

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

平成 16～18 年度 総合研究報告書

11. 日本人の食事摂取基準の策定を目的とした血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度
定量法の開発と脂溶性ビタミンの潜在性欠乏に関する評価

分担研究者	岡野 登志夫	神戸薬科大学	教授
研究協力者	鎌尾 まや	神戸薬科大学	助手
研究協力者	須原 義智	神戸薬科大学	講師
研究協力者	津川 尚子	神戸薬科大学	講師

研究要旨

日本人の脂溶性ビタミンの栄養状態と食事摂取量との関係を示す栄養調査研究は少なく、食事摂取基準の策定には欧米のデータが中心に用いられている。この現状に鑑み、日本人の栄養調査データを集積することを目的として正確かつ高精度の血中及び母乳中の脂溶性ビタミン濃度の微量定量法の開発を行った。この方法を用いて、母乳中の脂溶性ビタミン濃度を測定し、乳児における脂溶性ビタミンの摂取量を評価するとともに、日本人の脂溶性ビタミン栄養について調査し潜在性欠乏に関する評価を行った。[平成 16 年度] 血中ビタミン K 濃度測定について新規定量法として LC-APCI/MS/MS 法の確立、蛍光 HPLC 法の改良法を確立するとともに、血中 25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D) 濃度について LC-APCI/MS/MS 法を用いた新規定量法を確立した。[平成 17 年度] 前年度に確立した LC-APCI/MS/MS による血中ビタミン K 及び 25(OH)D 濃度の測定法を発展させ、血中および母乳中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。一方、成人を対象とした脂溶性ビタミンの潜在性欠乏評価の一環として、骨に対するビタミン K の必要量を評価した。血中ビタミン K 濃度と骨代謝におけるビタミン K 栄養マーカーである非グラ化オステオカルシン (ucOC) 濃度を測定し、ucOC 濃度はビタミン K の不足マーカーとして利用できることを確認するとともに、骨におけるビタミン K 要求性が加齢的に高まることを示唆する結果を得た。また、骨折とビタミン K の関係を解析し、ビタミン K 不足が骨折の危険因子となる可能性を示唆する結果を得た。[平成 18 年度] 乳児の食事摂取基準策定に必要な摂取量を求める目的で、LC-APCI/MS/MS 法により健常授乳婦の母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定するとともに、授乳婦の血漿中脂溶性ビタミン濃度の測定および食事調査を実施した。また、思春期男女を対象にビタミン D およびビタミン K の栄養調査を行い、各々副甲状腺ホルモン (PTH) と非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) をビタミン D および K 栄養の潜在的不足マーカーとしてカットオフ値を評価した。ビタミン D の栄養調査では、血中 25(OH)D 濃度を 20 ng/mL 以上に維持することが望ましいという結論を得た。ビタミン K の栄養調査では、骨の健康を考慮に入れた場合には現在の目安量よりも 1.5 倍程度の摂取量が必要である可能性が示唆された。さらに、「ビタミン摂取量が血液中和尿中のビタミン含量に及ぼす影響～生活習慣一次予防のための生体飽和量を求める研究～」の一環として、脂溶性ビタミンでは摂取量の増加と血中濃度上昇との関係性を評価するとともに、ビタミン D については PTH 濃度を、ビタミン K については ucOC 濃度を不足のマーカーとして両ビタミンが充足する摂取量を評価した。

1. 血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の開発

1-1) LC-APCI/MS/MS 法による血中ビタミン K 濃度定量法の確立¹ (平成 16 年度)

【定量法】

血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質として¹⁸O-ラベル化したビタミン K を含むエタノール溶液¹⁾ 2.0 mL、精製水 0.5 mL、ヘキサン 3.0 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離する。ヘキサン層 2.5 mL を予めヘキサン 10 mL で膨潤させた Sep-Pak Silica に付加し、吸着物をヘキサン/エーテル (97 : 3、v/v) 5.0 mL により溶出させる。溶出液をロータリーエバポレーターで乾固させ、得られた残渣をエタノール 60 μL に溶解し、30 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MSⁱⁱⁱ⁾ に適用する。別に調製したビタミン K 標準溶液ⁱⁱ⁾ の分析を同時に行い、内部標準物質に対する標準ビタミン K のピーク面積比 (Qs) を算出し、検量線を作成する。検体の分析から同様に各々のピーク面積比 (Qt) を算出し、検量線より LC-APCI 分析時の濃度 A を求め、以下の計算により血中濃度を算出する。

血中ビタミン K 濃度 (ng/mL) = $A \times 36 / 250$

i) 内部標準物質を含むエタノール溶液 : 内部標準物質である MK-4-¹⁸O、PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O (図 1-1) をそれぞれ 3.2 ng/mL とするようエタノールに溶解する。

ii) ビタミン K 標準溶液 : MK-4、PK および MK-7 をエタノールに溶解し、各々の最終濃度が 200、100、50、25、12.5 ng/mL になるよう調製する。これらのビタミン K 標準溶

液には内部標準物質である MK-4-¹⁸O、PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O を各々 50 ng/mL 含むよう添加して調製する。

iii) HPLC 条件 :

カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 x 250 mm、5 μm、資生堂社製)

移動相 : [メタノール : 0.1%酢酸水溶液 (95 : 5)] : エタノール(100 : 0 ~ 55 : 45) (35 分間)

流速 : 1.0 mL/min

検出器 : API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

【定量精度の確認】

標準血清として和光純薬社製ヒトプール血清 (液状コントロール血清 I、Lot.No.DG118) および標準血清に内部標準物質 50 ng/mL を添加した試料について測定した。図 1-2 に示すように、標準液ならびに標準血清において各ビタミン K 類は単一ピークとして検出された。また、図 1-3 に示すように標準溶液の測定により良好な検量線が得られた。表 1-1 に検出限界及び標準血清を用いた精度評価の結果を示す。PK、MK-4、MK-7 とともに、日内変動、日差変動とともに RSD 値が低く、回収率もほぼ 100% を満たすことから、本定量法は精度の面においても満足出来るものであると判断した。

1-2) 蛍光検出 HPLC 法によるヒト血漿中ビタミン K 濃度の定量² (平成 16 年度)

【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、蒸留水 0.5

mLを加えて希釈した後、内部標準物質としてビタミンKの側鎖を飽和アルキル基に置換した2種類の合成誘導体(図1-4、各1 ng/50 μ Lエタノール)、エタノール1.9 mLおよびヘキサン3.0 mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌した。3,000 rpmで遠心分離した後、得られたヘキサン層2.5 mLを、あらかじめヘキサン10 mLで膨潤させたSep-Pak Silicaカートリッジ(Waters社製)に負荷し、ビタミンK画分をヘキサン/エーテル(97:3、v/v)5.0 mLにより溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をエタノール200 μ Lに溶解し、40 μ Lを以下の2種類の条件のHPLCに適用した。

HPLC条件1 (MK-4、I.S.-C16分析条件)

ポンプ：LC-10AD_{VP} (島津製作所社製)

オートインジェクター：SIL-10AD_{VP}
(島津製作所社製)

検出器：RF-10A_{XL} (島津製作所社製)

励起波長：320 nm

検出波長：430 nm

カラム：CAPCEL PAK C₁₈ UG120
(4.6 x 250 mm、5 μ m、資生堂社製)

移動相：メタノール/水(95:5、v/v)

流速：1.0 mL/min

HPLC条件2 (PK、MK-7、I.S.-C19分析条件)

ポンプ：LC-10AD_{VP} (島津製作所社製)

オートインジェクター：SIL-10AD_{VP}
(島津製作所社製)

検出器：RF-10A_{XL} (島津製作所社製)

励起波長：240 nm

検出波長：430 nm

カラム：CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 x 250 mm、5 μ m、資生堂社製)

移動相：メタノール/エタノール
(95:5、v/v)

流速：1.0 mL/min

MK-4の定量にはMK-4(1、5および10 ng/mL)、I.S.-C16(5 ng/mL)を含む標準溶液を、PK、MK-7の定量にはPK、MK-7(1、5および10 ng/mL)、I.S.-C19(5 ng/mL)を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象物質の濃度比に対してピーク面積比をプロットした検量線を作成し、以下の計算式よりビタミンK濃度を算出した。

血漿(血清)中ビタミンK濃度(ng/mL)
=RS/V

R：検量線より得られた内部標準物質に対するビタミンKの濃度比

S：内部標準物質の添加量(1 ng)

V：血漿(血清)量(0.5 mL)

【定量精度の確認】

標準溶液に対して作成した検量線は、HPLC条件1、2ともに2から500 pgの範囲で直線性を示した。また、検出限界はPKについては2 pg、MK-4、MK-7については4 pgと、十分な感度が得られた。

市販のヒトコントロール血清(和光純薬社製)に3段階の濃度のMK-4、PK、MK-7を添加して添加回収率を求めたところ、表1-2に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法におけるビタミンKの定量は十分な真度であると判断した。また、市販のヒトコントロール血清および健常人血漿を試料とした場合の日内変動および日差変

動は、ヒトコントロール血清の MK-7 を除いて 10%以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した (表 1-3)。ヒトコントロール血清の MK-7 において変動係数が大きくなった理由として、MK-7 濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

