高脂肪食摂取ラットにおけるビタミンD制限が アルカリホスファターゼ活性に及ぼす影響

中岡 加奈絵¹, 田辺 里枝子¹, 奥 裕 乃¹, 山田 麻子¹
野田 聖子¹, 星野 亜由美¹, 祓 川 摩 有², 五関-曾根 正江^{*,1}

(2015年9月28日受付; 2016年1月5日受理)

要旨: 高脂肪食におけるビタミンD制限によるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性への影響について検討した。11週齢SD系雄ラットをコントロール食 (C) 群, ビタミンD制限食 (DR) 群, 高脂肪食 (F) 群, 高脂肪食でビタミンDを制限した食餌を与えた (FDR) 群の計4群に分けた。実験食開始28日後に, 大腿骨のALP活性は, DR群がC群と比べて有意に低値を示し, FDR群もF群と比べて有意に低値を示した。また, 十二指腸のALP活性においては, FDR群がF群と比べて有意に低値を示した。小腸ALPは, 腸内細菌由来のリポ多糖 (LPS) などを脱リン酸化して解毒していることが示唆されており, 高脂肪食摂取時におけるビタミンD制限が小腸ALP活性を低下させることにより, 腸内ホメオスタシスに影響を及ぼしている可能性が考えられた。

キーワード: ビタミンD, 高脂肪食, アルカリホスファターゼ, 小腸, 大腿骨

近年, 脂質摂取量の増加や肥満, ライフスタイルの変化などによって, メタボリックシンドロームが増加している¹⁾。メタボリックシンドロームは, 内臓脂肪型肥満に加えて, 高血糖, 高血圧, 脂質異常のうちいずれか2つ以上を合わせもった状態で, 動脈硬化性疾患の危険性を高める複合型リスク症候群と定義されている²⁾。また, 高脂肪食によって, 代謝性内毒素血症³⁾や腸の炎症⁴⁾が誘発されることなども報告されている。

ビタミンDは, 骨代謝に深く関わる栄養素の1つであり, 主に腸管からのカルシウムとリンの吸収促進に関与している⁵⁾。ビタミンD作用不足状態が長期に続くと骨石灰化障害や骨密度の低下を招き, 骨折リスクが高まる。ビタミンDの不足は骨格筋の萎縮や筋力の低下にも関与しており⁶⁾, 一定量のビタミンDを摂取することや一定以上の血清ビタミンD濃度を保つことで, 転倒リスクを軽減あるいは身体運動機能を維持することができると報告されている⁷⁾。また, ビタミンDは骨や筋肉などの運動器以外にも重要な役割を果たしていることから, ビタミンD不足が, 自己免疫性疾患, 心血管性疾患, 2型糖尿病, 高血圧, 一部の癌などの疾患やメタボリックシンドロームの発症リスクを高めることが示唆されている⁸⁾。このようにビタミンDの重要性が報告されている一方で, 加齢に伴いビタミンD欠乏のリスクが上昇すること, また, そのリスクファクター

として, 食事からのビタミンD摂取量の減少, 紫外線による皮膚でのビタミンD合成量の低下などが挙げられている⁹⁾。

アルカリホスファターゼ (ALP, EC 3.1.3.1) は細胞膜に存在する糖タンパク質で, アルカリ性 (pH 8-10) でリン酸エステルを無機リンとアルコールに加水分解する反応を触媒する亜鉛含有酵素である。ALPは基質特異性が低く, ほとんど全ての低分子リン酸モノエステル化合物とピロリン酸結合を加水分解する。ヒトのALPは, 骨や肝臓, 腎臓などに存在する組織非特異型ALP (TNSALP), 小腸に存在する小腸型ALP (IAP), 胎盤型ALP, 生殖細胞型ALPの少なくとも4種類のアイソザイムに分類されている¹⁰⁻¹³⁾。いずれのアイソザイムにおいても, リン酸化合物を加水分解して無機リン酸を提供することで, リン酸代謝に関わっており, 共通の生理的機能を有することが推察されている。TNSALP遺伝子の欠損により引き起こされる低ホスファターゼ症 (HPP) の研究から, TNSALPは骨組織において, 石灰化に深く関与していることが示されている¹⁴⁻¹⁶⁾。

