

図5 骨粗鬆症検診の流れ

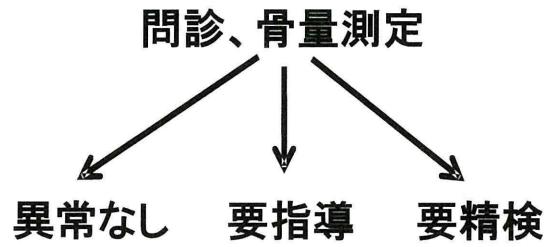
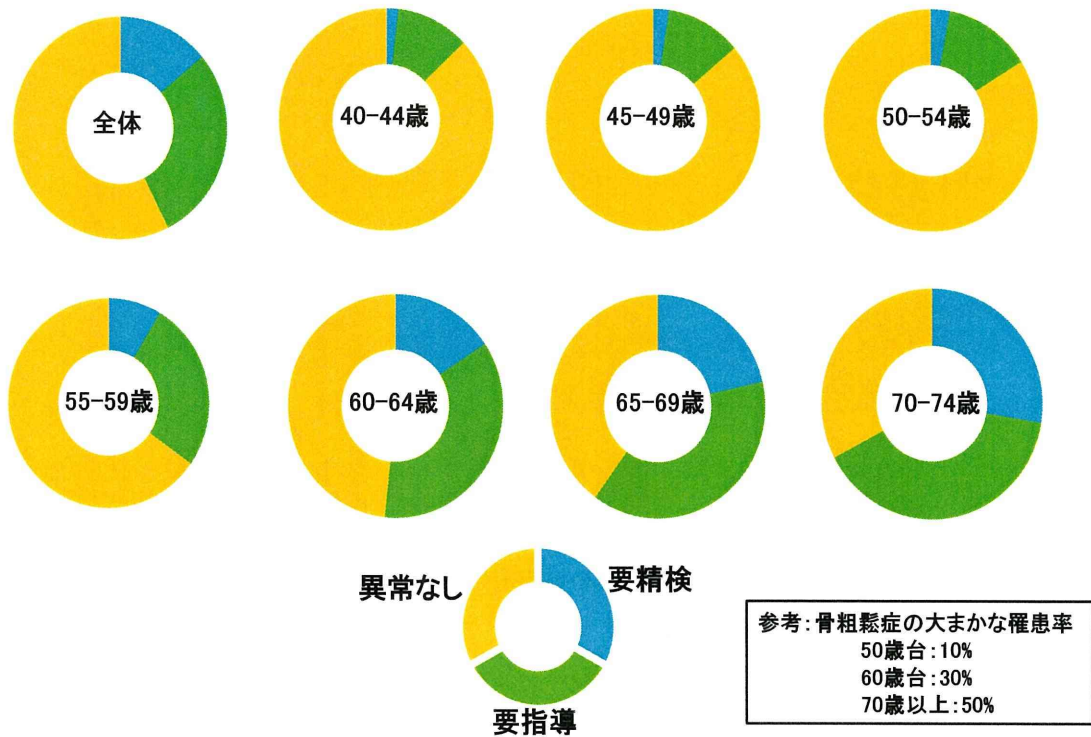


図6 骨粗鬆症検診の判定結果(平成21年度女性)



厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

自己記入式質問票による歯科検診の市町村での試験的实施

研究分担者 山下 喜久 九州大学大学院歯学研究院 口腔予防医学分野 教授
研究協力者 嶋崎 義浩 九州大学大学院歯学研究院 口腔予防医学分野 准教授
古田美智子 九州大学大学院歯学研究院 口腔予防医学分野 助教
森田 学 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 予防歯科学分野 教授
竹内 倫子 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 予防歯科学分野 助教
秋房 住郎 九州歯科大学 口腔保健学科 教授
福泉 隆喜 九州歯科大学 総合教育学分野 准教授
坂本 友紀 浜松市保健医療部 健康増進課 口腔保健医療センター
深井 稜博 深井保健科学研究所

研究要旨

市町村における歯周疾患検診は健康増進法に基づく事業として実施されているが、受診率が低いことが問題となっている。低受診率の理由の一つとして、人的・時間的制約が大きい検診手法が挙げられる。そこで、歯周疾患患者を効率よくスクリーニングする目的で作成された質問票を用い、自治体の健診で配付して得られた結果を解析した。

福岡県糸島市の特定健診参加者 3,762 人に質問票を配布した結果、回答した者は 3,346 人 (89%) であった。自己判定の結果は、「歯科医院に通院している」者は 42%、「歯科医院で精密検査が必要」である者は 26%、「歯科医院で保健指導が必要」である者は 15%、「異常ない」者は 17% であった。自己判定後、歯科医院を受診した者は 7% であった。また、岡山県鏡野町の住民約 4,000 人に同様の質問票を配布したところ、歯科医院を受診した者は 2% であった。

自己記入式質問票による検診は、一般の住民健診の場で歯科医療・保健指導が必要な者を簡便に把握する際には有効ではあり、対面による保健指導が受療行動の誘導にある程度効果を示したが、要保健指導者及び要精密検査者の歯科医療機関への受療率のさらなる向上を図るためには、保健指導のためのツールおよび場の設定について今後引き続き検討が必要である。

A. 研究目的

約 22.5 万人であり、対象者に対する受診率は 3.5% と極めて低い値が推定される。歯周
平成 21 年度の歯周疾患検診の受診者は

疾患検診には主に Community Periodontal Index (CPI) ¹⁾ が用いられるが、人的・時間的制約が大きいとため低受診率となることが考えられる。近年、大規模な人数を対象に比較的短時間で歯周疾患をスクリーニングする手段として、自己記入式質問票の有効性が示されている ^{2,3)}。そこで、厚生労働省科学研究 ⁴⁾ の結果を基に開発された自己記入式質問票を自治体の健診で用いて、健診受診率がどの程度になるか評価する。また、この自己記入式質問票によって要保健指導者及び要精密検査者と判定された者の歯科医療機関への受療率を判定する。

B. 研究方法

福岡県糸島市、岡山県鏡野町の住民を対象に、自己記入式質問票を配布した。この質問票は 8 項目からなっており、回答結果によって、「通院を続ける（継続通院）」、「歯科医院で精密検査が必要である（要精密検査）」、「歯科医院で保健指導が必要である（要保健指導）」、「異常なし」の 4 段階に判定される。