さらに、健常人 20 名および MK-4 を投薬されている骨粗鬆症患者 10 名の血漿中ビタミン K 濃度を本法および LC-APCI/MS/MS 法で測定した。その結果、表 1-4 に示す定量値が得られ、本法および LC-APCI/MS/MS 法の定量結果は良好な相関を示した (図 1-5)。従って、本法は LC-APCI/MS 法と同様に、ビタミン K 栄養調査を目的としたヒト血漿中ビタミン K 濃度の測定に十分適用可能であると判断した。

1-3) LC-APCI/MS/MS 法による血中

25-Hydroxyvitamin D 濃度定量法の確立³⁾
(平成 16 年度)
本法は、従来の RIA 法で合算定量される 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃)、25-Hydroxyvitamin D₂ (25(OH)D₂)及び 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ (24,25(OH)₂D₃) (図 1-6)を同時分別定量することを目的として開発した。

【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.1 mL を遠沈管にとり、内部標準物質として [²H₆]-25(OH)D₃ (側鎖 26,27 位メチルの水素を重水素化した化合物; 図 1-6) を 2 ng 添加し¹⁾、メタノール 0.2 mL を加えてボルテックスミキサ

ーで攪拌した。3000 rpm で遠心分離した後、得られた上清を、あらかじめメタノール/水 (7:3, v/v) 15 mL で洗浄した Bond Elut C₁₈ に負荷し、メタノール/水 (7:3, v/v) 15 mL で洗浄後、25(OH)D₂/D₃ 及び 24,25(OH)₂D₃ 画分をアセトニトリル/メタノール (8:2, v/v) 5.0 mL により溶出させた。溶出液をロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をメタノール 100 μL に溶解し、50 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。別に調製したビタミン D 代謝物標準溶液ⁱⁱ⁾ の分析を同時に行い、内部標準物質に対する標準ビタミン D 代謝物のピーク面積比 (Qs) を算出し、検量線を作成する。検体の分析から同様に各々のピーク面積比 (Qt) を算出し、検量線より LC-APCI 分析時の濃度 A を求め、以下の計算により血中濃度を算出した。

$$\text{血中濃度 (ng/mL)} = A \times 20/50$$

<HPLC 条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)
オートインジェクター : SIL-10AD (島津製作所社製)
カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120 (4.6 x 250 mm、5 μm、資生堂社製)
移動相 : メタノール : 水 (95:5, v/v)
流速 : 0.5 mL/min.

<APCI-MS/MS 装置及び MS 検出条件>

装置 : API-3000 (アプライドバイオシステムズ社製)
MS 検出条件 : Precursor ion/product ion (m/z)
25(OH)D₃ (m/z : 401.4/257.0)
25(OH)D₂ (m/z : 413.4/355.4)

24,25(OH)₂D₃ (m/z : 417.4/363.1)

[²H₆]-25(OH)D₃ (m/z: 407.4/263.4)

i) 内部標準溶液 : [²H₆]-25(OH)D₃ を 400 ng/mL となるようエタノールに溶解し、5 μL を添加する。(血中濃度として 20 ng/mL 添加)

ii) ビタミン D 代謝物標準溶液 :

25(OH)D₂/D₃, 24,25(OH)₂D₃ を 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL なるようメタノールに溶解して調製する。これらの標準溶液はいずれも [²H₆]-25(OH)D₃ を 50 ng/mL 含むよう調製する。

【定量精度の確認】

図 1-7 に示すように、標準液ならびに標準血清において 25(OH)D₂/D₃、24, 25 (OH)₂D₃ 及び内部標準物質は単一ピークとして検出された。標準溶液に対して作成した検量線は、図 1-8 に示すように 5 から 100 ng/mL の範囲で直線性を示した。また、検出限界はいずれも 1 ng/mL と十分な感度が得られた。

市販のヒトコントロール血清 (和光純薬社製) を用いて、Intra 及び Inter assay を行ったところ、表 1-5 に示すように十分な精度が得られた。また、各ビタミン D 代謝物を 20 ng/mL 添加して添加回収率を求めたところ、良好な回収率が得られた (表 1-5)。血清の 3 段階希釈試験で得られた回帰直線の相関係数は 25(OH)D₃ : 0.9999、25(OH)D₂ : 0.9967, 24,25(OH)₂D₃ : 0.9997 であった。以上のことから、本法における定量は十分な精度・真度であると判断した。

【従来法との比較】

本法と従来法の測定値の比較を行うため、健常ヒト血漿 98 検体を用いて DiaSorin 社製 25(OH)D RIA キットによる測定値との比較を行った。その結果、図 1-9 に示すように良好な相関性を示し、両測定方法の妥当性を評価することができた。また、ビタミン D の不足・欠乏の指標であり 25(OH)D 濃度とは逆相関することが知られる血中 PTH 濃度との関係を比較した結果、本法の測定値とは有意な逆相関関係が確認できたが、RIA 法では逆相関の傾向を示すにとどまった (表 1-6)。このことから、本法の測定はビタミン D の栄養状態を鋭敏に評価できる方法であると判断された。

1-4) LC-APCI/MS/MS 法による血中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立⁴⁾ (平成 17~18 年度)

脂溶性ビタミンの栄養調査を目的として、我々が合成した重水素あるいは重酸素標識化合物を内部標準物質とする血漿中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。本法では、16 年度に開発した LC-APCI/MS/MS 法による 25(OH)D₂、25(OH)D₃、24,25(OH)₂D₃、PK、MK-4、MK-7 の測定法を改良し、さらにレチノール、β-カロテン、α-トコフェロールを一斉同時に定量できる方法として確立した定量法である。また、血中濃度が低いために検出し難かった血中ビタミン D 濃度を正確に測定するため、共役ジエン構造を標的としたラベリング試薬である 4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-diene

(DMEQ-TAD)^{5,6}によりビタミンD類を誘導体化し、LC-APCI/MS/MSでの測定感度を高めた定量法を確立した。

【定量法】

(1) 血漿中脂溶性ビタミンの抽出・測定

ヒト血漿あるいは血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液¹⁾ 25 μL 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液²⁾ 25 μL、蒸留水 0.5 mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 3.0 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で5分間遠心分離した。有機層 2.5 mL を褐色試験管にとり、ロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をエタノール 200 μL に溶解し、50 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

<HPLC 条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)
オートインジェクター : SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120
(4.6 mm i.d.x250 mm、5 μm、資生堂社製)

移動相 : (A) メタノール：水 (90:10, v/v)

(B) アセトニトリル

0-10 min (A) 100 %

10-40 min (B) 0→90 %のグラ

ジエント

40-100 min (A) : (B) =10 :

90

流速 : 1.0 mL/min.

<APCI-MS/MS 装置及び MS 検出条件>

装置 : API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

MS 検出条件 :

Precursor ion/product ion (m/z)

all-trans-retinol (m/z : 269.1/213.4)

β-carotene (m/z : 537.6/177.1)

vitamin D₃ (m/z : 385.3/259.4)

25(OH)D₃ (m/z : 383.3/229.3)

α-tocopherol (m/z : 430.4/165.1)

PK (m/z : 451.5/187.1)

MK-4 (m/z : 445.5/187.3)

MK-7 (m/z : 649.7/187.1)

d₆-all-trans-retinol (m/z : 275.2/192.4)

d₆-β-carotene (m/z : 543.6/180.1)

d₇-vitamin D₃ (m/z : 392.4/266.5)

d₆-25(OH)D₃ (m/z : 389.4/229.1)

d₆-α-tocopherol (m/z : 436.5/171.1)

¹⁸O-PK (m/z : 455.4/191.1)

¹⁸O-MK-4 (m/z : 449.4/191.1)

¹⁸O-MK-7 (m/z : 653.7/191.1)

各脂溶性ビタミンの定量には各脂溶性ビタミン (5、20、100、500、2500、12500、62500 ng/mL) 及びその内部標準物質 (500 ng/mL) を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象脂溶性ビタミンの濃度比に対してピーク面積比をプロットした検量線を作成し、以下の計算式より濃度を算出した。

血漿(血清)中脂溶性ビタミン濃度(ng/mL)

$$=RS/V$$

R : 検量線より得られた内部標準物質に対する測定対象脂溶性ビタミンの濃度比

S : 内部標準物質の添加量 (25 ng)

V : 血漿 (血清) 量 (0.5 mL)

i) d_6 -all-trans-retinol (図 1-10) エタノール溶液 : 用時、 d_6 -all-trans-retinol acetate をアルカリけん化して調製した。ヘキササン : 酢酸エチル (9 : 1) 抽出液より得られた残渣を 2-プロパノールに溶解し、325 nm の吸光度 ($A_{325\text{ nm}}$) を測定した。以下の式に基づき d_6 -all-trans-retinol 濃度を計算し、1 $\mu\text{g/mL}$ のエタノール溶液を調製した。また、蛍光検出 HPLC により純度検定をおこなった。

d_6 -all-trans-retinol 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{325\text{ nm}} \times 549/100$

ii) その他の内部標準物質を含むエタノール溶液 : d_6 - β -carotene、 d_7 -vitamin D_3 、 d_6 -25(OH) D_3 、 d_6 - α -tocopherol、 ^{18}O -PK、 ^{18}O -MK-4 及び ^{18}O -MK-7 (図 1-10) をそれぞれ 1 $\mu\text{g/mL}$ となるようエタノールに溶解した。