小腸に存在するIAPについては, 小腸上皮細胞の刷子縁膜に高濃度に存在し, 脂質やラクトースなどにより活性が上昇することが報告されており¹⁷⁻¹⁹⁾, 食餌性因子, 脂質代謝との関連が深いことが示唆されている。また, 小腸のALPは腸内細菌由来のリポ多糖 (LPS) などを

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ 日本女子大学家政学部食物学科 (112-8681 東京都文京区目白台2-8-1)

² 聖徳大学児童学部児童学科 (271-8555 千葉県松戸市岩瀬550)

脱リン酸化して解毒することにより、消化管由来の全身性炎症を予防する重要な役割を担っている可能性が示されている²⁰⁾。これまでに、ビタミンD欠乏によるIAP活性の低下を示した報告²¹⁾があるが、高脂肪食摂取時におけるビタミンD制限によるIAP活性へ及ぼす影響についての検討は行われていなかった。

そこで今回、高脂肪食摂取時でのビタミンD制限による、骨組織や小腸のALPへの影響について検討することを目的とした。ビタミンDの制限がALPへ及ぼす作用について検討することは、ALPの機能解明だけでなく、ビタミンDによるリン代謝や脂質代謝、腸管における生体の防御と恒常性の維持などの生体内での役割についても、新たな証拠が得られることが期待され、メタボリックシンドロームや生活習慣病の予防の観点からも重要であると考えられた。

実験方法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物には10週齢SD系雄ラット24匹を用いた。飼料組成は、米国国立栄養研究所により発表された、げっ歯類の実験動物用飼料のスタンダードである、AIN-93M組成を基準とした²²⁾。7日間の予備飼育の後、AIN-93Mを与える基準食(C)群、基準食のVitamin Mix(AIN-93-VM)からビタミンDを除去した食餌を与えるDR群、基準食のコーンスターチの一部をラードに置き換え(160 g/kg diet)、脂質エネルギー比率を約40%に調整した高脂肪食(F)群、高脂肪食に基準食のVitamin MixからビタミンDを除去した食餌を与えるFDR群の計4群とした。DR群、F群、FDR群の各群において、C群の基準食と同様にカルシウムは飼料重量の0.5%、リンは0.3%とした。なお、カゼインはビタミンフリーカゼイン(オリエンタル酵母社製、ビタミンD含量0.75 µg/100 g未満)を用いたが、ラードにもビタミンDが少量含まれているため(ビタミンD含量: 0.2 µg/100 g)、各飼料100 gあたりのビタミンD含有量は、C群が2.5 µg、DR群が0.75 µg未満、F群が2.82 µg、FDR群が0.32 µg以上0.97 µg未満と算定された。

動物は室温23±1℃、湿度50±5%、12時間ごとの明暗サイクル(明期7:00 a.m.~7:00 p.m.)の環境下で飼育し、飼料、脱イオン水は自由摂取させた。飼育期間中、飼料摂取量および体重を測定した。実験食投与開始後28日後に各群6匹を解剖した。動物は一晩絶食させた後、麻酔下で腹部大動脈より採血した。

なお、本実験は日本女子大学動物実験委員会の承認を受けた研究である(承認番号: II 07-03)。

2. 血清生化学検査

採取した血液を遠心分離(1,000×g, 10 min)し、上清を血清サンプルとした。その後、総タンパク質(TP)はBiuret法²³⁾、総コレステロール(T-Cho)は酵素法²⁴⁾、トリグリセリド(TG)はGK-GPO(glycerokinase-

glycerol-3-phosphate oxidase)法²⁵⁾、カルシウム(Ca)はOCPC法²⁶⁾、無機リン(P)は*p*-methylaninophenol法²⁷⁾、ALP活性はBessey-Lowry法²⁸⁾により測定した。