1. 福岡県糸島市

平成 23 年福岡県糸島市の 40～74 歳人口は 46,900 人であり、平成 23 年 5 月から 10 月に行われた特定健診対象者は 20,707 人であった。このうち、特定健診に参加を希望した者 3,762 人を対象に、自己記入式質問票（資料 1、2-1、2-2）を郵送にて配布し、質問票 No.1（自己判定の結果）を健診会場で 2 名の歯科衛生士が回収した。自己判定に基づき、対象者に質問票 No.2 を持参して歯科医院を受診するよう伝え、後日、糸島市内の調査協力歯科医院にて質問票 No.2

を回収し、自己記入式質問票による健診によって歯科医院への受療行動が変容したか評価した。本研究の調査の流れを図 1 に示す。

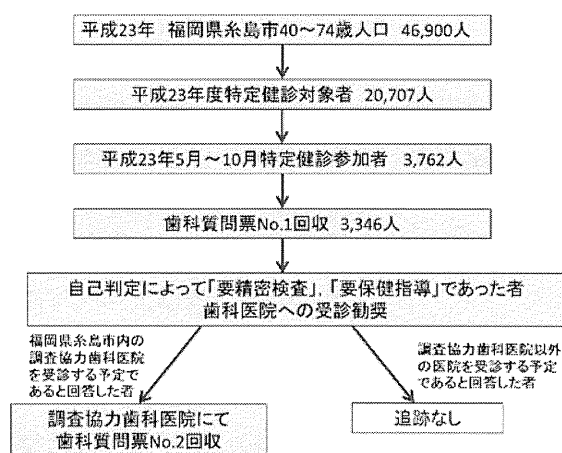


図 1. 福岡県糸島市の調査の流れ

2. 岡山県北部

平成 23 年 6 月から 9 月に、岡山県鏡野町の特定健診対象者約 3,100 人、岡山県美作県民局職員約 700 人、岡山県美咲町愛育・栄養医院約 260 人に自己記入式質問票（歯の健康度自己チェック表、資料 3、4-1、4-2）を配布した。歯科医院を受診した際に質問票を持参してもらい、歯科医院にて主治医に来院動機をチェックしていただくよう依頼した。その後、津山市歯科医師会に所属している歯科医院から質問票を回収した。

（倫理面への配慮）

対象者には、本研究の主旨を文書で説明し、研究目的以外では個人データを使用しないことを理解していただいた上で同意を得た。尚、本研究は九州大学臨床研究倫理審査委員会の承認（23—1 号）を得た。

C. 研究結果

1. 福岡県糸島市

1) 自己判定結果

健診会場で質問票 No.1 を回収できたのは 3,346 人（回収率 88.9%）で、そのうち欠損データのない 3,334 人（男性 1,481 人、女性 1,853 人、平均年齢 62.2±9.0 歳）を分析対象とした。「継続通院」は 1,406 人（42.2%）、「要精密検査」は 854 人（25.6%）、「要保健指導」は 501 人（15.0%）、「異常なし」は 573 人（17.2%）であった。「継続通院」のうち、定期的に歯科医院に来院していた者は 950 人（67.6%）、治療中の者が 239 人（17.0%）、定期来院あるいは治療中か不明の者は 217（15.4%）であった。

男女別でみると、男性に比べて女性のほうが「継続通院」の者の割合が高かった（表 1）。

表 1. 男女別にみた自己判定結果
(n=3,334)

判定区分	男性 (n=1,481)	女性 (n=1,853)	計 (n=3,334)
継続通院	532 (35.9)	874 (47.2)	1,406 (42.2)
要精密検査	407 (27.5)	447 (24.1)	854 (25.6)
要保健指導	293 (19.8)	208 (11.2)	501 (15.0)
異常なし	249 (16.8)	324 (17.5)	573 (17.2)

人数 (%)

また、年齢が増加するにつれて「継続通院」や「異常なし」の者が増加し、「要保健指導」の者が減少する傾向にあった（表 2）。

表 2. 年齢別にみた自己判定結果 (n=3,334)

判定区分	年齢				
	-40 (n=95)	41-50 (n=333)	51-60 (n=635)	61-70 (n=1,709)	71- (n=562)
継続通院	32 (33.7)	120 (36.0)	236 (37.2)	750 (43.9)	268 (47.7)
要精密検査	32 (33.7)	84 (25.2)	214 (33.7)	417 (24.4)	107 (19.0)
要保健指導	19 (20.0)	77 (23.1)	106 (16.7)	228 (13.3)	71 (12.6)
異常なし	12 (12.6)	52 (15.6)	79 (12.4)	314 (18.4)	116 (20.6)

人数 (%)

歯科医院を受診する予定であると回答した者は 2,091 人（63.3%）で、歯科医院を受診しないと回答した者は 852 人（25.8%）であった。「要精密検査」や「要保健指導」

の約 50%以上の者が、自己判定に基づいて、歯科医院を受診する予定であると回答した（表 3）。

表 3. 自己判定結果による歯科医院の受診予定 (n=3,301)

判定区分	協力歯科医院を 受診予定 (n=1,432)	協力歯科医院 以外を受診予定 (n=659)	受診しない (n=852)	不明 (n=358)
継続通院	597 (41.7)	333 (50.5)	110 (12.9)	345 (96.6)
要精密検査	470 (32.8)	180 (27.3)	189 (22.2)	6 (1.5)
要保健指導	208 (14.5)	81 (12.3)	210 (24.6)	2 (0.4)
異常なし	157 (11.0)	65 (9.9)	343 (40.3)	5 (1.4)

人数 (%)

2) 自己判定後の歯科医院への受診結果

自己判定後の受療行動の変容を評価したところ、福岡県糸島市内の調査協力歯科医院を受診する予定であると回答した 1,432 人のうち、平成 23 年 5 月から 12 月までに歯科医院を受診した者は 105 人であった

(表 4)。歯科医院受診者の口腔内状態として、現在歯が 20 歯以上ある者が 82 人 (82.8%)、う蝕有病者が 38 人 (38.4%)、歯周炎がある者 (CPI コード 3 以上) は 56 人 (56.6%) であった。

表 4. 自己判定後の歯科医院への受診結果

判定区分	協力歯科医院を 受診予定 (n=1,432)	協力歯科医院を 受診した者 (n=105)
継続通院	597 (41.7)	68 (64.8)
要精密検査	470 (32.8)	20 (19.0)
要保健指導	208 (14.5)	9 (8.6)
異常なし	157 (11.0)	8 (7.6)