(2) DMEQ-TAD による誘導体化による血漿中ビタミン D 類の抽出・測定

ヒト血漿 200 μL をポリプロピレン製チューブにとり、ビタミン D 内部標準物質エタノール溶液¹⁾ 50 μL およびアセトニトリル 1.0 mL を加えて転倒混和後、10 分間室温で放置した。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を試験管に分取した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣を酢酸エチル 1.2 mL に溶解し、蒸留水 0.6 mL を加えてボルテックスミキサーで攪拌した。3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層を褐色試験管に分取した。残った水層に酢酸エチル 0.6 mL を加えて再度抽出し、

得られた酢酸エチル層を先の褐色試験管にあわせた。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで乾固した後、0.4 %

DMEQ-TAD 酢酸エチル溶液 75 μL を加え、30 分間室温にて放置した。再度、0.4 % DMEQ-TAD 酢酸エチル溶液 75 μL を加えて、室温で 60 分間放置した後、エタノール 0.75 mL を加えて過剰な試薬を分解した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をアセトニトリル 80 μL に溶解し、30 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。なお、測定対象は vitamin D_3 (D_3)、vitamin D_2 (D_2)、25-hydroxyvitamin D_3 [25(OH) D_3]、25-hydroxyvitamin D_2 [25(OH) D_2] 及び 24,25-dihydroxyvitamin D_3 [24,25(OH) $_2D_3$] とした。

<HPLC 条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)
オートインジェクター : SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム : CAPCEL PAK C_{18} UG120 (4.6 mm i.d. \times 250 mm、5 μm 、資生堂社製)

移動相 : (A) アセトニトリル
(B) 水
0-5 min (A) : (B) = 30 : 70
5-35 min (A) 30 \rightarrow 95 % のグラ

ジエント

流速 : 1.0 mL/min.

温度 : 35 $^{\circ}\text{C}$

<APCI-MS/MS 装置及び MS 検出条件>

装置 : API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

MS 検出条件 :

Precursor ion/product ion (m/z)

DMEQ-TAD- D_3 (m/z : 730.5/468.3)

DMEQ-TAD-D₂ (m/z : 742.6/468.3)

DMEQ-TAD-25(OH)D₃ (m/z :
746.5/468.1)

DMEQ-TAD-25(OH)D₂ (m/z :
758.5/468.2)

DMEQ-TAD-24,25(OH)₂D₃ (m/z :
752.5/468.0)

DMEQ-TAD-d₇-D₃ (m/z : 737.6/468.2)

DMEQ-TAD-d₆-25(OH)D₃ (m/z :
752.5/468.1)

定量計算には、試料と同様に誘導体化した測定対象ビタミンDの標準物質(2.5、10、50 ng/mL)及びその内部標準物質(50 ng/mL)を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象ビタミンDの濃度比に対してピーク面積比をプロットした検量線を作成し、以下の計算式より濃度を算出した。

$$\text{血漿中脂溶性ビタミン濃度(ng/mL)} \\ = \text{RS/V}$$

R : 検量線より得られた内部標準物質に対する測定対象ビタミンDの濃度比

S : 内部標準物質の添加量 (10 ng)

V : 血漿量 (0.2 mL)

i) ビタミンD内部標準物質エタノール溶液 : d₇-vitamin D₃ 及び d₆-25(OH)D₃ をそれぞれ 0.2 µg/mL となるようエタノールに溶解した。

【定量精度の確認】

(1) 血漿中脂溶性ビタミンの一斉測定法

図 1-11 に示すように、標準物質混合溶液ならびに血漿試料において、全ての測定対象脂溶性ビタミンは単一ピークとして検出され、一斉定量が可能であることが確認さ

れた。標準溶液に対して作成した検量線は、全ての測定対象脂溶性ビタミンにおいて、0.25 から 3125 ng の範囲で直線性を示した。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、十分な感度が得られた(表 1-7)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿に all-trans-retinol 250 ng、β-carotene 150 ng、D₃ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、α-tocopherol 6.5 µg、PK 0.75 ng、MK-4 1 ng、MK-7 4 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-7 に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度であると判断した。プール血漿を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、vitamin D₃ を除いて変動係数 10%以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した(表 1-8)。プール血漿の D₃ 測定値の日差変動が大きくなった理由として、血漿中 D₃ 濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

さらに、プール血漿の各脂溶性ビタミン濃度を本法及び従来法(蛍光検出 HPLC 法、可視検出 HPLC 法、化学発光法)で測定し、得られた値を比較した。その結果、表 1-9 に示すように、本法及び従来法の定量結果はよく一致した。従って、本法は真度、精度及び特異性に優れ、且つ各脂溶性ビタミン濃度を一斉定量できる方法であるといえる。

(2) DMEQ-TAD による誘導体化による血漿中ビタミンD類の測定

図 1-12 に示すように、標準溶液ならびに血漿試料において、全てのビタミンD類が

ら DMEQ-TAD 誘導体化により生成した 6R および 6S 体のピークが検出された。6R および 6S 体の生成比は約 1:3 であったため、定量計算には主生成物である 6S 体のピーク面積を用いることとした。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、2-6 pg と極めて高感度であり、誘導体化により約 40 倍の高感度化が達成できた (表 1-10)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿 0.2 mL に D₃ 2 ng、D₂ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、25(OH)D₂ 10 ng 及び 24,25(OH)₂D₃ 2 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-10 に示すように 92-109 % の良好な回収率が得られた。従って、本法による脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。プール血漿を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、D₂ の日差再現性を除いて変動係数 10% 以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した (表 1-10)。D₂ 測定値の日差変動が大きくなった理由として、プール血漿中 D₂ 濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

血漿試料と同様に、母乳試料についても真度・精度を検討した。プール母乳 10 mL に D₃、D₂、25(OH)D₃ 10 ng 及び 25(OH)D₂ 10 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-11 に示すように 90-105 % の良好な回収率が得られた。また、日内再現性の変動係数は 4-12 % と概ね良好な結果が得られた。

従って、本法は血漿および母乳試料中のビタミン D を極めて高感度に測定でき、且つ真度及び精度に優れた方法であるといえ

る。

1-5) LC-APCI/MS/MS 法による母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立⁴ (平成 17 ~ 18 年度)

【定量法】

母乳試料は解凍後、超音波処理をおこない均質化した。続いて、ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンはアルカリけん化法で、アルカリに不安定なビタミン K はリパーゼ消化法で抽出した。

(1) 母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定 (アルカリけん化法：ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンに適用可能)

母乳 20.0 mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液 100 µL 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液 100 µL、1% 塩化ナトリウム溶液 12 mL、7% ピロガロール・エタノール溶液 (w/v) 40 mL、60% 水酸化カリウム溶液 20 mL を加え、70°C で 60 分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、1% 塩化ナトリウム溶液 76 mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60 mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60 mL を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで

乾固した。残渣をヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）3 mL に溶解し、褐色試験管に移した後、再びロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をエタノール 100 μ L に溶解し、50 μ L を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

(2) ビタミン K の抽出（リパーゼ消化法）

母乳 3.0 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質を含むエタノール溶液 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.7）12 mL、リパーゼ（ブタすい臓製、ナカライテスク社製）0.3 g を加え、混合した後、37 $^{\circ}$ C で 90 分間攪拌した。エタノール 12 mL を加えた後、超音波処理をおこない、ヘキサン 12 mL を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 10 mL を褐色ナス型フラスコに移した。残った水層にヘキサン 12 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 12 mL をナス型フラスコにあわせた。ヘキサン層をロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をヘキサン 3 mL に溶解し、あらかじめヘキサン 10 mL で洗浄した Sep-Pak Silica カートリッジ（Waters 社製）に負荷した。ヘキサン：ジエチルエーテル（97：3, v/v）5.0 mL により溶出させたビタミン K 画分を、ロータリーエバポレーターで乾固した。得られた残渣をエタノール 200 μ L に溶解し、50 μ L を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

【定量精度の確認】

7 名の健常授乳婦より提供された母乳を

混合して調製したプール母乳を用いて、添加回収率及び同時再現性を検討した。

プール母乳 20 mL に all-trans-retinol 20 μ g、 β -carotene 0.6 μ g、vitamin D₃ 20 ng、25(OH)D₃ 20 ng、 α -tocopherol 30 μ g、PK 30 ng、MK-4 20 ng、MK-7 10 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-12 に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。また、同時再現性試験における変動係数は 10% 以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した。

(3) 母乳中ビタミン D 類の高感度測定法（アルカリけん化法：ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの一斉分析法）