3. 各組織中のALP比活性測定

採血後のラットから採取した大腿骨は骨髄を除去した後、生理的食塩水で洗浄し、-80℃にて保存した。十二指腸、空腸、回腸は、それぞれ縦に切開し、生理的食塩水で洗浄し、スクレープしたものを小腸粘膜サンプルとした。なお、小腸については胃幽門部から3 cmを十二指腸サンプルとした。さらに、その後盲腸までを上部1/2を空腸、下部1/2を回腸とし、さらに空腸と回腸をそれぞれ2等分し、胃幽門部側から順に空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部とした。ALPの抽出およびALP活性測定は、既報に従った²⁹⁾。タンパク質含量はBCA Protein Assay Kit (PIERCE, IL, U.S.A.)を使用して測定した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 存在下にて、10%ポリアクリルアミドゲル(プレキャストゲル Cat. 161-J321V, Bio-Rad Laboratories, USA)による電気泳動を行った³⁰⁾。分子量Standardには、Precision Plus Protein™ Standards (Bio Rad Laboratories, USA)を用いた。ALP抽出サンプルはタンパク質濃度2 mg/mLに調整し、ALP活性が失活しないように煮沸処理はせずに、そのまま電気泳動用サンプルとして用いた。電気泳動後のゲルについて、Fast Violet B saltを用いて、β-ナフチルリン酸法³¹⁾にてALP活性染色を行った。

また、IAPは耐熱性であり、加熱による阻害実験により易熱性の骨組織由来のALPと識別することができるため、電気泳動前のALP抽出サンプルについて、加熱処理(56℃, 10 min)後に電気泳動し、電気泳動後のゲルについてALP活性染色を行い、未処理のサンプルと比較した¹⁷⁾。

5. 統計処理

統計の分析には、統計ソフトIBM SPSS Statistics 22(日本アイ・ビー・エム(株))を使用した。データは、4群別に平均±標準誤差(mean±S.E.)で示した。各データは、C群とDR群、C群とF群、F群とFDR群の3通りの比較について、それぞれ2群間のStudent's *t*検定を適用し、検定の多重性については、Bonferroni法を用いて調整した。すなわち、結果で報告されている*p*値は*t*検定による両側*p*値であり、有意性の判定は、*p*値と有意水準5/3=1.67%の比較により行った。

結 果

1. 体重およびエネルギー摂取量

実験食開始28日後の最終体重は、C群は506.3±12.8 g、DR群は492.5±10.0 g、F群は518.0±6.2 g、FDR群は519.2±11.6 g (mean±S.E.) (*n*=6)であり、C群とDR群、F群とFDR群、いずれの群間において

も有意な差は認められなかった。また、体重増加量、エネルギー摂取量、エネルギー効率のそれぞれの値についても、C群とDR群、F群とFDR群、いずれの群間においても有意な差は認められなかった(データは示さず)。

2. 血清生化学検査

実験食開始28日後の血清のALP活性を測定した結果、C群は 400.3 ± 0.9 U/L、DR群は 367.0 ± 9.2 U/L、F群は 384.5 ± 12.3 U/L、FDR群は 358.8 ± 3.9 U/Lであり(mean $\pm$ S.E.) ($n=6$)、DR群はC群に比べ有意に低値を示した($p < 0.01$)。

血清Ca濃度を測定した結果、C群は 9.9 ± 0.1 mg/dL、DR群は 9.8 ± 0.1 mg/dL、F群は 9.9 ± 0.0 mg/dL、FDR群は 9.8 ± 0.1 mg/dLであり、各群間において有意な差は認められなかった。血清P濃度を測定した結果、C群は 6.5 ± 0.2 mg/dL、DR群は 6.6 ± 0.1 mg/dL、F群は 6.5 ± 0.1 mg/dL、FDR群は 6.6 ± 0.3 mg/dLであり、各群間において有意な差は認められなかった。また、血清TP、T-Cho、TGのそれぞれの値においても、C群とDR群、C群とF群、あるいはF群とFDR群、いずれの群間においても有意な差は認められなかった(データは示さず)。

3. 各組織中のALP活性

Figure 1, Figure 2A, Table 1に、骨組織ならびに小腸のALP活性の結果を示した。

大腿骨のALP比活性は、実験食投与開始28日後において、DR群がC群に比べて有意な低値を示し($p < 0.0167$)、FDR群もF群に比べて有意な低値を示した(p

Figure 1 ALP-specific activity of the femur. Results are the means $\pm$ S.E. ($n=6$). C: basal control diet group, DR: vitamin D-restricted basal diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted high-fat diet group. Significant difference between F or DR and C groups (*: $p < 0.0167$, Student's *t*-test with Bonferroni's modification). Significant difference between F and FDR groups (##: $p < 0.01$).