人数 (%)

表 5. 歯科医院を受診した者の口腔内状態 (n=99)

	継続通院 (n=64)	要精密検査 (n=19)	要保健指導 (n=8)	異常なし (n=8)
現在歯 20 歯以上	51 (79.7)	17 (89.5)	8 (100.0)	6 (75.0)
う蝕あり	22 (34.4)	9 (47.4)	4 (50.0)	3 (37.5)
歯周炎あり	37 (57.8)	12 (63.2)	6 (75.0)	1 (12.5)

人数 (%)

2. 岡山県北部

平成 23 年 6 月から 12 月までの間に、質問票に記入して歯科医院を受診した者は 74 人（平均年齢 60.6±16.8 歳、男性 40 人、女性 32 人；68 人は 40 歳以上、2 人は 40 歳未満、2 人は年齢・性別不詳）であった。歯科医院で回収した質問票について、自己判定結果を表 6 に、受診動機を表 7 に示す。既に歯科医院を受診中（通院継続中）の者が 24 人（32.4%）、「要精密検査」と自己診断されたものが 39 人（52.7%）であった。「質問調査票（自己チェック票）に回答することが受診動機となった」者は 41 人（55.4%）であった。表 6 と表 7 のクロス集計を表 8 に示す。今回、「調査票に回答する過程で、受療行動のきっかけになるか否か」について調べることが主な目的である。要精密検査が必要と判定された 39 人中 35 人（89.7%）が、自己チェック票が受診動機になっていた。

表 6. 歯科医院を受診した者の自己判定結果 (n=74)

通院継続	24 (32.4)
要精密検査	39 (52.7)
要保健指導	7 (9.5)
異常なし	3 (4.1)
無記入	1 (1.4)

人数 (%)

表 7. 歯科医院への受診動機 (n=74)

自己チェック票	41 (56.1)
他の理由	30 (41.1)
無記入	3 (4.1)

人数 (%)

表 8. クロス集計表（自己判定結果 × 受診動機）(n=74)

		受診動機		
		自己チェック票	他の理由	無記入
判定区分	通院継続	2	21	1
	要精密検査	35	4	0
	要指導	2	4	1
	異常なし	2	1	1

D. 考察

福岡県糸島市の結果では、質問票の回収率は 89%であり、一般の住民健診の場で歯科医療が必要な者を簡便に把握する際に有効であったと考えられる。しかし、歯周疾患は加齢とともに有病率は高くなるのが一般的であるが、本調査の結果では年齢が増

加すると「異常なし」の者が増加していた。この理由として、「異常なし」の者に無歯顎者が含まれていたことが考えられる。なお、認知症等により自己回答が難しい高齢者については、質問票による健診のみでは対応が困難な場合も想定されるため、引き続き検討が必要と思われる。

また、福岡県糸島市での調査において、自己判定後の歯科医院への受療行動の推移を平成 24 年度においても引き続き調査する予定ではあるが、平成 23 年 12 月までに歯科医院を受療した者は 7%であった。一方、岡山県北部での調査では歯科医院を受療した者は 2%であった。この差は、糸島市では特定健診会場で歯科衛生士が自己判定結果を回収し、結果に基づいて短時間ではあるが要望に応じて保健指導を行ったのに対して、岡山県北部では書面での自己判定結果のみで歯科医院の受療を勧めたためと考えられる。すなわち、歯科医療が必要にもかかわらず歯科医院で受療しなかった者に対し、受療行動を促すためには、要保健指導者及び要精密検査者の歯科医療機関への受療率の向上を図るために動機付けが強く働くような新たなツールの開発や場の設定などについて今後引き続き検討が必要である。

E. 結論

自治体の健診で歯周疾患患者を効率よくスクリーニングする目的で作成された質問票を配付した結果、質問票への回答率は 89%と高く、その内 83%の者が通院継続、要精検または要保健指導と判定された。よって、自己記入式質問票による検診は、一般の住民健診の場で歯科医療・保健指導が必要な者を簡便に把握するには有効であることが確認できた。また、受療行動の誘導には短時間ではあっても歯科衛生士などによる対面での直接的な保健指導にある程度効果があることも認められた。しかし、要保健指導者及び要精密検査者の歯科医療機関への受療率のさらなる向上を図るためには、今後引き続き保健指導のためのツール

および場の設定などについて検討する必要があると考えられる。

引用文献

1. Cutress TW, Ainamo J, Sardo-Infirri J: The community periodontal index of treatment needs (CPITN) procedure for population groups and individuals. *Int Dent J* 37: 222-233, 1987.
2. Taylor GW, Borgnakke WS: Self-reported periodontal disease: validation in an epidemiological survey. *J Periodontol* 78(Suppl): 1407-1420, 2007.
3. Yamamoto T, Koyama R, Tamaki N et al.: Validity of a questionnaire for periodontitis screening in Japanese employees. *J Occup Health* 51: 137-143, 2009.
4. 森田学. 厚生労働省科学研究補助金循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策事業「成人期における歯科疾患のスクリーニング体制の構築に関する研究」平成 22 年度 総括・分担研究報告書

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Shimazaki Y, Akifusa S, Takeshita T, Shibata Y, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Hirakawa Y, Kiyohara Y, Yamashita Y: Effectiveness of the salivary occult blood test as a screening method for periodontal status. *J Periodontol*

- 2011; 82, 581-587.
2. Oshikohji T, Shimazaki Y, Shinagawa T, Fukui N, Akifusa S, Hirata Y, Yamashita Y: Relationship between receiving a workplace oral health examination including oral health instruction and oral health status in the Japanese adult population. *J Occup Health* 2011; 53, 222-229.
 3. Takeshita T, Yasui M, Tomioka M, Nakano Y, Shimazaki Y, Yamashita Y: Enteral tube feeding alters the oral indigenous microbiota in elderly adults. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77, 6739-6745.
 4. Fujimoto A, Akifusa S, Hirofuji T, Yamashita Y: Involvement of suppressor of cytokine signaling-1 in globular adiponectin-induced granulocyte colony-stimulating factor in RAW 264 cell. *Mol Immuno* 2011. 48, 2052-2058.
 5. Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y: Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Sci Rep* 2012; 2, 215.
 6. 山下喜久: 歯周病とメタボリックシンドローム. *The Bone* 2011; 25, 85-91.
- 2) 学会発表
1. 古田美智子, 嶋崎義浩, 秋房住郎, 森田学, 山下喜久. 歯周疾患検診の代用法としての自己記入式質問調査の実施結果. 第22回日本疫学会学術総会. 2012年1月, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