(1)の方法をさらに発展させ、低濃度で検出しにくい母乳中ビタミン D 濃度測定を DMEQ-TAD 誘導体化により高感度化した。

解凍後、超音波処理により均質化した母乳 10.0 mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液ⁱⁱ⁾ 50 μ L 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質エタノール溶液ⁱⁱⁱ⁾ 50 μ L、1%塩化ナトリウム溶液 6 mL、7%ピロガロール・エタノール溶液（w/v）20 mL、60%水酸化カリウム溶液 10 mL を加え、70 $^{\circ}$ C で 60 分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、1%塩化ナトリウム溶液 38 mL、ヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）30 mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）30 mL

を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）2.5 mL に溶解し、このうち 1.0 mL をビタミン A、E 類測定用、1.5 mL をビタミン D 類測定用とした。ビタミン D 類測定用の溶液は、ロータリーエバポレーターで乾固した後、以下の条件の HPLC にて精製した。

<精製用 HPLC 条件>

ポンプ : Waters 600 (Waters 社製)
検出器 : Waters 996 (Waters 社製)
カラム : Zorbax SIL
(4.6 mm i.d. × 250 mm, Agilent 社製)
移動相 : ヘキサン：2-プロパノール：
メタノール
(88:10:2, v/v/v)
流速 : 1.0 mL/min.
温度 : 室温
分取画分 : D 画分 3.5-5.0 min
25(OH)D 画分 5.0-8.0 min

分取した D および 25(OH)D 画分をロータリーエバポレーターで乾固した後、血漿試料と同様に DMEQ-TAD 誘導体化をおこない、LC-APCI/MS/MS にて測定した。ただし、0.4% DMEQ-TAD 溶液及びエタノール添加量は倍量とし、測定対象は D₃、D₂、25(OH)D₃ 及び 25(OH)D₂ とした。

ii) d₆-all-trans-retinol エタノール溶液：用時、d₆-all-trans-retinol acetate をアルカリけん化して調製した。ヘキサン：酢酸エチル（9：

1) 抽出液より得られた残渣を 2-プロパノールに溶解し、325 nm の吸光度 (A_{325 nm}) を測定した。以下の式に基づき

d₆-all-trans-retinol 濃度を計算し、1 µg/mL のエタノール溶液を調製した。また、蛍光検出 HPLC により純度検定をおこなった。
d₆-all-trans-retinol 濃度 (µg/mL) = A_{325 nm} × 549/100

iii) その他の内部標準物質エタノール溶液：
d₆-β-carotene、d₇-D₃、d₆-25(OH)D₃、
d₆-α-tocopherol、[¹⁸O]-phyllloquinone (PK)、
[¹⁸O]-menaquinone-4 (MK-4) 及び
[¹⁸O]-menaquinone-7 (MK-7) をそれぞれ 1 µg/mL とするようエタノールに溶解した。

【結果・考察】

図 1-13 に示すように、標準溶液ならびに血漿試料において、全てのビタミン D 類から DMEQ-TAD 誘導体化により生成した 6R および 6S 体のピークが検出された。6R および 6S 体の生成比は約 1:3 であったため、定量計算には主生成物である 6S 体のピーク面積を用いることとした。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、2-6 pg と極めて高感度であり、誘導体化により約 40 倍の高感度化が達成できた (表 1-13)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿 0.2 mL に D₃ 2 ng、D₂ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、25(OH)D₂ 10 ng 及び 24,25(OH)₂D₃ 2 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-13 に示すように 92-109% の良好な回収率が得られた。従って、本法による脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。プール血漿

を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、D₂の日差再現性を除いて変動係数10%以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した(表1-13)。D₂測定値の日差変動が大きくなった理由として、プール血漿中D₂濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

血漿試料と同様に、母乳試料についても真度・精度を検討した。プール母乳10 mLにD₃、D₂、25(OH)D₃ 10 ng 及び25(OH)D₂ 10 ngを添加して添加回収率を求めたところ、表1-14に示すように90-105%の良好な回収率が得られた。また、日内再現性の変動係数は4-12%と概ね良好な結果が得られた。

従って、本法は血漿および母乳試料中のビタミンDを極めて高感度に測定でき、且つ真度及び精度に優れた方法であるといえる。

【文献】

1. Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T, Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.” Anal. Chem. 2005, 77; 757-63.
2. Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Okano T, Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards, J. Chromatogr. B, 2005, 816; 41-8
3. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T, Method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry” Anal. Chem. 2005, 77; 3001-7.
4. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Okano T. “Determination of fat-soluble vitamins in human plasma, breast milk and food samples – Application in nutrition survey for establishment of “Dietary Reference Intakes for Japanese”” J Health Sci. 2007, 53; in press.
5. Shimizu M, Kamachi S, Nishii Y, Yamada S. “Synthesis of a reagent for fluorescence-labeling of vitamin D and its use in assaying vitamin D metabolites” Anal Biochem. 1991, 194; 77-81.
6. Higashi T, Awada D, Shimada K. “Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent” Biol Pharm Bull. 2001, 24; 738-43.

2. 日本人授乳婦を対象とした脂溶性ビタミンの栄養調査 (平成 17 年度～平成 18 年度)

【目的】

食事摂取基準の策定には栄養状態の指標と各栄養素摂取量の関係を示す調査研究が必要である。しかし、日本人を対象とした研究は少なく、特に、乳児を対象とした研究は不足している。我々は、乳児 (0-5 ヶ月) の脂溶性ビタミン食事摂取基準策定の基礎資料を得ることを目的として、日本人授乳婦より得られた母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定し、乳児の推定摂取量を算出した。また、母乳中脂溶性ビタミン濃度に影響を及ぼす因子として、授乳婦の血漿中脂溶性ビタミン濃度を測定するとともに、食事調査を実施し、これらの関係を考察した。

【方法】

(1) 対象者

インフォームドコンセントが得られた出産後 0-5 ヶ月の日本人授乳婦 78 名を対象とした。背景は以下のとおりである。

年齢 : 30.9±4.5 歳 (18-39 歳)
出産後日数 : 37.0±32.5 日 (3-179 日)
[1.2±1.1 ヶ月 (0.1-5.9 ヶ月)]
在胎週数 : 39.3±1.3 週 (36-42 週)
出産形態 : 経膣分娩 66 名 帝王切開 12 名

また、参考値として出産後 6-11 ヶ月の日本人授乳婦 5 名を対象に、母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定した。

年齢 : 28.6±4.3 歳 (21-31 歳)
出産後日数 : 234.6±31.4 日 (182-265

日)

[7.8±1.0 ヶ月 (6.1-8.8 ヶ月)]

在胎週数 : 38.2±1.0 週 (37-39 週)

出産形態 : 経膣分娩 4 名 帝王切開 1 名

(2) 母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量

a. 母乳中のビタミン A、E、D 濃度の測定

前述の母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定 (1-5-(3)_母乳中ビタミン D 類の高感度測定法 (アルカリけん化法: ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの一斉分析法))と同様の操作により行った。

b. 母乳中ビタミン K 濃度の測定

前述の母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定 (1-5-(2) 母乳中ビタミン K の抽出・測定 (リパーゼ消化法))と同様の操作により行った。

c. 乳児の推定脂溶性ビタミン摂取量の算出

得られた母乳中脂溶性ビタミン濃度より、推定摂取量を以下の式にて算出した。

推定摂取量=

母乳中脂溶性ビタミン濃度×平均哺乳量 (780 mL) ¹

ビタミン A 推定摂取量はレチノール当量 (RE) とした。

レチノール当量 (RE) = 1 µg

all-trans-retinol

12 µg β-carotene

ビタミン D 推定摂取量は 25(OH)D のビタミン D 換算係数を 5 として算出した。

ビタミン D 推定摂取量=

$$D_3 + D_2 + 5 \times [25(OH)D_3 + 25(OH)D_2]$$

また、ビタミン K 推定摂取量は MK-7 を MK-4 換算重量として合算した。

ビタミン K 推定摂取量=

$$PK + MK-4 + MK-7 \times 444.7/649$$

444.7 : MK-4 の分子量

649 : MK-7 の分子量

d. 血漿中脂溶性ビタミン濃度の測定

ビタミン D 類については前述の方法「1-4-(2) DMEQ-TAD による誘導体化による血漿中ビタミン D 類の測定」で、その他の脂溶性ビタミンについては「1-4-(1) 血漿中脂溶性ビタミンの一斉測定法」で測定した。

e. 食事調査

授乳婦を対象とした食事調査は自記式食事歴法質問票により実施した。

f. 統計解析

SAS 社製 JMP 5.0.1J を用いた。

【結果】

各脂溶性ビタミンの母乳中濃度及び乳児の母乳からの推定摂取量を表 2-1 に示す。母乳中脂溶性ビタミン濃度より算出した 0-5 ヶ月の乳児の推定摂取量は、ビタミン A、E、K では 2005 年版食事摂取基準値 (0~5 月、目安量、ビタミン A 250 µg RE/day、ビタミン E 3.0 mg/day、ビタミン K 4.0 µg/day) を上回っていたが、ビタミン D については現行目安量 2.5 µg/day を大きく下回っていた。従って、専ら母乳のみで哺育される乳

児において、現行のビタミン D 食事摂取基準値を満たすことは困難であると考えられる。また、出産後 0-5 ヶ月に比べ 6-11 ヶ月の母乳中脂溶性ビタミン濃度は、D₂、25(OH)D₂ を除き低値であった。

