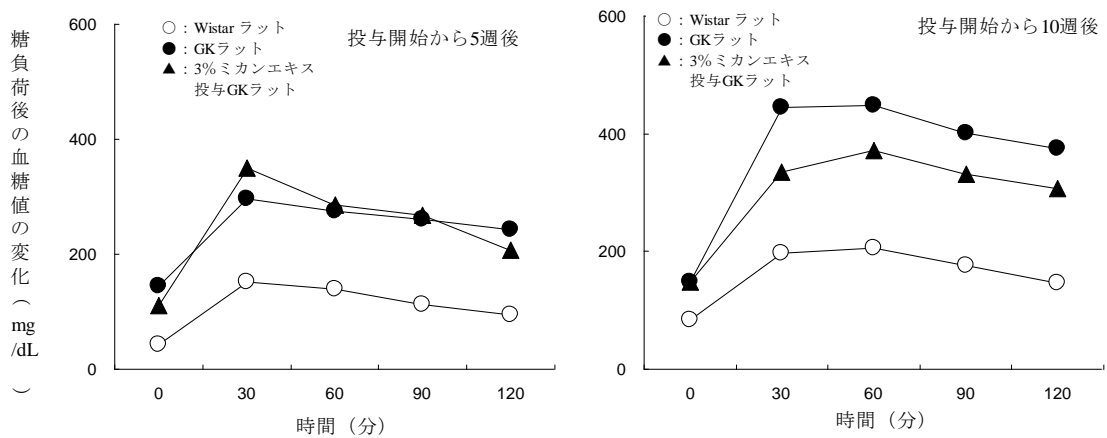


図 6 GK (Goto-kakizaki) ラットの耐糖能に及ぼすミカンエキス (3%) の効果
 : 腹腔内ブドウ糖負荷試験

おわりに

以上、紹介した糖負荷試験は、食品（食品成分）の抗糖尿病作用を検討するための一次スクリーニングとして有用な評価試験である。正常ラットを用いた糖負荷試験、あるいは 2 型糖尿病モデルラットを用いた検討により、目的とする食品（食品成分）に抗糖尿病作用が認められれば、次にどのようなメカニズムによるものなのかを詳細に検討する必要がある。インスリンの合成分泌促進作用によるものなのか、あるいは末梢でのインスリン感受性改善作用なのか、これらを検討する上での評価手法は多くの正書があるので参照されたい。現在、2 型糖尿病の発症過程に酸化ストレスの関与が指摘されている。そのためビタミン・カロテノイド・フラボノイド類等の抗酸化物質が豊富な果物・野菜を恒常的に摂取することは 2 型糖尿病の発症予防に有効と考えられ、このことは多くの疫学研究の結果からも支持されている。糖尿病治療薬には、インスリン分泌促進薬としてスルフォニルウレア剤、フェニールアラニン誘導体、ブドウ糖吸収阻害薬としては α -グルコシダーゼ阻害剤、インシュリン抵抗性改善薬としてはビッグアニド剤、チアゾリジン系誘導体が知られているが³⁾、これらの薬物治療とは別に、抗酸化物質の豊富な食品を毎日豊富に摂取することが糖尿病の予防改善において大きなストラテジーになるものと期待される。薬物作用とは異なる抗糖尿病効果を食品（食品成分）に期待するには、それに合った評価方法を用いることが肝要である。急性的な効果よりも慢性投与による効果、また 1 型糖尿病モデルよりも GK ラットのような 2 型糖尿病モデルを用いて評価することが重要と考えられる。

参考文献

- 1) 平成 14 年度糖尿病実態調査,
http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk_4_2.html
- 2) 武内浩二, 鈴木伸宏, 小高裕之, 糖尿病治療薬の基礎-糖尿病モデル動物と糖尿病治療薬の開発-, 日薬理誌, 128, 37-41 (2006).
- 3) 糖尿病 病因論・診断, 治療の新展開, 最新医学(最新医学社, 東京) (2000).
- 4) Sugiura, M., Ogawa, K. and Yano, M., Effect of chronic administration of fruit extract (*Citrus unshiu* Marc.) on glucose tolerance in GK rats, a model of type 2 diabetes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**, 293-295 (2006).