- (資料1) 福岡県糸島市で配布した調査依頼文
(資料2-1) 福岡県糸島市で配布した自己記入式質問票 No.1
(資料2-2) 福岡県糸島市で配布した自己記入式質問票 No.2
(資料3) 岡山県北部で配布した調査依頼文
(資料4-1) 岡山県北部で配布した自己記入式 おもて
(資料4-2) 岡山県北部で配布した自己記入式 うら

資料 1 特定健診受診者の皆様へアンケートのお願い

今回、糸島市では、特定健診の機会を利用して、市・糸島歯科医師会・九州大学が協力してお口の健康に関する自己記入式のアンケートを実施します。皆様のお口の健康への関心を高めていただき、ひいては糸島市の口腔保健の向上を目指し、さらに今回の試みの効果を検証したいと考えておりますので、市民の皆様のご協力を宜しくお願いいたします。

アンケート調査の流れ

①特定健診の日までに、アンケート用紙の No 1（左側）の該当する記入欄 に✓を記入してください。

②2枚複写になっていますので、No 1の提出用（青色の用紙）を切り取ってください。

③特定健診の会場で、No 1の提出用を出してください。

本アンケート調査にご賛同いただき、判定結果に基づいて歯科医院の受診を希望される場合には、

No 2の裏面にある糸島市内の協力歯科医院の受診をお勧めします。

その他の歯科医院では「C. 歯科医院での保健指導」に対応できません。

判定結果についてのご質問は特定健診の会場で受け付けますので、遠慮なくご相談ください。

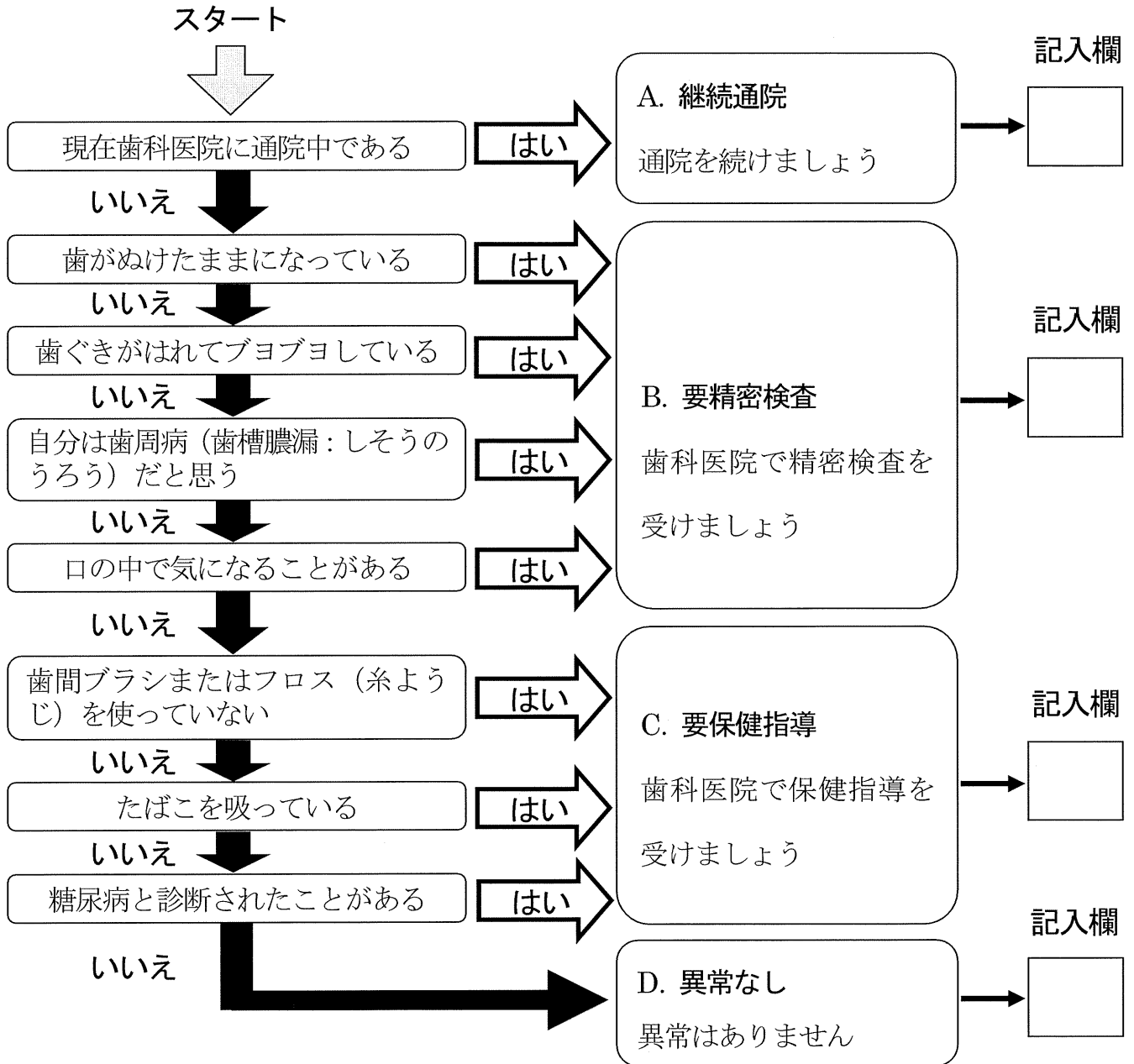
アンケートについてのお問い合わせ

九州大学大学院歯学研究院 口腔保健推進学講座 口腔予防医学分野

担当：山下喜久、嶋崎義浩 TEL 092-642-6350

生年月日 昭和 年 月 日生 (歳) 性別 男 ・ 女

- 1 あなたの口の状態を自己判定していただきます。
「はい」・「いいえ」のどちらかを選んで進み、該当の記入欄に✓の印を記入してください。



- 2 この判定に基づいて歯科医院を受診しますか？
該当の□に✓の印を記入してください。

協力歯科医院を受診する

協力歯科医院以外の医院を受診する

資料 2-2

院は受診しない

協力歯科医院名についてはアンケート用紙 (No 2) の裏面をごらんください。

-----裏面の糸島市内の協力歯科医院を受診する際はご記入の上お持ち下さい-----

3 No 1 のアンケート用紙の判定結果はどれでしたか。記入欄に✓の印を記入してください。

記入欄	判定結果
	A. 継続通院
	B. 要精密検査
	C. 要保健指導
	D. 異常なし

ご注意！

歯科医院の受診には診療費が掛かりますので健康保険証を必ずご持参ください。
 なお、歯科医院への受診はご自身のご判断でお決めください。

4 今回、歯科医院を受診した理由をお答えください。記入欄に✓の印を記入してください。

記入欄	受診の理由
	アンケートの結果、受診が必要であると判定されたから
	アンケート結果とは関係なく受診した (理由：)