次に、出産後 0-5 ヶ月の授乳婦を対象として、各脂溶性ビタミンの母乳中濃度と関連因子との関係について検討した (表 2-2)。その結果、年齢と母乳中 25(OH)D₂ 濃度間および出産後日数と母乳中 all-trans-retinol、β-carotene、α-tocopherol、PK、MK-4 濃度間に、有意な負の相関が認められた。また、母乳中脂質濃度と 25(OH)D₃、α-tocopherol、PK、MK-4 濃度間に、有意な正の相関が認められた。各化合物のうち、母乳中濃度が血漿中濃度と有意な正の相関関係を示したのは、β-carotene、D₃、D₂、25(OH)D₃、25(OH)D₂ および MK-7 であった。母乳中 MK-4 濃度についてはビタミン K 食事摂取量との間に有意な正の相関が観察された。また、出産形態の差異による母乳中脂溶性ビタミン濃度の差異はみられなかった。

さらに、母乳中および血漿中ビタミン D 濃度、ビタミン D 摂取量の季節間変動について検討した (表 2-3)。我々が以前に報告している血漿中 25(OH)D₃ 濃度の季節変動² より、1~3 月を冬季、7~9 月を夏季として 2 群間の比較をおこなったところ、母乳中 D₂ 濃度は冬季に有意に高く、25(OH)D₃ 濃度は夏季に有意に高かった。また、血漿中濃度は 25(OH)D₂ 濃度は冬季に、24,25(OH)₂D₃ 濃度は夏季に有意に高かった。食事摂取量については 2 群間に差異はみられなかった。

【考察】

今回、新たに開発した高感度測定法により、日本人授乳婦の脂溶性ビタミン濃度を測定した。その結果、0-5ヶ月の授乳婦より採取した母乳中 all-trans-retinol の平均濃度は $0.47 \mu\text{g/mL}$ であった。既報では、日本人の母乳中 retinol 濃度は、出産後 98 ± 7 日で $0.35 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ と報告されている³。また、出産後 21~89 日で $0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で $0.16 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ という報告もある⁴。今回得た結果は、これらの報告よりやや高値であった。母乳中 β -carotene 濃度については、初乳で高く（出産後 0 日目で $0.38 \mu\text{g/mL}$ ）、出産後約 3 ヶ月で $0.033 \mu\text{g/mL}$ まで低下すると報告されている³。また、出産後 21~89 日で $0.024 \pm 0.019 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で $0.025 \pm 0.015 \mu\text{g/mL}$ という報告もある⁴。今回の測定では平均 $0.064 \pm 0.063 \mu\text{g/mL}$ となり、また、出産後日数との間に有意な負の相関が観察された。これらの結果より算出したビタミン A の推定摂取量は平均 $368 \mu\text{g RE/day}$ となり、現行目安量の $250 \mu\text{g RE/day}$ と概ね同程度であった。

一方、ビタミン D 類については D_3 、 D_2 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 及び $25(\text{OH})\text{D}_2$ 濃度を測定した結果、それぞれの平均濃度は 0.092 ng/mL 、 0.072 ng/mL 、 0.082 ng/mL 及び 0.0032 ng/mL であった。5訂増補日本食品成分表⁵では、ビタミン D 活性代謝物を含むビタミン D の濃度は 3 ng/mL とされている。今回得られた測定値をビタミン D 換算値とすると、母乳中ビタミン D 濃度は約 0.59 ng/mL となり、

日本食品成分表値の 1/5 程度の低値であった。また、 D_3 については、出産後 21~89 日で $0.12 \pm 0.12 \text{ ng/mL}$ 、出産後 90~180 日で $0.05 \pm 0.04 \text{ ng/mL}$ という報告もあり⁴、今回得られた測定値と概ね一致している。今回の研究では、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は測定対象としなかったが、Reeve ら⁶、Hollis ら⁷ は母乳中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 及び $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度は極めて低く、総ビタミン D 活性への有意な寄与はないとしている。また、米国 DRI においても、乳児のビタミン D の目安量は D および $25(\text{OH})\text{D}$ の母乳中濃度より算定されており、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度については加味されていない。これらのことから、今回の結果より算出した乳児のビタミン D 推定摂取量 $0.46 \mu\text{g/day}$ は妥当であり、現行目安量 ($2.5 \mu\text{g/day}$) は専ら母乳で哺育された乳児には摂取困難な値であると考えられる。さらに、今回の研究結果より、母乳中ビタミン D 濃度は個体差が大きく、授乳婦の血漿中ビタミン D 濃度と有意な正の相関が認められた。また、母乳中および授乳婦血漿中の D_3 系化合物濃度は夏季に高く、 D_2 系化合物濃度ビタミン D 濃度は冬季に高かった。これらの季節変動は、日照および食事の影響を受けたものと考えられる。

ビタミン E については母乳中 α -tocopherol 平均濃度は $5.2 \mu\text{g/mL}$ であった。既報では、日本人の母乳中 α -tocopherol 濃度は出産後 21~89 日で $2.8 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で $3.3 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ と報告されており⁴、今回の結果はこの報告に比べてやや高値であった。今回算出した乳児の推定摂取量 4.1 mg/day も現行目安量の $3.0 \mu\text{g/day}$ に比べて

やや高値となった。一方、母乳中ビタミン E 濃度は初乳、移行乳、成熟乳となるにつれて低下し、初乳 (6.8~23 µg/mL) に対し、成熟乳 (1.8~9 µg/mL) ではおよそ 1/3~1/5 であると報告されている⁸。今回の研究結果でも、母乳中 α-tocopherol 濃度は出産後日数と有意な負の相関を示した。

ビタミン K については、日本人の血漿中に比較的多く存在する PK、MK-4 及び MK-7 濃度を測定した。その結果、母乳中 PK、MK-4、MK-7 の平均濃度は 3.8 ng/mL、1.8 ng/mL、1.6 ng/mL となり、PK 濃度が最も高かった。Kojima ら⁹は、母乳中 PK および MK-4 濃度を出産後 21~89 日で 3.6±1.5 ng/mL および 1.8±0.6 ng/mL、出産後 90~179 日で 2.1±0.6 ng/mL および 1.4±0.64 ng/mL と報告しており、今回の測定結果とほぼ同じ濃度となっている。また、今回の測定結果より算出した乳児の推定ビタミン K 摂取量は 5.2 µg/day となり、現行目安量の 4.0 µg/day と同程度の値であった。

以上より、2005 年版食事摂取基準の乳児 (0-5 ヶ月) の脂溶性ビタミンの目安量は、ビタミン A、E、K については乳児の推定脂溶性ビタミン摂取量平均値とほぼ一致しているが、ビタミン D については実際の乳児の摂取量と比較して高く設定されている可能性が高いと判断される。

【文献】

1. 鈴木久美子、佐々木晶子、新澤佳代、戸谷誠之「離乳前乳児の哺乳量に関する研究」栄養学雑誌 2004, 62, 369-72.
2. Kobayashi T, Okano T, Shida S, Okada K, Suginozawa T, Nakao H, Kuroda E, Kodama S, Matsuo T, Variation of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ levels in human plasma obtained from 758 Japanese healthy subjects, J Nutr Sci Vitaminol. 1983, 29; 271-81.
3. Canfield LM, Clandinin MT, Davies DP, Fernandez MC, Jackson J, Hawkes J, Goldman WJ, Pramuk K, Reyes H, Sablan B, Sonobe T, Bo X, Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers, Eur J Nutr. 2003, 42; 133-41.
4. Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, Kanno T, Kojima T, Yonekubo A, Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women, J Nutr Sci Vitaminol. 2005, 51; 239-47.
5. 文部科学省 科学技術・学術審議会資源調査分科会 報告「5訂増補 日本食品標準成分表」国立印刷局、2005
6. Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF, Vitamin D of human milk: identification of biologically active forms, Am J Clin Nutr. 1982, 36, 122-6.
7. Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW, Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk, J Nutr. 1981, 111; 240-8.
8. Jansson L, Akesson B, Holmberg L, Vitamin E and fatty acid composition of human milk, Am J Clin Nutr. 1981, 34; 8-13.
9. Kojima T, Asoh M, Yamawaki N, Kanno T, Hasegawa H, Yonekubo A, Vitamin K concentrations in the maternal milk of Japanese women, Acta Paediatr. 2004, 93;

3. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の 評価 (平成 17 年度～平成 18 年度)

3-1) 骨に対するビタミン K の必要量の評価

1

【目的】

ビタミン K は多くの血液凝固因子の合成において重要な役割を持つことが知られる。また、ビタミン K はオステオカルシン(OC)やマトリックスマグネシウムあるいはプロテイン S のようなビタミン K 依存性蛋白質を γ -カルボキシル化することによって骨代謝において重要な役割を果たす。現在、乳児の場合を除き、出血を伴うようなビタミン K 欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低ビタミン K 摂取が閉経後女性の大腿骨頸部骨折のリスクを増大させるとともに、大腿骨、脊椎における低 BMD と関連があると報告されている。このことは、骨の健康維持に必要なビタミン K 量は血液凝固に必要な量よりも多いことを示唆するものである。わが国では骨粗鬆症治療にビタミン K₂ が使用されているが、フィロキノン(PK)やメナキノン (MK-4, MK-7) を中心とするビタミン K 栄養が骨粗鬆症予防に果たす役割については十分な検討がなされていない。血液凝固に関連するビタミン K 不足のマーカーには PIVK_{II} (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対するビタミン K 不足マーカーには非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) が用いられる。そこで、骨粗鬆症予防におけるビタミン K の栄養効果を検討するため、30～49 歳、50～69 歳、70 歳以上の 3 年齢層の日本人成人女性を対象に血中 PK 及び MK-4、MK-7 濃