< 0.01). さらにF群はC群に比べて有意な低値を示した($p < 0.0167$) (Figure 1)。

十二指腸のALP比活性は、Figure 2Aに示したように実験食投与開始28日後で、FDR群がF群に比べて有意に低値を示した($p < 0.01$)。

さらに、空腸および回腸におけるALP比活性については、Table 1に示した通りである。空腸上部において、DR群はC群と比べて有意に低値を示した($p < 0.001$)。さらに、空腸下部において、DR群はC群と比べて有意に低値を示し($p < 0.01$)、FDR群もF群と比べて有意に低値を示した($p < 0.01$)。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

十二指腸のALP抽出サンプルについて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。

Figure 2 A: ALP-specific activity of the duodenum. Results are the means $\pm$ S.E. ($n=6$). C: basal control diet group, DR: vitamin D-restricted basal diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted high-fat diet group. Significant difference between F and FDR groups (##: $p < 0.01$). B: Rat intestinal ALP isozymes of the duodenum separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained for ALP activity with a β -naphthyl-phosphoric acid monosodium salt, Fast violet B salt. C: basal control diet group, DR: vitamin D-restricted basal diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted high-fat diet group.

Table 1 ALP-specific activity of the upper jejunum, lower jejunum, upper ileum, and lower ileum.

Groups	Upper jejunum (U/mg protein)		Lower jejunum (U/mg protein)		Upper ileum (U/mg protein)	Lower ileum (U/mg protein)
C	1.48 ± 0.14	***	0.18 ± 0.02	**	0.22 ± 0.03	0.28 ± 0.04
DR	0.57 ± 0.08		0.10 ± 0.01		0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.04
F	0.96 ± 0.18	##	0.14 ± 0.01	##	0.31 ± 0.05	0.25 ± 0.03
FDR	0.51 ± 0.08		0.10 ± 0.01		0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.03

Results are the means ± S.E. ($n=6$). C: basal control diet group, DR: vitamin D-restricted basal diet group, F: high-fat diet group, FDR: vitamin D-restricted high-fat diet group. Significant difference between DR and C groups (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). Significant difference between F and FDR groups (##: $p < 0.01$).

Figure 2B に示した通り、十二指腸において、主に 2 本のバンドが検出され、それぞれの分子量は 110 kDa, 100 kDa と算定された。C 群では 110 kDa, 100 kDa の主要な 2 本の ALP 活性のバンドが示され、高脂肪食摂取の F 群でも 110 kDa, 100 kDa の主要な 2 本の ALP 活性のバンドが示された。一方、ビタミン D 制限食により、DR 群で 110 kDa と 100 kDa の 2 本の ALP 活性のバンドが認められたが、FDR 群においては、110 kDa の ALP 活性のバンドはほとんど検出されず、100 kDa の ALP 活性のバンドのみが認められた。