<アンケートについてのお問い合わせ>

九州大学大学院歯学研究院 口腔保健推進学講座 口腔予防医学分野
 担当：山下喜久、嶋崎義浩 TEL 092-642-6350

ご協力ありがとうございました。

歯科医院の検査結果の記入欄（ご自身で記入する必要はありません）

検査日 _____ 月 _____ 日

歯肉の状況（CPI）

右上	上中	左上
右下	下中	左下

歯の状況

歯の本数 () 本
 むし歯 () 本
 治療済みの歯 () 本

その他所見 なし・あり

- 0：健全（健全な歯肉）
- 1：歯肉出血あり（軽度な炎症の所見）
- 2：歯石（歯石沈着あり）
- 3：浅い歯周ポケットあり（中程度の歯周病の所見）
- 4：深い歯周ポケットあり（重度の歯周病の所見）

[]

研究参加へのお願い

歯の健康度自己チェック票による口腔の健康状態の把握とその後の歯科保健行動の追跡

この説明書は「歯の健康度自己チェック票による口腔の健康状態の把握とその後の歯科保健行動の追跡」の内容について説明したものです。この研究についてご理解、ご賛同いただける場合は、被験者（研究の対象者）として研究にご参加くださいますようお願い申し上げます。

研究に参加していただける受診者の方には、以下の2点についてお願いいたします。

- ①表面の質問票に答えていただき、ご自分のお口の健康状態を自己判定していただきます。裏面に記入する必要はございません。
- ②その後、もし歯科医院を受診されることがございましたら、本調査用紙を持参し、歯科医師に手渡してください。そして、簡単な質問（どのような理由で歯科を受診したか）にお答えいただきたく存じます。

尚、特にあらたな費用や追加の検査は必要としません。また、あなたの個人情報が外部に漏れることは絶対にならないよう十分留意し、プライバシーおよび個人情報の保護について細心の注意を払います。また、学会や学術論文で発表する予定です。個人名が特定されるようなことはありません。

ご協力のほど、よろしくお願いいたします。

なお、強制参加ではありませんので、ご自分のデータを研究用に使用してほしくない場合は、そのまま破棄して下さって結構です。研究に参加しなくても不利益はなく、研究に参加しても特典はありません。

研究についての問い合わせ先

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
社会環境生命科学専攻長寿・社会医学講座
予防歯科学分野
歯科医師 森田 学

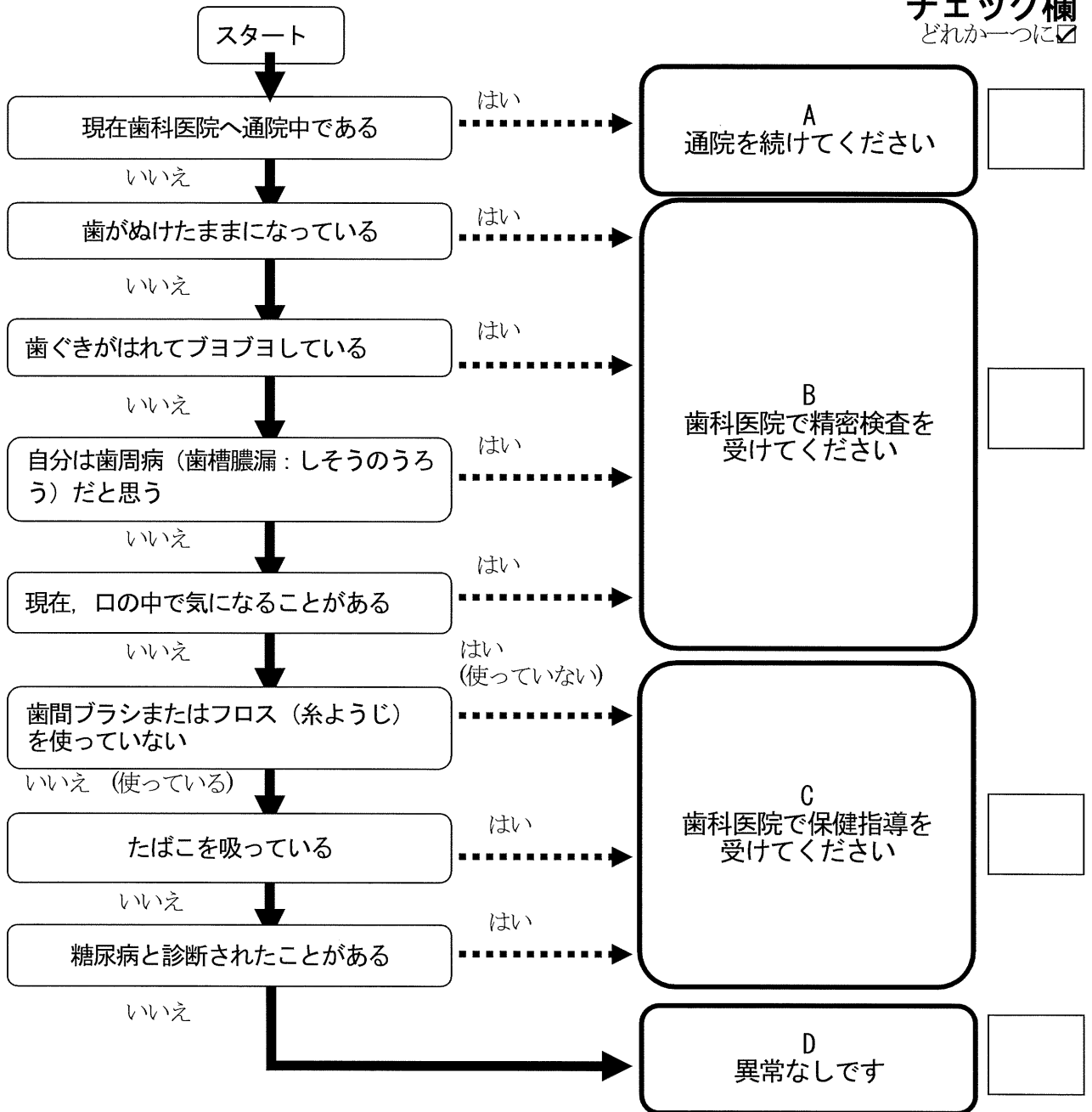
〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1（電話：086-235-6712）