度を測定し、ucOC 濃度を測定するとともに骨代謝関連指標との関連について調査した。

【方法】

対象者：30-88 歳までの日本人女性 396 名（30-49 歳 52 名、50-69 歳 208 名、70 歳以上 136 名）。平均年齢 63 歳。骨粗鬆症以外の骨代謝疾患をもつ女性及び活性型ビタミン D、ビタミン K、ビタミン K 拮抗薬、エストロゲン、bisphosphonate、ステロイドなどの骨代謝関連薬を服用している対象者は除外した。

測定項目：血中 PK、MK-4、MK-7 濃度、PTH、ucOC、intactOC、Ca、P、BAP 濃度、Alp 活性、尿中 NTx/Cr、DPD/Cr、U-Ca/Cr、BM I、L₂₋₄ BMD 及び椎体骨骨折頻度。統計解析には、JMP 5.0.1 J を用いた。

【結果及び考察】

対象者の血漿中 PK、MK-4、および MK-7 濃度は平均それぞれ 1.57、0.10、6.47ng/mL であった。血中 ucOC 濃度及び ucOC/intactOC 比は、血中 PK、MK-7 濃度と有意に逆相関したが、MK-4 濃度との相関はみられなかった（表 3-1）。MK-4 濃度が ucOC 濃度と有意な関係を示さなかったのは、通常の栄養レベルでの血中 MK-4 濃度が非常に低いことが一因と考えられる。また、骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度が、PK 濃度と有意な負の相関を示した。ucOC 濃度や尿中 DPD 濃度は、年齢とともに増加する因子であり、PK、MK-7 はともに年齢と有意な負相関を示している。このことから、PK、MK-7 濃度と ucOC、尿中 DPD の関係

に、年齢が交絡因子として関与する可能性が考えられるため、年齢、BMI、コレステロール、トリアシルグリセロール、PK、MK-4、MK-7 を予測因子として、前向き段階的重回帰分析を行い、ucOC、ucOC/intactOC 比、DPD の独立影響因子を求めた。その結果、ucOC、ucOC/intactOC 比に対しては年齢、PK、MK-7 濃度が独立因子として関与し、尿中 DPD に対しては年齢、PK 濃度が関与することが明らかになった（表 3-2）。さらに、年齢層別に PK 濃度、MK-7 濃度と ucOC/intactOC 比の関係を評価した結果、図 3-1 に示すように、ucOC/intactOC 比を十分に低下させるために必要な PK、MK-7 濃度は加齢とともに上昇することが明らかになった。また、対象者を PK 濃度と ucOC 濃度の中央値（PK：1.18 ng/mL、ucOC：3.73 ng/mL）で 4 群（I 群：低 PK 高 ucOC 群、II 群：低 PK 低 ucOC 群、III 群：高 PK 高 ucOC 群、IV 群：高 PK 低 ucOC 群）に分割して骨折有病率を比較した結果、BMD、年齢とは無関係に脊椎骨折有病率は I 群から IV 群に向けて低下した。IV 群に対する I 群、II 群の脊椎骨折のオッズ比は各々 2.9、2.2 で有意に高く、K の栄養状態が低下すると骨折の危険性が高くなることが示唆された。

以上の結果から、血液凝固を指標とする欠乏症状を示さない場合においても、骨代謝におけるビタミン K の潜在性欠乏が存在する可能性は高く、ビタミン K の栄養状態が骨折に関与する可能性が強く示唆された。また、高齢者では骨におけるビタミン K 要求性が高まる可能性が示唆された。

3-2) 思春期におけるビタミンD栄養

【目的】

ビタミンD欠乏は、顕著な血中25(OH)D濃度の低値と低Ca血症を特徴とし、副甲状腺機能亢進症による骨軟化症やくる病を惹起する。近年、このようなビタミンD欠乏症を呈する患者は稀になったが、一方で潜在的なビタミンD不足が問題となっている。ビタミンD不足とは、欠乏症でみられるほどの血中25(OH)D濃度の低下は認められず、血中Ca濃度も正常範囲内であるが、軽度の血中PTH濃度の上昇が惹起されている状態である。また、骨粗鬆症発症のリスクファクターの一つとされ、ビタミンD欠乏とは区別して評価する必要がある。

ビタミンD不足により、軽度の副甲状腺機能亢進が惹起されることから、血中PTH濃度の上昇をビタミンD不足の指標として、カットオフ値を決定する方法が提案されている。欧米諸国では、様々なカットオフ値が報告されているが、日本における研究報告は少なく、日本人を対象としたビタミンD不足のカットオフ値を決定する必要がある。

思春期は最大骨量を獲得に向けた重要な時期であるが、思春期の女子はダイエットをする傾向にあり栄養の偏りによるCaやビタミンDの不足が指摘されている。この時期に、できる限り高い骨量を獲得することは、将来の骨粗鬆症予防において非常に重要である。そこで、日本人の思春期におけるビタミンD栄養状態を調査し、ビタミンD不足のカットオフ値を評価した。

【方法】

<対象者>

12~18歳の健常な思春期男女1380名を対象とした。対象者の内訳は、中学1年(男子192名、女子197名)、高校1年(男子247名、女子279名)、高校3年(男子233名、女子242名)である。

<測定項目>

血中25(OH)D濃度、血中Intact PTH濃度、ビタミンD摂取量およびCa摂取量(食事摂取頻度調査により算出)。

<統計解析>

統計解析ソフトSAS社製JMP5.0.1Jを用いて行った。ビタミンD不足のカットオフ値は、血中PTH濃度を指標として評価した。方法は、15, 20あるいは25 ng/mLの血中25(OH)D濃度を境界値として対象者を高25(OH)D群と低25(OH)D群の2群に分類し、2群間の血中PTH濃度が有意に異なる境界値をカットオフ値として評価した。

【結果および考察】

表3-3に対象者の背景を示す。いずれの学年においても、女子学生の血中25(OH)D濃度は、男子学生に比べて有意に低かった。血中PTH濃度に男女差は認められなかったが、男女ともに学年が上がるにつれて有意に低下した。ビタミンD摂取量に、男女学年間の差は認められなかった。ビタミンD摂取量は、男女いずれの学年も約10 μg/dayであり、2005年版日本人の食事摂取基準によるビタミンDの目安量(12~14歳の4 μg/day、15~17歳の5 μg/day)を上回っており、

また平成 15 年日本人の国民健康・栄養調査報告に示される同年代のビタミン D 摂取量と比較しても上回っていることから、今回の対象者のビタミン D 摂取量は良好であると判断される。次に、ビタミン D 不足のマーカーとなる血中 PTH 濃度に影響する因子を、ステップワイズ重回帰分析により解析した (表 3-4)。血中 25(OH)D 濃度、ビタミン D 摂取量、Ca 摂取量を、予測因子とした場合、男子ではいずれの学年においても 25(OH)D 濃度が負相関関係を示す独立影響因子であったが、女子では高校 3 年においてのみ 25(OH)D 濃度が有意な独立影響因子となった。そこで、次に 15, 20 あるいは 25 ng/mL の血中 25(OH)D 濃度を境界値として対象者を高 25(OH)D 群と低 25(OH)D 群の 2 群に分類し、2 群間の血中 PTH 濃度を比較した。男子学生の結果を、表 3-5 に示す。中学 1 年生、高校 1 年生では 15 ng/mL を境とした場合に p 値が最も低く、高校 3 年生では 25 ng/mL を境とした場合に最も低い p 値を示した。しかし、学年を通して有意差が見られる境界値は、20 ng/mL であった。一方、女子では重回帰分析の結果で示されたように、高校 3 年生においてのみ有意な負の相関関係がみられ、表 3-6 に示すように、高校 3 年生の 20 ng/mL, 25 ng/mL を境界とした場合に有意差が見られた。p 値は、20 ng/mL を境界とした場合のほうが低かった。これらのことを総合的に評価すると、中学 1 年生から高校 3 年生までの思春期男女におけるビタミン D 不足のカットオフ値は、25(OH)D 濃度の 20 ng/mL が適当であると判断される。思春期におけるビタミン D