5. ヒト試験法

1) 疫学調査研究の実際

(独) 農研機構 果樹研究所 杉浦 実

はじめに

疫学とは、実験動物や培養細胞ではなく、実際の人口集団を対象として、疾病とその規定要因との関連を明らかにする科学であり、明確に規定された人間集団の中で出現する健康関連のいろいろな事象の頻度と分布およびそれらに影響を与える要因を明らかにして、健康関連の諸問題に対する有効な対策樹立に役立てることを目的とする。

近年、食品の健康機能性に関する研究が大きく伸展し、様々な食品やこれらの食品に含有される機能性成分の疾病予防効果が次々に明らかにされている。しかしながら培養細胞や実験動物等を用いた実験研究で得られたデータのみでは、これら食品の摂取が疾病予防に本当に効果が期待出来るかは未知数である。人が普段の食生活から日常的に摂取する食品がどのような健康効果を有するかを明らかにするためには、最終的には直接ヒトを対象とした栄養疫学調査や無作為割付臨床試験が必要になってくる。ヒト介入研究では特定の食品やあるいは有る食品成分をサプリメントにしてその効果を検討した研究報告があるが、横断研究や症例対照研究、追跡研究（コホート研究）などの多くの観察研究といわれる疫学調査では、果物や野菜といったように比較的大きな範疇での食品群として解析され、これら食品群の摂取量とアウトプットとしての健康指標（有病率や罹患率、死亡率、あるいは検査値など）との関連が解析されている。どのような食品（群）あるいはこれらに含まれる栄養素や機能性成分がどのような健康影響を及ぼすかを栄養疫学的に精度高く解析出来るかは食行動調査において用いる調査手法に依存するが、ある食品（群）の摂取量を反映する特徴的な生体指標（バイオマーカー）があれば健康指標との関連を解析するにあたり、より詳細で信頼性の高いデータを得ることが可能になることもある。

疫学研究のデザイン

疫学研究のデザインには大きく分けると、表 1 に示すように地域相関研究・断面研究・症例対照研究・コホート研究・無作為割付臨床試験（介入研究）などがあり、因果関係を明らかに出来るという点においては一般にコホート研究や介入研究ほど信頼性の高い情報が得られると考えられる。また研究の規模や調査の精度により評価は異なる。