歯の健康度自己チェック票

この質問に答えていただき、ご自分のお口の健康状態を自己判定してください。裏の頁に記入する必要はございません。その後、もし歯科医院を受診されることがございましたら、本調査用紙を歯科医師にご提出ください。

以下の各質問項目でははい・いいえのどちらかを選び進んでください。

チェック欄
どれか一つに☑



以降は歯科医院で記入します

記入後、返信用封筒に入れてご返送くださいますようお願いいたします。なお、返信用封筒は〇〇歯科医師会会員の先生がたには先日お配りしたものをお使いください。〇〇歯科医師会以外の支部の先生方につきましては、お手数ですが 下記の連絡先に、電話かファックスにてお名前と歯科医院の住所をご連絡いただけましたら、返信用封筒を送らせていただきます。

1 患者様の年齢 歳 患者様の性別 男・女

2 歯科医院の受診動機を確認してください。

<input type="checkbox"/>	アンケートで受診が必要であると判定された	
<input type="checkbox"/>	アンケート結果とは関係なく受診した	
	主訴	()
診断	<input type="checkbox"/>	う蝕, 歯髄炎, 歯根膜炎, 辺縁性歯周炎等
	<input type="checkbox"/>	補綴物の脱落, 義歯の破折
	<input type="checkbox"/>	口腔粘膜の異常
	<input type="checkbox"/>	顎関節症, 外傷
	<input type="checkbox"/>	その他
		()

当てはまる項目に☑

ご協力ありがとうございました。

連絡先 〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1 岡山大学歯学部 予防歯科学分野

森田 学 (電話 086-235-6712, Fax 086-235-6714)

研究成果の刊行に関する一覧表

ガイドライン等

著者氏名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年
細井孝之 他39名	骨粗鬆症の予防と 治療ガイドライン 作成委員会	骨粗鬆症の予防 と治療ガイドラ イン2011年版	ライフサイエンス出版	東京	2011

雑誌

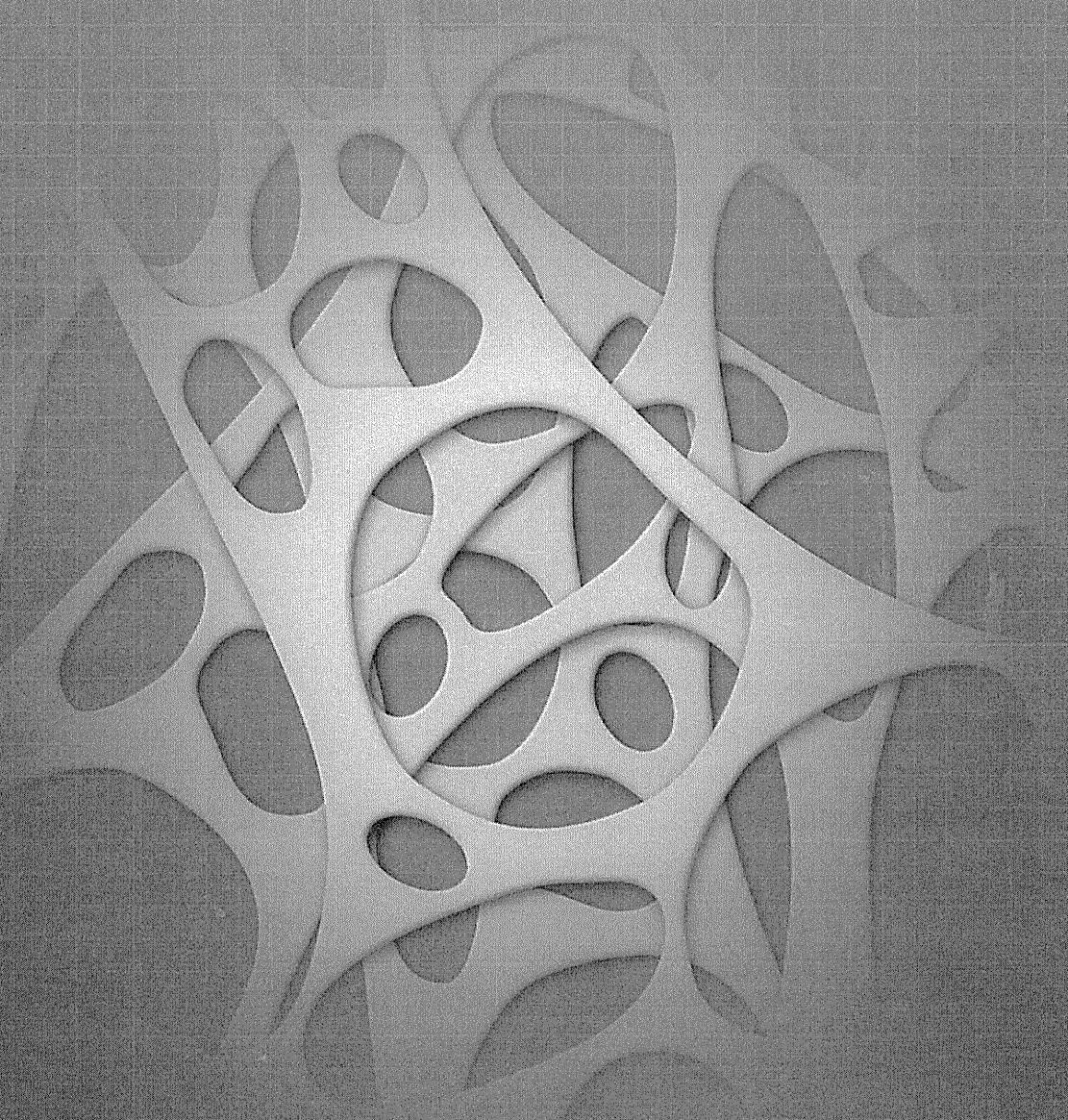
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Haraikawa M et al.	Vitamin K1 (Phylloquinone) or Vitamin K2 (Menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression.	J Nutr Sci Vitaminol	57	274-279	2011
Koudu Y et al.	Association of CYP19 gene polymorphism with vertebral fractures in Japanese postmenopausal women.	Biochemical Genetics		in press	2011
Shimazaki Y et al.	Effectiveness of the salivary occult blood test as a screening method for periodontal status.	J Periodontol	82	581-587	2011
Oshikohji T et al.	Relationship between receiving a workplace oral health examination including oral health instruction and oral health status in the Japanese adult population.	J Occup Health	53	222-229	2011
山下喜久	歯周病とメタボリック シンドローム	The Bone	25	85-91	2011