不足のカットオフ値に関する報告は少なく、フィンランドの女兒 (10~12 歳) を対象とした研究で、血中 25(OH)D 濃度と骨密度が正相関すること、9~15 歳の女兒で血中 25(OH)D 濃度と 3 年間の骨密度変化量が正相関を示したとの報告^{2,3}があるが、カットオフ値を提示する論文はほとんど見られない。今回の検討で、日本人の思春期におけるカットオフ値を提示できたことは、意義が高いと考えられる。次の段階として、血中 25(OH)D 濃度を 20 ng/mL 以上に維持するためのビタミン D 摂取量を策定する必要があるが、今回の対象者においてビタミン D 摂取量と血中 25(OH)D 濃度に相関がみられず、具体的なビタミン D 摂取量を提示することはできなかった。しかし、前述のように今回の対象者は、平均的に食事摂取基準の目安量の 2 倍量程度のビタミン D を摂取しているにもかかわらず、男子学生では約 25~30%、女子学生では約 50%が 20 ng/mL 未満の血中 25(OH)D 濃度を示している (表 3-7)。また、男女ともに食事摂取基準以上のビタミン D (4~6 μ g/d 以上) を摂取する学生は、90%以上いる (表 3-8)。このことは、現在の食事摂取基準の目安量程度の摂取ではビタミン D 不足に陥る可能性が高いことを示唆する結果である。血中 25(OH)D 濃度は戸外活動量にも強く影響されることから、今後これらの要因を除いたビタミン D の介入試験により、ビタミン D を充足させるための摂取量を求める必要があると考えられた。

3-3) 思春期におけるビタミン K 栄養

【目的】

ビタミン K は多くの血液凝固因子の合成において重要な役割を持つことが知られる。また、ビタミン K はオステオカルシンやマトリックスマテックスグラ蛋白あるいはプロテイン S のようなビタミン K 依存性蛋白質を γ -カルボキシル化することによって骨代謝において重要な役割を果たす。現在、乳児の場合を除き、出血を伴うようなビタミン K 欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低ビタミン K 摂取が閉経後女性の大腿骨頸部骨折のリスクを増大させるとともに、大腿骨、脊椎における低 BMD と関連があると報告されている。血液凝固に関連するビタミン K 不足のマーカには PIVKII (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対するビタミン K 不足マーカには非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) が用いられる。前述のように、骨粗鬆症予防におけるビタミン K の栄養効果を検討するため、高齢者を中心とする日本人成人女性を対象に血中 PK 及び MK-4、MK-7 濃度と ucOC 濃度の関係を調べ、骨における不足状態を評価した。その結果、血液凝固を指標とする欠乏症状を示さない場合においても、骨代謝におけるビタミン K の潜在性欠乏が存在する可能性は高く、ビタミン K の栄養状態が骨折に関与する可能性を示唆する結果を得た。また、高齢者では骨におけるビタミン K 要求性が高まる可能性が考えられた。そこで、次に日本人を対象として思春期におけるビタミン K 栄養状態を調査し、ビタミン K 不足のカットオフ値の策定を試みた。

【方法】

<対象者>

12~18 歳の健常な思春期男女 1183 名を対象とした。対象者の内訳は、中学 1 年(男子 166 名、女子 176 名)、高校 1 年(男子 194 名、女子 247 名)、高校 3 年(男子 183 名、女子 217 名)である。

<測定項目>

血中フィロキノン(PK)、メナキノン(MK-4、MK-7)、ucOC 濃度およびビタミン K 摂取量(食事摂取頻度調査により算出)。

<統計解析>

統計解析ソフト SAS 社製 JMP5.0.1 J を用いて行った。ビタミン K 不足のカットオフ値は、血中 ucOC 濃度を指標として評価した。方法は、ある一定のビタミン K 濃度を境界値として対象者を高ビタミン K 群と低ビタミン K 群の 2 群に分類し、2 群間の血中 ucOC 濃度が有意に異なる境界値をカットオフ値として評価した。

【結果および考察】

表 3-9 に対象者の背景を示す。男女いずれにおいても PK, MK-4, MK-7 濃度は学年の上昇とともに有意に増加した。ビタミン K 摂取量は、男子では学年間に差はなかったが、女子では高校 1 年生において低い結果が得られた。血中 ucOC 濃度は男女ともに中学 1 年生で最も高く、学年が上がるにつれて有意に低下した。また、ucOC 濃度は女子に比べて男子で有意に高かった。ビタミン K 摂取量 200 μ g/day 前後であり、2005 年版日本人の食事摂取基準による目安量

(男子：12～14歳の70 $\mu\text{g/day}$ 、15～17歳の80 $\mu\text{g/day}$ 、女子：12～14歳の65 $\mu\text{g/day}$ 、15～17歳の60 $\mu\text{g/day}$)を十分に上回っていた。

次に、ビタミンKの生体内栄養指標である血中ucOC濃度と血中ビタミンK濃度の相関関係を示す(表3-10)。血中ucOC濃度は、男女ともに血中PK、MK-7およびTotalビタミンK濃度と有意に負相関した。また、男子においてはMK-4濃度およびビタミンK摂取量とも有意な負相関関係を示した。そこで、次に血中ucOC濃度と顕著な負相関関係を示した血中PK、MK-7およびTotalビタミンK濃度を基準として骨に対するビタミンK栄養充足・不足のカットオフ値を評価した。

表3-11に血中PK濃度の0.3, 0.6, 0.9, 1.2 ng/mL を境界として対象者を2群に分け、境界値以上群と境界値未満群のucOC濃度を比較した結果を示す。男子では中学1年生の0.9 ng/mL を境とした場合にp値が最も低く、高校1年生、高校3年生有意差は認められなかった。一方女子では中学1年生では0.3あるいは0.6 ng/mL で有意差がみられ、高校1年生では0.9 ng/mL 、高校3年生では0.6と0.9 ng/mL に有意差が認められた。男女合わせたカットオフ値を一貫して決定することは困難であるが、少なくとも0.6～0.9 ng/mL 以上のPK濃度を維持することが望ましいと推察された。

次に、MK-7濃度を用いて同様の検討を行った(表3-12)。境界値は、血中濃度の中央値付近である0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ng/mL に設定した。男子の場合、中学1年生では全ての境界値で有意差が見られ、高校1年生では

1.0 ng/mL 、高校3年生では1.0, 2.0, 4.0 ng/mL で有意差がみられた。一方、女子では中学1年生では1.0, 2.0, 4.0 ng/mL 、高校1年生では2.0 ng/mL 、高校3年生では2.0と4.0 ng/mL で有意差が得られた。男女学年を通してみると、血中MK-7濃度が1.0～2.0 ng/mL 以上に維持することが望ましいと判断される。

最後に、PK、MK-4、MK-7濃度を合計したTotalビタミンK濃度を用いてカットオフ値の評価を行った(表3-13)。男子の場合、中学1年生では全ての境界値で有意差が見られたが、高校1年生では有意差はとれず、高校3年生では2.0, 4.0, 6.0 ng/mL で有意差がみられた。一方、女子では中学1年生では1.0 ng/mL 、高校1年生では4.0と6.0 ng/mL 、高校3年生では2.0, 4.0, 6.0 ng/mL で有意差が得られた。男女学年を通してみると、p値が低く学年を通して有意差が得られやすい4.0 ng/mL 以上にTotalビタミンK濃度を維持することが望ましいと判断される。ただし、中学1年生では1.0～2.0 ng/mL でもucOC濃度を低下させることができる判断される。

次にビタミンK摂取量と血中ビタミンK濃度との関係を調べた(図3-2)。ビタミンK摂取量と血中TotalビタミンK濃度間には、男女学年をとわず、有意な正相関関係が得られた。また、表3-9にも示したように、ビタミンK摂取量は学年間でほとんど差がないにもかかわらず、血中濃度は学年の上昇とともに増加するため、ビタミンK摂取量と血中TotalビタミンK濃度の回帰式の係数は学年が上がるにつれて有意に増

加した (ANCOVA: 男子 Slope $p=0.040$ 、女子 Slope $p<0.001$)。この回帰式をもとに、前述のカットオフ値の濃度を得るために必要な摂取量を算出すると、表 3-14 のようになる。中学 1 年生が血中ビタミン K 濃度を 1 ng/mL に到達させるためには、男子で 122 μ g/day、女子で 99 μ g/day となる。これらは、現在の食事摂取基準のビタミン K 目安量 (男子 70 μ g/day、女子 65 μ g/day) よりも、約 1.5 倍程度高い摂取量になる。高校 1 年生と高校 3 年生では、4 ng/mL に到達させるビタミン K 摂取量 (男子: 高校 1 年 106 μ g/day、高校 3 年 67 μ g/day、女子: 高校 1 年 84 μ g/day、高校 3 年 128 μ g/day) は、高校 3 年生男子を除いて食事摂取基準ビタミン K 目安量 (男子 80 μ g/day、女子 60 μ g/day) に比べて、約 1.3~2 倍程度高い摂取量になる。算出方法としてはかなり単純な方法ではあるが、骨の健康を考慮に入れた場合には現在の目安量よりも 1.5 倍程度の摂取量が必要である可能性が示唆された。

表 3-15、表 3-16、表 3-17、表 3-18 に、それぞれ血中 PK 濃度、MK-7 濃度、Total ビタミン K 濃度、ビタミン K 摂取量のパーセントイル分布を示した。各学年いずれにおいても、75%以上は骨におけるビタミン K 栄養を満たすと推定される摂取量を摂取しているが、残りの 25%においては不足が危惧される。

思春期の骨におけるビタミン K 不足に関する報告はなく、明確ではないものの、今回の検討で日本人の思春期におけるカットオフ値と必要摂取量を提示できたことは意義が高いと考えられる。

【文 献】

1. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T. “Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin” *Am J Clin Nutr*, 2006, 83; 380-6.
2. Cheng S, Tylavsky F, Kroger H, Karkkainen M, Lyytikainen A, Koistinen A, Mahonen A, Alen M, Halleen J, Vaananen K, Lamberg-Allardt C, “Association of low 25-hydroxyvitamin D concentrations with elevated parathyroid hormone concentrations and low cortical bone density in early pubertal and prepubertal Finnish girls.” *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78, 485-492.
3. Lehtonen-Veromaa MK, Mottonen TT, Nuotio IO, Irjala KM, Leino AE, Viikari JS, “Vitamin D and attainment of peak bone mass among peripubertal Finnish girls: a 3-y prospective study” *Am J Clin Nutr*, 2002, 76, 1446-1453.