表 1 疫学研究のデザイン

	無作為割付 臨床試験	前向き コホート研究	後ろ向き コホート研究	症例対照研究	コホート内症例 対照研究	断面研究	地域相関研究
概要	対象者を無作為に介入群と対照群に分け、栄養補助剤の投与や栄養指導を行い、対照群にはプラセボの投与や栄養指導無しで経過観察を行う。両群を一定期間追跡調査し、疾病の罹患率や死亡率を比較する。	健康な集団の日常的な食生活を調査し、その後一定期間追跡調査を行い、疾病の罹患率や死亡率を確認する。調査しようとする食品や栄養素の摂取量が多い集団と少ない集団とで罹患率や死亡率を比較する。	特定の要因(ダニオキシンや環境ホルモンなど)に高濃度に曝露した集団を対象に追跡調査を行い、疾病の罹患率や死亡率を確認する。対象集団の疾病発症頻度を性別や年齢分布が等しい一般集団での期待値と比較する。	疾病に罹患した症例群と性別・年齢などをマッチさせた健常者からなる対照群を選び、過去の日常的な食生活を調査し両群で比較する。	前向きコホート研究の参加者から血液などの生体試料を採取保管しておき、追跡調査で疾病の罹患や死亡を確認した症例群と健常である対照群の生体試料を測定し、血中濃度などを測定比較する。	疾病の有無と曝露要因を同時に調査し比較する。	国や地域などの集団を対象に食品や栄養素の消費量・摂取量と疾病の罹患率・死亡率との関連を調査する。
研究の単位	個人	個人	個人	個人	個人	個人	集団
疾病頻度の指標	罹患率・死亡率	罹患率・死亡率	罹患率・死亡率	疾病頻度は比較出来ない	疾病頻度は比較出来ない	有病率	罹患率・死亡率
関連性の指標	相対危険度	相対危険度	標準化死亡比など	オッズ比	オッズ比	オッズ比	相関係数・回帰係数
長所	バイアスと交絡の影響が最も少なく、曝露要因と疾病との因果関係について最も信頼性の高い情報が得られる。	疾病に罹患する前に調査するので、思い出しバイアスの影響を受けず、栄養と疾病の時間的前後関係を正しく評価出来る。	疾病に罹患する前の曝露要因を調査するので、曝露と疾病の時間的前後関係を正しく評価出来る。	比較的簡単に調査が行える。追跡調査が不要	コホート研究の一部の参加者の生体試料を分析するのみでよい。疾病に罹患する前の曝露要因を調査するので、曝露と疾病の時間的前後関係を正しく評価出来る。	比較的簡単に調査が行える。追跡調査が不要	比較的簡単に調査が行える。追跡調査が不要
短所	費用と時間がかかる。数年から数十年の追跡調査が必要。無作為割付が困難な場合がある。	費用と時間がかかる。数年から数十年の追跡調査が必要。	数年から数十年の追跡調査が必要。個人の曝露要因を定量的に評価出来ないことが多い。交絡要因の影響を十分に制御できないことが多い。	思い出しバイアスの影響を受ける。症例と特性のそろった対象を選択することが困難な場合がある。	費用と手間がかかる。数年から数十年の追跡調査が必要。	疾病の有無と曝露要因を同時に調べるので両者の時間的前後関係を正しく評価できない。	交絡要因の影響を受けやすい。集団の結果を個人に適用できるとは限らない。

南江堂「栄養疫学」坪野吉孝・久道茂 共著より抜粋改変。バイアス：バイアスとは、曝露要因と疾病との実際の関連を過大評価したり過小評価したりして、謝った研究結果を導いてしまう現象をいう。バイアスには様々な要因があるが、大きくは情報バイアスと選択バイアスに大別される。交絡：交絡とは曝露要因と疾病との関連性が第三の要因の影響によって過大評価されたり過小評価されたりする現象をいう。相対危険度：相対危険度は曝露要因がある場合と無い場合（または曝露要因が多い場合と少ない場合）の疾病リスクの比である。通常は罹患率の比で表される。オッズ比：オッズ比は曝露要因がある場合と無い場合（または曝露要因が多い場合と少ない場合）の疾病リスクの比の近似値である。オッズ比は罹患率を直接測定出来ない症例対照研究や断面研究で用いられる。無作為割付臨床試験や前向きコホート研究における相対危険度に相当する。

現在、国内外を含めて非常にたくさんの疫学研究が行われているが、食と健康との関連に着目した栄養疫学研究も日本国内で多く行われている。疫学研究では調査を始めるにあたり、集団の設定や調査方法など研究デザインに関わる多くの重要なことをよく練らなければならない。どの様な集団をどのような方法で調査するのか、また得られた結果は母集団を反映するものなのか、つまり研究成果を

平均的な日本人に当てはめて考えられるのか等である。通常、栄養疫学研究ではある特定の食品に焦点を当て、その食品の健康効果を疫学的に検出しようとすることはあまり無く、多くは食品群としての解析が行われる。近年では緑茶や大豆に着目した解析結果が多く報告されるようになってきたが、これらの研究は緑茶や大豆の摂取量が特に多い集団を設定して、研究が行われたというものではない。