骨粗鬆症の 予防と治療ガイドライン 2011年版

編集

骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会
(日本骨粗鬆症学会 日本骨代謝学会 骨粗鬆症財団)

委員長 折茂 肇



ライフサイエンス出版

表Ⅰ エビデンスの基準(レベル)

I	システマティックレビュー/メタアナリシス
II	1つ以上のランダム化比較試験による
III	非ランダム化比較試験による
IV a	分析疫学的研究(コホート研究)
IV b	分析疫学的研究(症例対照研究, 横断研究)
V	記述研究(症例報告やケース・シリーズ)
VI	患者データに基づかない, 専門委員会や専門家個人の意見

(Minds診療ガイドライン作成の手引き2007)

表Ⅱ 推奨の強さの分類(グレード)

A	行うよう強く勧められる
B	行うよう勧められる
C	行うよう勧めるだけの根拠が明確でない
D	行わないよう勧められる

(福井・丹後による「診療ガイドラインの作成手順ver.4.3」2001年)

骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会

【委員】

折茂 肇	(老人科)	委員長
中村 利孝	(整形外科)	副委員長
伊木 雅之	(公衆衛生)	-以下五十音順-
上西 一弘	(栄養)	
遠藤 直人	(整形外科)	
太田 博明	(産婦人科)	
白木 正孝	(老人科)	
杉本 利嗣	(内分泌代謝内科)	
鈴木 隆雄	(疫学)	
宗圓 聡	(整形外科・リウマチ科)	
西沢 良記	(代謝内科)	
萩野 浩	(整形外科・リハビリテーション科)	
福永 仁夫	(放射線科)	
藤原佐枝子	(疫学)	
細井 孝之	(内分泌内科)	事務局長

【事務局】

日本骨粗鬆症学会事務局

財団法人骨粗鬆症財団事務局

ライフサイエンス出版株式会社(日本骨粗鬆症学会雑誌「Osteoporosis Japan」編集部)

**Vitamin K₁ (Phylloquinone) or Vitamin K₂ (Menaquinone-4)
Induces Intestinal Alkaline Phosphatase Gene Expression**

Mayu HARAICAWA, Natsuko SOGABE, Rieko TANABE,
Takayuki HOSOI and Masae GOSEKI-SONE

Vitamin K₁ (Phylloquinone) or Vitamin K₂ (Menaquinone-4) Induces Intestinal Alkaline Phosphatase Gene Expression

Mayu HARAICAWA¹, Natsuko SOGABE², Rieko TANABE¹,
Takayuki HOSOI³ and Masae GOSEKI-SONE^{1,*}

¹Division of Nutrition, Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Sciences and Design, Japan Women's University, 2-8-1, Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

²Department of Health and Nutrition Sciences, Faculty of Human Health, Komazawa Women's University, 238, Sakahama, Inagi, Tokyo 206-8511, Japan

³Department of Clinical Research and Development, National Center for Geriatrics and Gerontology, 35, Gengo, Morioka-machi, Obu, Aichi 474-8511, Japan

(Received December 20, 2010)

Summary Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes a variety of monophosphate esters into inorganic acid and alcohol at a high optimum pH (pH 8–10). Previously, we identified a significant increase of intestinal ALP (IAP) activity in the rat intestine on long-term dietary vitamin K supplementation. However, it was unclear whether the induction of ALP gene expression was caused by vitamin K intake. In the present study, we examined the effects of vitamin K on IAP gene expression. A total of 21 male ICR strain mice (7 wk old) were divided into three groups: control, PK, and MK groups. Mice were orally administered a 0.1-mL solution of physiological saline in the control group, phylloquinone (3 mg/kg mouse) in the PK group, and menaquinone-4 (3 mg/kg mouse) in the MK group. Four hours after administration, we determined the ALP activity of the intestinal mucosa in three areas (duodenum, jejunum, and ileum). In the MK groups, the levels of ALP activity in the jejunum increased significantly compared with the control. Moreover, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using specific primers revealed that IAP mRNA expression was significantly enhanced in the jejunum in both PK and MK groups. Interestingly, vitamin K administration also increased the expression of pregnane X receptor mRNA. This is the first report concerning IAP mRNA expression induced by oral administration of vitamin K. The results support the possible involvement of vitamin K in the regulation of IAP mRNA expression as a novel pharmacological effect of vitamin K.

Key Words alkaline phosphatase, phylloquinone, menaquinone, mice, intestine

Alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1) is an enzyme containing zinc which hydrolyzes monophosphate esters into inorganic phosphoric acid and alcohol at a high optimal pH (pH 8–10). The enzyme is distributed widely throughout the living world from bacteria to animals, excluding plants, and it exists in various tissues such as the intestine, liver, kidney, bone, placenta, stomach, and leukocytes.

In humans, four kinds of ALP isozyme have been identified: tissue-nonspecific ALP (liver/bone/kidney: TNSALP), intestinal ALP (IAP), placental ALP, and germ cell ALP (1–4). The TNSALP gene is located on chromosome 1 and consists of 12 exons and 11 introns, with the coding sequence beginning in the second exon.

A single gene for human IAP has been isolated, and the multiple forms of mRNA encoding human IAP are due to differences in polyadenylation (2). Although most species express a single IAP, several kinds of IAP have been identified in three species: the mouse (5), rat (6, 7), and cow (8).