考 察

本研究では、高脂肪食摂取時におけるビタミン D 制限による骨組織ならびに小腸の ALP 活性への影響について検討を行った。

ヒトにおいては、4 種類の ALP アイソザイムが報告されているが、ラットでは、骨組織などに存在する TNSALP と小腸に存在する IAP の 2 種類の ALP アイソザイムに分類されている。TNSALP の生理機能については、TNSALP 遺伝子のノックアウトマウスの研究から骨の石灰化における重要な役割が示されている³²⁾³³⁾。すなわち、TNSALP に分類される ALPs の中でも、骨組織中の TNSALP (骨型 ALP) は骨芽細胞で産生され、ハイドロキシアパタイト結晶の形成を阻害するピロリン酸を分解することにより石灰化を促進しており³²⁾、骨形成マーカーの 1 つである。Figure 1 に示したように、実験食開始 28 日後の大腿骨の ALP 比活性において、F 群が C 群に比べて有意な低値を示し ($p < 0.0167$)、高脂肪食が骨組織中の ALP 活性を減少させ、骨形成を抑制していることが示唆された。ビタミン D 制限により DR 群では C 群に比べて有意な低値を示し ($p < 0.0167$)、高脂肪食において、FDR 群では F 群に比べて顕著な低値を示した ($p < 0.01$)。これらの結果から、高脂肪食におけるビタミン D 制限は、骨組織中の ALP 活性を顕著に低下させて、骨形成を抑制していることが推察された。また、ビタミン D の制限により、血清の Ca 濃度が低下する可能性が考えられたが、血清 Ca 濃度は各群間で有意差はなく、いずれも正常範囲にあり、副甲状腺ホ

ルモンにより骨吸収が起きて、血清の Ca 濃度が一定に保持されていることが推定された。今後は、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、活性型ビタミン D などの血中カルシウム濃度調節ホルモンについても測定し、詳しく検討する必要があると考えられる。

IAP の生理的機能については未だ不明な点が多く残されているが、小腸 ALP のノックアウトマウスにおいて、野生型マウスに比べて、高脂肪食摂取時における体重の増加や血清トリグリセリドの上昇などが観察されており、IAP が脂質代謝に深く関わっていることが示されている³⁴⁾。さらに、Kaliannan *et al.*²⁰⁾ は、IAP をマウスに摂取させることにより、メタボリックシンドロームが改善されたことを報告した。また、IAP は腸内細菌由来のリポ多糖 (LPS) などを脱リン酸化して解毒することにより、腸管における炎症を抑えて生体の防御と恒常性の維持に重要な役割を果たしていることも示されている²⁰⁾。

Figure 2A に示したように、実験食開始 28 日後の十二指腸の ALP 比活性において、高脂肪食におけるビタミン D 制限により、FDR 群は F 群に比べて顕著な低値を示した ($p < 0.01$)。また、Table 1 に示したように、空腸下部において、ビタミン D 制限により DR 群では C 群に比べて低値を示した ($p < 0.01$)。さらに高脂肪食においても、FDR 群では F 群に比べて低値を示し ($p < 0.01$)、高脂肪食におけるビタミン D の制限が小腸 ALP 活性を低下させることが明らかになった。

ラットの IAP として、2 種類の cDNA (IAP-I, IAP-II) が報告されており、アミノ酸レベルの相同性は約 79% で、2 種類の mRNA (IAP-I, IAP-II) が検出されている³⁵⁾³⁶⁾。また、それぞれの mRNA の大きさは IAP-I が 2.7 kb, IAP-II が 3.0 kb であることも示されている。IAP-I は小腸全域に存在しており、一方、IAP-II は小腸上部に局在している。IAP-I および IAP-II 共に、脂肪食投与により小腸 ALP 活性の上昇が認められており、これらのアイソザイムには遺伝子およびタンパク質構造の違いだけでなく、5' 側の 5' 側の上流領域の違いによる発現調節の相違が推察されている。

Figure 2B に示したように、十二指腸の ALP 抽出サン

プルについて、SDS-PAGE解析を行ったところ、分子量110 kDaおよび100 kDaの2本のバンドが検出された。C群、F群、DR群のいずれにおいても110 kDa、100 kDaの主要な2本のALP活性のバンドが示されたが、FDR群においては、110 kDaのALP活性のバンドはほとんど認められず、100 kDaのALP活性のバンド1本のみが示された。また、IAPは耐熱性であり、加熱による阻害実験により易熱性の骨組織由来のALPと識別することができるため、電気泳動前のALP抽出サンプルについて、加熱処理（56℃、10 min）を行った。その結果、加熱処理によりALP活性のバンドは消失せず、2本のバンドとも耐熱性のIAPであることが推察された（データは示さず）。