現在、果樹研究所ではミカンの健康効果をヒトレベルで検証することを目的として、国内のミカン主要産地である静岡県内の住民を対象にした栄養疫学調査を実施している。近年の日本国内におけるミカンの摂取量を考えると、平均的な日本人を反映する集団では、ミカンの健康影響を疫学的に検出するのは難しいであろう。その点、静岡のようなミカン産地では、殆ど食べない人からミカンシーズンになると毎日たくさん食べる人まで幅広く分布している。このような地域住民を疫学研究の調査対象集団に設定すれば、ミカンの有用性を疫学的に検出できることは十分期待できる。ミカンをたくさん食べている集団という点においては、偏った集団ではあるが、食品の機能性を疫学的に検出するためには有効な手段といえる。

疾病頻度の指標

食品や栄養素の摂取状況と疾病との関連を明らかにするためには、調査対象にした人口集団から発生する疾病の頻度を解析し、調べようとしている食品や栄養素の摂取量をもとに層別化して、各摂取量で発生する疾病の頻度を比較することで検討を行う。最も一般的な疾病頻度の指標としては、有病率 (Prevalence)、罹患率 (Incidence)、死亡率 (Mortality) がある。

有病率と罹患率はそれぞれ以下の式で表される。

$$\text{有病率} = \frac{\text{ある一時点で既に病気に罹っている人の人数}}{\text{集団の人数}}$$

$$\text{罹患率} = \frac{\text{集団から一定期間に新たに発生する患者の数}}{\text{集団の観察人年数}}$$

有病率はある一時点での有病者の割合を示し、これは「病気になった人数」ではなく「病気にかかっている人数」を表す。これに対し、罹患率は集団から一定期間に新たに発生する患者の数であり、病気に罹る割合を示す指標である。罹患率はコホート研究の結果から導き出される指標であるため、横断研究の解析結果である有病率とは結果の意味が大きく異なる。罹患率を求める際に用いる観察人年とは 1 人を 1 年間観察すれば 1 人年に相当する。10 人を 10 年間観察しても 5

人を 20 年間観察しても 100 人年に相当することになる。また罹患率を求める際の分母として観察人年ではなく、観察開始時の集団の人数を用いる場合を累積罹患率といい、例えば 1 万人の集団を 10 年間観察したところ 15 人の胃がんが発症したとすれば、この集団での胃がんの 10 年累積罹患率は 15 人/1 万人で 0.15% となる。罹患率の単位は対年 (/year) で表されるが、累積罹患率の場合、単位は無名数である。このため累積罹患率では〇年間での累積罹患率というように観察期間を定義して表す必要がある。

関連性の指標

調査の対象とする集団の中で一定期間にある疾病に罹患する確立や死亡する確率、あるいは調査した一時点での罹患している割合をリスクという。食品や栄養素の摂取状況（暴露要因）と疾病との関連性を明らかにするためには、暴露要因である食品や栄養素の摂取量が多い場合と少ない場合で疾病のリスクを比較することで検討を行う。このときに用いる代表的な指標として、オッズ比 (odds ratio: OR) や相対危険度 (relative risk: RR) がある。

オッズとはある出来事が発生しない確率に対する発生する確率の比を示し、オッズ比は二つのオッズの比を現す。オッズ比は暴露要因がある場合と無い場合（または多い場合と少ない場合）の疾病リスクの比の近似値である。オッズ比は罹患率を測定できない症例対照研究や有病率を疾病頻度の指標とする横断研究で用いられる指標である。例えばある目的とする食品（栄養素）の摂取量が少ない 1000 人のグループ A での有病者数が 50 人であるのに対し、摂取量が多い 800 人のグループ B での有病者数が 16 人であったとすると、グループ A に対するグループ B のオッズ比は

$$\text{オッズ比} = \frac{\text{グループ B での疾病リスク (16 人/800 人) 人}}{\text{グループ A での疾病リスク (50 人/1000 人)}}$$