In rats, ALP is classified into two types: TNSALP and IAP. IAP is present in the membrane surrounding neutral fat droplets in the microvilli of the intestinal mucosa during fat absorption, and is thought to transport dietary lipids from the intestinal tract into the circulation as a component of unilamellar membranes called surfactant-like particles (SLPs) (9). Two different cDNA clones, IAP-I and IAP-II, for rat IAP were isolated by Lowe et al. (6) and Strom et al. (7), respectively. Strom et al. found that the expression of IAP-II mRNA was specifically enhanced by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ administration. The two isozymes are products of two distinct genes and their cDNA sequences show 79% homology at the amino acid level. Functional differences between IAP-I and IAP-II were suggested by the differing regulation of the expression of the two mRNAs (10), as well as by structural and catalytic differences (11).

In mice, five different ALP loci have been identified: TNSALP, IAP, embryonic ALP (EAP), *Akp6*, and *Akp-ps1*. These ALP genes code for different proteins: *Akp2* encodes TNSALP, *Akp3* encodes IAP, *Akp5* encodes EAP, *Akp6* encodes a novel IAP-like isozyme expressed globally in the gut (thus called gIAP), and *Akp-ps1* encodes

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp

the inactive pseudo-type ALP (5, 7).

Previously, we reported the enhanced effects of vitamin K on IAP activity in rats (12). Sprague-Dawley rats (6 wk old) were divided into three groups: a control (AIN-93M diet), phylloquinone (PK: 600 mg/kg diet), and menaquinone-4 (MK-4: 600 mg/kg diet) diet group. After 3 mo of feeding of vitamin K, the animals were fasted overnight. The small intestine was removed and divided into five segments. In each segment, both PK and MK-4 increased IAP activity (12).

Vitamin K acts as a cofactor for γ -glutamyl carboxylase (GGCX), and is well-known to participate in the activation of blood coagulation factors and bone mineralization (13). All forms of vitamin K have 1,4-naphthoquinone as a common ring structure, and natural vitamin K exists in two molecular forms, vitamin K₁ (phylloquinone: PK) and vitamin K₂ (menaquinone: MK-*n*). PK is abundant in green vegetables in a compound with a phytyl side chain. Vitamin K₂ is classified into MK-1–14 due to the repeat structure of the side chain, with isopren comprising the side chain. MK-4 shows marked physiological activities as a vitamin K, and is included in many animal-based foods such as meat. Recent studies have demonstrated the possibility that vitamin K regulates the expression of bone-related genes such as ALP through steroid X receptor (SXR), also termed pregnane X receptor: PXR (14).

In the present study, we examined whether the enhancing effect of PK or MK-4 administration on IAP activity occurs via the intestinal mucosa directly, and we revealed the effects of the oral administration of PK or MK-4 on the expression of IAPs (*Akp3* and *Akp6*) and PXR in the mouse intestine.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals. The care and use of mice in the present study followed the guidelines of governmental legislation in Japan on the proper use of laboratory animals, and the study protocol was approved by the Institutional Review Board of Japan Women's University. A total of 21 male ICR strain mice (7 wk old) were used (31.1 ± 0.2 g). They were fasted overnight with free access to water. On the following day, the animals were given 0.1 mL of solution via an intragastric tube: vehicle (physiological saline) for the control group (Cont.), PK (3 mg/kg mouse) for the PK group, and MK-4 (3 mg/kg mouse) for the MK group. The molecular weights of PK (C₃₁H₄₆O₂: MW=450.7) and MK-4 (C₃₁H₄₀O₂: MW=444.7) are very similar. PK and MK-4 were kindly supplied by Eisai Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Serum and tissue sampling. Four hours after administration, blood was collected from the abdominal aorta under ether anesthesia, and perfusion with saline was performed until the liver was blanched, in order to minimize the blood contamination of tissue samples. The small intestine was removed and divided into three regions. From the pylorus, we took the first 1 cm as the duodenum, and then separated the remaining part into the jejunum and ileum. The segments were slit longitudinally, rinsed with ice-cold saline, and scraped from the

mice just after dissection. Each sample was homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica, Switzerland) with 10 mM Tris-buffered saline containing 1% Triton X-100 (pH 7.3) and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). The supernatant obtained after centrifugation at $7,000 \times g$ for 15 min was used as the enzyme extract.

Enzyme assay. ALP activity was determined with 10 mM *p*-nitro-phenylphosphate as a substrate in 100 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol HCl buffer containing 5 mM MgCl₂, pH 10.0, at 37°C, as previously reported (15). To analyze the biochemical properties of ALP, an inhibitory assay using levamisole (Lev) and L-phenylalanine (L-Phe) and a thermostability assay were performed, as previously described (15).

The enzyme activity was defined as the rate of hydrolysis of *p*-nitro-phenylphosphate and expressed in units (U = μ mol *p*-nitro-phenol formed/min).

Protein concentrations were determined using BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) was carried out according to the method of Weber et al. (16). After electrophoresis, ALP isozymes separated in the gel were stained by the coupling of β -naphthyl-phosphoric acid monosodium salt with Fast Violet B salt (17).

RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA from the intestinal mucosa was extracted employing the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (18). As a template for PCR, single-strand cDNA was prepared from 1 μ g of total RNA using Ready-to-go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England). PCR primers were used for *Akp3* (19), *Akp2* (20), *Akp5* (21), and PXR (22). In order to detect *Akp6*, sense (*Akp6*-up) and anti-sense (*Akp6*-down) primers were designed on the basis of the *Akp6* nucleotide sequence (GenBank: NCBI sequence data: AK008000). *Akp6*-up spans nucleotide positions 882–902 and *Akp6*-down spans 1,333–1,354 (23). The PCR conditions were as follows: 5 cycles at 94°C (1 min), 50°C (1 min), and 72°C (1 min), and 25 cycles at 94°C (30 s), 55°C (30 s), and 72°C (30 s), followed by 10 min at 72°C. Negative controls were performed with each RT-PCR reaction, omitting the template. The efficiency of reverse transcription was verified by the detection of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, forward: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', reverse: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'), as previously described (23).

The amplified samples were analyzed using 5.25% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The gels were stained with ethidium bromide and observed under UV light. The band intensity on PCR photographs was quantified by densitometry (AE6920M, ATTO, Tokyo, Japan). The PCR product was normalized to the intensity of the band for the house-keeping gene GAPDH, and is expressed as a ratio of the relative band intensity.