IAPについては、膜結合型と可溶型があり、分子量の大きさから110 kDaと100 kDaの2本のバンドは、それぞれ膜結合型（IAP-II）と可溶型（IAP-I）であることが推定された。さらに、Table 1に示したように、十二指腸だけでなく、空腸や回腸上部においても、高脂肪食におけるビタミンD制限でALP活性の低下が認められた。

これまでに、ビタミンD欠乏食で飼育したラットにおいて、小腸の絨毛の長さが正常食飼育群の動物に比べ著しく短くなり、ビタミンD投与により正常な長さまで回復することが報告されている³⁷⁾。ビタミンD欠乏動物では、細胞増殖や分化調節機能の変化により、小腸微絨毛の長さが短くなり細胞機能が全体的に低下していることが考えられ、今回の高脂肪食摂取時のビタミンD制限が、小腸ALPへ特異的に及ぼす作用なのか、あるいは他の酵素の活性も低下させているのかなどについて、今後検討していく必要がある。

本研究において、高脂肪食におけるビタミンDの制限が骨組織や小腸のALP活性を減少させることを初めて明らかにすることができた。ビタミンDの制限は、骨代謝だけでなく小腸におけるリン代謝や脂質代謝、さらに腸管における抗炎症作用やホメオスタシス維持にも強く影響を及ぼして、メタボリックシンドローム発症リスクを高めている可能性が示唆された。今後さらにALP活性制御メカニズムについて詳細な検討を進めて、ビタミンDや他の栄養因子との関連を明らかにすることにより、メタボリックシンドロームや生活習慣病発症リスクの回避につながることを期待されよう。

本研究の一部は、JSPS 科研費（24300259）の助成を受けたものである。

文 献

- 1) Kaur J (2014) A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* **94**: 3162.
- 2) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会 (2005) メタボリックシンドロームの定義と診断基準. 日本内科学会雑誌 **94**(4), 188-203.
- 3) Pendyala S, Walker JM, Holt PR (2012) A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* **142**: 1100-1101. e1102.
- 4) Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, Jobin C, Lund PK (2010) High-fat diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS ONE* **5**: e12191.
- 5) Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989) The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* **320**: 980-91.
- 6) Sanders KM, Scott D, Ebeling PR (2014) Vitamin D deficiency and its role in muscle-bone interactions in the elderly. *Curr Osteoporos Rep* **12**: 74-81.
- 7) Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, Wong JB, Egli A, Kiel DP, Henschkowski J (2009) Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* **339**: b3692.
- 8) Holick MF (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **80**: 1678S-88S.
- 9) Meehan M, Penckofer S (2014) The role of vitamin D in the aging adult. *J Aging Gerontol* **2**: 60-71.
- 10) Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988) Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12002-10.
- 11) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H (1988) Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12011-9.
- 12) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M (1988) Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene, evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution. *J Biol Chem* **263**: 12020-7.
- 13) Shen LP, Liu H, Kan YW, Kam W (1988) 5' nucleotide sequence of a putative human placental alkaline phosphatase-like gene. *Nucleic Acids Res* **16**: 5694.
- 14) Whyte MP (2010) Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann NY Acad Sci* **1192**: 190-200.
- 15) Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP (1992) Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9924-8.
- 16) Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida S (1998) Hypophosphatasia: Expression of the mutant (1735T-DEL) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. *J Bone Miner Res* **13**: 1827-34.