で表され、0.4 となる。すなわちその食品（栄養素）をたくさん食べているグループではあまり食べていないグループに比べてリスクが 60% 低いという計算結果になる。

相対危険度は暴露要因がある場合と無い場合（または多い場合と少ない場合）の疾病リスクの比である。この場合は罹患率の比で表される。相対危険度は集団の罹患率を測定することが出来る前向きコホート研究や無作為割付臨床試験で用いられる指標である。

疫学研究の結果の因果関係について

実際にある人口集団を対象にして疫学調査を行い、例えば目的とする食品（栄

養素) の摂取量が多いグループでの糖尿病の発症率が摂取量の少ないグループに比べて有意に低い結果が得られたとしよう。この結果から、即座にその食品(栄養素) と糖尿病との因果関係が明らかにされたと考えることは出来ない。疫学研究の重要な目的の 1 つは、結果(疾病) と原因(暴露要因) との因果関係を明らかにすることであるが、特に疫学研究では①偶然(chance)、②バイアス(bias)、③交絡(confounding) の要因が研究結果に影響を及ぼす。

疫学研究でいう偶然とは測定値の確率変動が研究結果に及ぼす影響のことである。疫学研究では非常に多くの対象者について、それぞれの個人の健康指標や栄養摂取状況を測定して集団として解析し、暴露要因と疾病との関連を評価する。しかしながら、各調査対象者に対する 1 回の測定で得られたデータがそのままその個人の特性を正確に反映しているとは限らない。同じ人に対して限りなく繰り返し測定し、得られたデータの平均値をとればその人の真の値を得ることができるが、実際にはこのようなことは不可能である。そのため 1 回の測定で得られたデータを解析に用いることが多い。このように測定値は確率変動の影響を受けるため、得られたデータはその人の本当の値よりも大きいこともあれば小さいこともある。同様に測定値の確率変動は集団の特性を測定するときにも作用する。つまり母集団から標本集団を抽出して測定する場合、繰り返し標本集団を抽出して測定すれば母集団の特性についての真の値に近づく。しかしながら実際はこのようなことは不可能なので、有限の標本を 1 回抽出して得られたデータが解析に用いられる。疫学研究ではこのような偶然の影響を小さくすることが必要になる。標本集団の人数が大きければ大きいほど偶然の影響は小さくなり、データはより安定したものとなる。

疫学研究におけるバイアスとは暴露要因と疾病との実際の関連性を過大に評価したり、あるいは逆に過小に評価したりして、誤った研究結果を導き出してしまうことをいう。バイアスの大きな原因になるものとして、大きくは情報バイアスと選択バイアスがある。情報バイアスは暴露要因や疾病に関する情報の測定に問題があるために実際の関連性が誤って評価されてしまうことをいう。情報バイアスには思い出しバイアスと過剰診断バイアスがあり、前者は食品や栄養素の摂取量などの暴露要因に関する情報を対象者が正確に思い出せないために疾患との関連性を誤って評価してしまうことをいい、後者は疾病に関する情報バイアスの 1 つである。

選択バイアスとは疫学研究の対象者の選択に問題があるために、暴露要因と疾病との関連性を過大評価したり過小評価したりしてしまうことをいう。つまりある目的で調査を行おうとしたときに、調査に参加した集団の特性が当初の目的としていた集団の特性と異なっていたりすると生じる可能性がある。疫学調査の対

対象者には日頃から健康意識の高い人が積極的に協力することが多く、また逆に既に疾病に罹っているために自分の健康状態を心配して調査に参加する場合もある。このように調査の対象とした集団の特性が偏った特性を持つと暴露要因と疾病との関連を正しく評価できなくなる可能性がある。

交絡は疫学調査で得られたデータを用いて、暴露要因と疾病との関連性を解析する際に考慮しなくてはならない最も重要な要因の 1 つでもある。交絡とは暴露要因と疾病との関連性が第 3 の要因によって過大評価されたり過小評価されたりしてしまう現象をいう。これら第 3 の要因を交絡要因または交絡変数という(図 1)。例えばアルコールと胃がんの関連性を調べようとした場合、喫煙が大きな交絡要因となる。すなわち喫煙は胃がんの危険因子であるが、飲酒習慣と喫煙習慣は正相関することが知られている。そのためアルコールという暴露要因と胃がんという疾病との関連性が喫煙という交絡要因によってゆがめられてしまうことになる。このように疫学研究を行う際には暴露要因と疾病との関連性を検討する上で交絡要因を十分に考慮する必要がある。交絡要因を考慮(制御)する統計学的方法としては層別化解析や多変量解析がある。これらの方法を用いて交絡要因の影響を取り除くことを補正(adjustment)という。

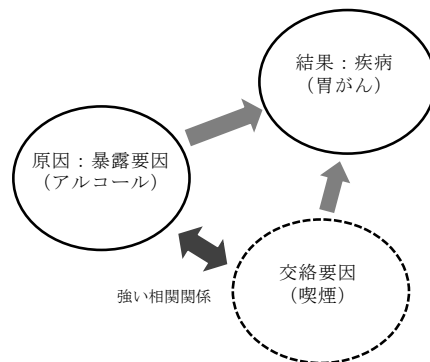


図 1 交絡要因

疫学研究における食行動調査

食品や栄養素の健康影響を疫学的に明らかにする分野を特に栄養疫学研究というが、当然ながら栄養疫学調査では協力者がどのような食品(栄養素)をどれくらい摂取しているのかを調べる必要がある。疫学研究で食行動調査を行う際には、研究の目的に応じて最適な調査方法を選択することが重要となる。栄養摂取と生活習慣病との関連を調査する栄養疫学研究においては、多数の対象者について長期間の平均的な摂取量を個人レベルで把握する必要がある。

栄養疫学研究における食行動調査には、①食事記録法、②24 時間思い出し法、

③陰膳法，④食物摂取頻度調査票，⑤生体指標（バイオマーカー）の 5 つがある．
①の食事記録法には，対象者に目安量を調査票に記入してもらう「目安量」と，実際に食べた食物の重量を量る「秤量法」がある．食事記録法では，食物の摂取時点で調査票に記録するため，対象者の記憶に頼らないという長所がある．そのため，他の食事調査法の精度を評価する際の参照基準に使われる．しかしながら対象者への負担が大きく，また作業としても大変なために対象者が普段よりも簡便な食事にしてしまうなどの問題もある．②の 24 時間思い出し法は調査日前の 1 日分，または調査時点からさかのぼって 24 時間分の食事内容をフードモデルや写真を用いて調査員が対象者に問診し記録する．この方法は対象者への負担が比較的小さいが，熟練した調査員が必要であり，また対象者の記憶に依存するという欠点がある．③の陰膳法は被験者が摂取した食物と同じ物・量を取り分けておいてもらい，後日それを回収して化学分析により栄養摂取量を算出する．これも対象者の記憶に依存しないという長所があるが，対象者への負担が大きく，通常の食生活と異なる可能性があり，また試料の分析に手間と費用がかかるという短所がある．

栄養疫学調査は用いる研究デザインにもよるが，通常は数千人から数万人の対象者に対して食行動調査や生活習慣，健康指標等の調査を行う．そのため，①～③のように食行動調査に大きな手間が掛かる方法を大規模な疫学調査で用いるのは現実的でない．またこれらの食行動調査では普段の食生活をどれくらい正確に反映しているかなどの疑問は残る．このようなことから，より対象者への負担が少なく簡便に食行動を把握出来る調査方法として，④の食物摂取頻度調査が考案された．この調査では数十から百数十ほどの食物の習慣的な摂取頻度を，調査票を用いて質問し，摂取頻度に関する回答から食品群や栄養素の摂取量を計算する．この調査は簡便に行え，また個人の習慣的な摂取量をある程度把握できるという利点がある．しかしながらその反面，被験者の記憶に頼るといった問題点や，また百数十という質問数でも負担に感じる場合もあり，調査する対象集団によっても精度は多少異なる．しかしながらおおよその食行動は把握できることから，国内外で行われている大規模な栄養疫学調査の多くで採用されている調査方法である．