- 17) Goseki-Sone M, Oida S, Iimura T, Yamamoto A, Matsumoto HN, Omi N, Takeda K, Maruoka Y, Ezawa I, Sasaki S (1996) Expression of mRNA encoding intestinal type alkaline phosphatase in rat liver and its increase by fat-feeding. *Liver* **16**: 358–64.
 - 18) Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M (2004) Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* **35**: 249–55.
 - 19) Sogabe N, Maruyama R, Hosoi T, Goseki-Sone M (2007) Enhancement effects of vitamin K₁ (phyloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**: 219–24.
 - 20) Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, Malo NS, Ray M, Abtahi SM, Muhammad N, Raychowdhury A, Teshager A, Mohamed MM, Moss AK, Ahmed R, Hakimian S, Narisawa S, Millán JL, Hohmann E, Warren HS, Bhan AK, Malo MS, Hodin RA (2013) Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 7003–8.
 - 21) Dupuis Y, Tardivel S, Ranivosoa A, Fournier P, Razanamaniraka L, Zelazowska E, Porembska Z (1990) The effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol on the ratio of two alkaline phosphatase subunits of Mr 90000 and 65000 in adult rat intestine. *Acta Biocim Pol* **37**: 191–6.
 - 22) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939–51.
 - 23) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751–66.
 - 24) Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20**: 470–5.
 - 25) Spayd RW, Bruschi B, Burdick BA, Dappen GM, Eikenberry JN, Esders TW, Figueras J, Goodhue CT, LaRossa DD, Nelson RW, Rand RN, Wu TW (1978) Multilayer film elements for clinical analysis: Applications to representative chemical determinations. *Clin Chem* **24**: 1343–50.
 - 26) Hillel JG (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* **18**: 521–31.
 - 27) Drewes PA (1972) Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin Chim Acta* **39**: 81–8.
 - 28) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* **164**: 321–9.
 - 29) Goseki MS, Omi N, Yamamoto A, Oida S, Ezawa I, Sasaki S (1996) Ovariectomy decreases osteogenetic activity in rat bone. *J Nutr Sci Vitaminol* **42**: 55–67.
 - 30) Weber K, Prengle LR, Osborn M (1972) Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* **26**: 3–27.
 - 31) Kurahashi Y, Yoshiki S (1972) Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. *Arch Oral Biol* **17**: 155–63.
 - 32) Millán JL (2006) Mammalian alkaline phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
 - 33) Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millán JL, MacGregor GR, Whyte MP (1999) Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* **14**: 2015–26.
 - 34) Nakano T, Inoue I, Koyama I, Kanazawa K, Nakamura K, Narisawa S, Tanaka K, Akita M, Masuyama T, Seo M, Hokari S, Katayama S, Alpers DH, Millán JL, Komoda T (2007) Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**: G1439–49.
 - 35) Lowe M, Strauss AW, Alpers R, Seetharam S, Alpers DH (1990) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta* **1037**: 170–7.
 - 36) Strom M, Krisinger J, DeLuca HF (1991) Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 299–304.
 - 37) Birge SJ, Alpers DH (1973) Stimulation of intestinal mucosal proliferation by vitamin D. *Gastroenterology* **64**: 977–82.
-

J Jpn Soc Nutr Food Sci **69**: 57–63 (2016)

Research Note

Influences of Vitamin D Restriction on Alkaline Phosphatase Activity in Rats Fed a High-fat Diet

Kanae Nakaoka,¹ Rieko Tanabe,¹ Yuno Oku,¹ Asako Yamada,¹ Seiko Noda,¹
Ayumi Hoshino,¹ Mayu Haraikawa,² and Masae Goseki-Sone^{*,1}

(Received September 28, 2015; Accepted January 5, 2016)

Summary: This study investigated the influences of vitamin D restriction on alkaline phosphatase (ALP) activity in rats fed a high-fat diet. Male Sprague-Dawley rats (11 weeks old) were divided into four groups: those fed a basic control diet (C), those fed a basic control diet with vitamin D restriction (DR), those fed a high-fat diet (F), and those fed a high-fat diet with vitamin D restriction (FDR). At 28 days after starting the experimental diet, ALP-specific activity in the femur had decreased significantly in the DR group relative to the C group, and also in the FDR group relative to the F group. Furthermore, the ALP-specific activity in the duodenum had decreased significantly in the FDR group relative to the F group. As it has been suggested previously that intestinal ALP detoxifies a variety of bacterial toxins including LPS and prevents metabolic syndrome, our findings indicate that restriction of vitamin D in a high-fat diet may influence gut homeostasis by decreasing the level of ALP activity.

Key words: vitamin D, high-fat diet, alkaline phosphatase, intestine, femur

* Corresponding author (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ 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

² Department of Child Studies, Faculty of Child Studies, Seitoku University, 550 Iwase, Matsudo, Chiba 271-8555, Japan