食物摂取頻度調査方法の開発以降，栄養疫学研究は爆発的に発展し，近年果物や野菜などの食品群，また食物繊維やビタミン・ミネラル類などの栄養素と様々な疾病との関連について次々と新たな知見が報告されるようになってきた．しかしながら，十分な妥当性評価が行われている食物摂取頻度調査法にもやはり限界はあり，必ずしも被験者の正確な食行動を完全に把握出来るわけではない．また食事記録法や 24 時間思い出し法と同様に，調査データから算出される計算栄養値はいずれも栄養成分表の精度に依存するという短所がある．

食行動調査におけるバイオマーカーの有用性

一方、血液や尿などの生体試料中に存在する食品成分を測定し、バイオマーカーとして疫学研究の指標とすることが出来れば、健康指標との関連についてより詳細な解析を行うことが可能となる。栄養疫学研究においてバイオマーカーを用いる大きな利点は3つある。1つは対象者の過去の記憶に頼らないこと、2つめに実際に生体が利用した量を反映することである。食品摂取頻度調査法では用いる栄養成分表の精度に依存するため、品種間・産地間・あるいは収穫時期による栄養素含有量の違い、また調理方法や摂取する食品の組み合わせにより各食品成分の含有量や吸収性に違いが生じる点を考慮出来ない。これに対して、バイオマーカーでは実際に摂取した各栄養素（機能性成分）の生体内での状態を把握出来る。更に利点の3つめとして、実際に摂取した各栄養素の生体内での状態を把握出来るため、栄養疫学研究においてより直接的に疾患との関連を正確に解析できるということである。

バイオマーカーを用いた食行動調査は、より客観的で詳細な健康指標との関連についての解析が可能となるが、生体試料の採取と分析に手間と費用がかかるほか、試料採取時の条件（空腹か否かなど）に影響を受ける場合がある。また個人の習慣的な摂取量の指標として生体試料の有用性は栄養素によって異なり、また目的とする食品成分の摂取量以外にも代謝・吸収に関連した要因にも影響を受ける場合が多い。ある食品（群）の摂取量を反映するバイオマーカーとして求められることは、①体内における半減期がある程度長く、直ぐには排泄されないこと、②摂取量に依存してバイオマーカーの値も高くなること、③その食品に特徴的に含まれること、の3点である。特に①の項目である生体内における半減期は重要な要因となる。疫学調査において採血・採尿を行う際、被験者は通常検査前日の夜から食事を控えるため、いくら日常的に摂取している食品であっても、目的とする食品成分が比較的短時間で代謝され、尿や血液中からすぐに消失してしまうものではバイオマーカーにはならない。近年ではLC-MS等を用いた分析技術の精度向上により、生体試料中でかなり低レベルの食品成分も分析・検出できるように開発されているが、多数の検体を分析しなくてはならない疫学研究等においては、より簡便で精度高く分析可能なバイオマーカーとその分析手法が望まれる。またバイオマーカーを測定する試料も、尿中あるいは血液中に存在するものである方がより現実的である。これらの試料は健康診断等においても採取されるものであるし、被験者からのインフォームドコンセントを得られやすい。一方、尿・血液以外の生体試料として、毛髪や爪、あるいは皮下脂肪組織なども考えられるが、これらの試料を実際の疫学調査で採取することは困難である場合が多い。

これまでに血液や尿などの生体試料中に存在する食品成分を分析して、栄養疫

学の指標にしようとする試みが多くなされ、これらバイオマーカーと様々な疾患マーカーとの関連について明らかにされつつある。食品から摂取する栄養素には脂質・タンパク質・炭水化物・食物繊維・ビタミン類・ミネラル類があるが、それぞれの栄養素の摂取量と疾病との関連についてはこれまでに膨大な数の研究があり、また生体試料中の脂質やビタミン類・ミネラル類についての研究も数多い。個々の食品に含まれる栄養素にそれぞれ大きな違いはあるものの、全ての食品は非常に多くの栄養成分を含んでおり、これらの栄養成分をバイオマーカーとしても、ある食品(群)の摂取量を反映するものではない。また目的とする食品(群)の摂取量に季節変化があるような場合、調査する時期によってはバイオマーカーとしての解析精度は低下する。

果物・野菜の摂取量を反映すると考えられているバイオマーカーとして、血中のカロテノイドやビタミン C があり、これらの血中濃度と疾患マーカーとの関連が解析されている。カロテノイドの中でも特にユニークなバイオマーカーとして β -クリプトキサンチンがある。 β -クリプトキサンチンはオレンジやカキなどに含まれるカロテノイド色素の一つであるが、特に日本のウンシュウミカンに特徴的に多く含まれている。近年、ミカン産地の住民を対象にした調査から、血中 β -クリプトキサンチンレベルがミカンの摂取頻度に依存して著しく上昇し、血中 β -クリプトキサンチン濃度に影響する要因は食品ではミカンのみであったとする結果が報告されている(図2)。またミカンを高頻度に摂取している地域住民の血中 β -クリプトキサンチンは他の地域に比べて極めて高い。近年、血中 β -クリプトキサンチンレベルをミカン摂取のバイオマーカーに用い、ミカン産地住民を対象にしたミカンの摂取と生活習慣病との関連についての栄養疫学研究の結果が相次いで報告されている。

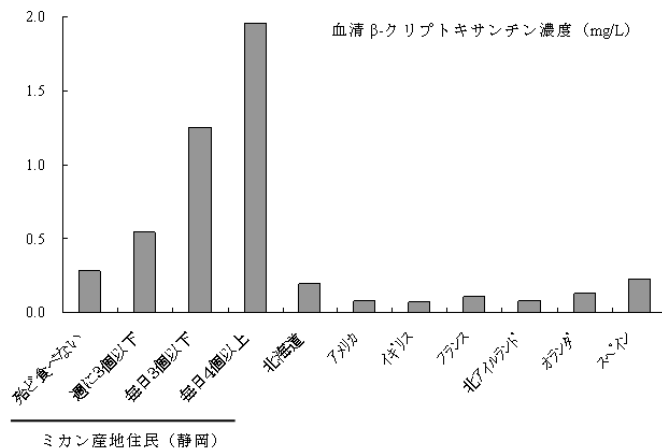


図2 ミカンの摂取量と血清 β 濃度—ミカン産地住民と他の地域との比較

参考文献

- 1) 坪野吉孝, 久道茂, 栄養疫学, 第 1 版(南江堂, 東京)(2001).
- 2) 日本疫学会編集, 疫学-基礎から学ぶために, 第 1 版(南江堂, 東京)(1996).
- 3) 豊川裕之編集, 疫学・保健統計, 第 2 版(メジカルフレンド社, 東京)(1999).
- 4) Sugiura, M., Kato, M., Matsumoto, H., Nagao, A. and Yano, M., Serum concentration of β -cryptoxanthin in Japan reflects the frequency of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) consumption. *J. Health Sci.*, **48**, 350-353 (2002).
- 5) Sugiura, M., Matsumoto, H., Kato, M., Ikoma, Y., Yano, M. and Nagao, A., Multiple linear regression analysis of seasonal changes in the serum concentration of β -cryptoxanthin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 196-202 (2004).