4. ビタミン摂取量が血液中と尿中のビタミン含量に及ぼす影響～生活習慣一次予防のための生体飽和量を求める研究（脂溶性ビタミン）～（平成 18 年度）

【目的】

ビタミンには健康の増進や栄養素の代謝の異常を予防する効果、すなわち生活習慣予防の効果があることがわかってきた。ビタミン C は、血漿中の濃度が 200 mg/日の投与で飽和するという報告があるが、他のビタミンに関する報告はない。水溶性ビタミンの場合、生体内での必要量を超えて摂取されたビタミンは尿中に排泄されることから、摂取量、血中濃度、尿中含量の関係から生体飽和量を求めることができると考えられる。そこで、ビタミン摂取量を順次増大させた時に血液中と尿中のビタミン含量とそれに関連する生体指標がどのように応答するのかを調べ、生活習慣病の一次予防が期待できるビタミンの摂取量を明らかにする研究を計画した。脂溶性ビタミンの場合、尿中排泄量から飽和量を求めることはできない。そこで、ビタミン D についてはその栄養指標となる血中 25(OH)D 濃度とビタミン D の充足・不足の生体指標の血中 PTH 濃度を測定し、充足量に到達したか否かで評価した。ビタミン K については、血中ビタミン K 濃度と骨における充足・不足の生体指標である非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) 濃度および血液凝固能の指標として PIVKII を測定した。また、ビタミン E は、 α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種の同属体の血中濃度を、ビタミン A については血中レチノール濃度を測定した。

【方法】

<対象者>

本研究の目的、内容、起こりうる危害、被験者の権利、プライバシーの保護について、あらかじめ説明し、文書により参加を申し込んだ男子 12 名。被験者は、問診後、実験に参加可能と判断された人である。平均年齢 26.5 ± 10.4 歳(19 歳～55 歳)。

<摂取量および方法>

ビタミン剤の摂取スケジュールは、表 4-1 に示した通りである。対象者は最初の 4 日間同一食を摂取し、5 日目に採血後、ビタミン剤①を 1 日 3 回、朝・昼・夕食後に 7 日間連日摂取した。翌日の朝に採血後、ビタミン剤②を同様に 7 日間連続摂取した。また、翌朝採血後にビタミン剤③を 7 日間連続摂取し、摂取終了後の翌朝に採血した。ビタミン剤①、②、③に含まれる脂溶性ビタミン含量は表 4-2 に示す通りである。ビタミン剤①には、2005 年版日本人の食事摂取基準に相当するビタミン E ((+)- α -トコフェロール) 9 mg、ビタミン D (コレカルシフェロール) 0.005 mg、ビタミン K (PK : フィロキノン) 0.075 mg、および食事摂取基準の 60% に相当するビタミン A (レチニルアセテート) RE 0.45 mg が含まれる。ビタミン剤②および③は、それぞれビタミン剤①の 3 倍量および 6 倍量である。ビタミン A については、ビタミン剤③の最大摂取量が食事摂取基準の上限値を超えないように含量を調整した。摂取水分は所定のペットボトル入りの水のみである。ただし、飲水量は自由である。

<測定項目>

血清中のレチノール、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -トコフェロール、25OHD、PTH (intact PTH)、PK、メナキノン (MK-4、MK-7)、ucOC 濃度を測定した。また、血中総脂質、総コレステロール、中性脂肪濃度についても測定した。

<統計解析>

1 週目 (摂取前)、2 週目 (ビタミン剤①を 1 週間摂取後)、3 週目 (ビタミン剤②を 1 週間摂取後)、4 週目 (ビタミン剤③を 1 週間摂取後) の血中脂溶性ビタミン濃度および生体指標である PTH あるいは ucOC 濃度の平均値を、一元配置分散分析法

(ANOVA) により解析した。ANOVA で有意になったパラメーターにつき、1 週目をコントロールとする対応のある t-検定を行い、1 週目 (初期値) に対して有意に変化した週を求めた。

【結果および考察】

<ビタミン A>

血中レチノール濃度は、いずれの含量のビタミン剤の摂取にかかわらず変化しなかった (表 4-3, 図 4-1)。摂取されたビタミン A は、主に肝臓の細胞内レチノール結合たんぱく質 (CRBP) と結合して貯蔵される。肝組織のビタミン A 濃度は $30 \mu\text{g/g}$ が最大限と考えられており、平均肝臓重量が 1.5kg とした場合の肝臓で貯蔵できるビタミン A は 450 mg と推定される^{1,2}。摂取したビタミン A が肝臓における貯蔵可能な量以下であれば、血中濃度はあまり変化しない。一方、

最低量の肝臓内ビタミン A 蓄積量は $20 \mu\text{g/g}$ ³ とされており、肝臓の蓄積量がこれ以下になると血漿中レチノール濃度は低下する⁴。血中では RBP-トランスサイレチン (TTR) 複合体と結合して輸送され、健康成人の平均血中レチノール濃度は $0.50 \pm 0.31 \text{mg/L}$ と報告されている。また、 0.3mg/L 以下がビタミン A 欠乏⁵、 1.0mg/L 以上が過剰の目安⁶となっている。今回の対象者の血中レチノール濃度は平均的であり、個々の数値からビタミン A 欠乏者もなく、摂取後の過剰者もないと判断された (図 4-2)。ビタミン A の栄養状態の判定指標としては、肝臓のビタミン A 貯蔵量が最も良い指標になるとされ、現在の食事摂取基準では、体内のビタミン A 消失率、体重あたりの肝臓重量、ビタミン A 蓄積量の体全体と肝臓の比 1.1 およびビタミン A 蓄積効率から算出されている。今回使用したビタミン剤②のレチノール含量は推奨量の 1.8 倍、ビタミン剤③では 3.6 倍となっている。摂取期間を通して平均血中濃度に変化がないことから、今回の摂取量は肝臓最大貯蔵量の範囲内の量であったと考えられるが、個々の濃度変化を観察すると 4 週目では 11 名中 4 名 (36% : No.1, 4, 7, 9) において血中濃度の上昇が観察されている。このことから、ビタミン剤③の 2.7mg RE/日 は、肝臓での飽和量に近い量である可能性が示唆された。

<ビタミン E>

血中 α -トコフェロール濃度は、摂取量の増加とともに有意に増加した (表 4-3, 図 4-3)。個々の数値の変動においても、例外なく上昇が見られる (図 45-4 最上段)。ピ

タミン E の欠乏指標となる血中 α -トコフェロール濃度は 5 mg/L 以下⁵であることから、欠乏症と考えられる対象者はいないと判断された。血中 α -トコフェロール濃度は、血中コレステロールあるいはトリグリセリド濃度と相関することが知られ⁷、今回の場合も総脂質 ($p=0.033$)、総コレステロール ($p=0.023$) と相関した。また、図 4-5 に示すように BMI とも有意に相関した。また、血中レチノール濃度と α -トコフェロール濃度も有意な正相関関係を示した (図 4-6) が、BMI (図 4-7) や総脂質、総コレステロールとレチノール濃度には統計的に有意な相関はみられなかった。前述のように、レチノールは肝臓で合成される RBP-TTR 複合体と結合して血中を循環することから、肝臓でのこれらの蛋白質の合成能が血中濃度に関与していると考えられる。 α -トコフェロールは、肝臓中で α -トコフェロール輸送蛋白質 (α -TTP) を介して、VLDL に引き渡され血中を循環する。ビタミン E は、目安量の 10 倍程度までの範囲では、摂取量に比例して血中 α -トコフェロール濃度が上昇し、それ以上になると肝臓の α -TTP との結合能に制限があるために上昇率は低下するといわれている⁸。今回の対象者において、大部分の血中 α -トコフェロール濃度は 1~4 週目まで直線的に上昇しているが、No.2 と No.4 の対象者においては 3 週目から 4 週目にかけての上昇率が低い (図 4-4)。4 週目の摂取量は目安量の 6 倍であり、10 倍以上ではないものの個人レベルでは摂取量が肝臓の α -TTP に対して飽和し始める量ではないかと推察される。一方、 γ -トコ

フェロール濃度は摂取量の増加とともに顕著に低下し、 β -トコフェロール濃度も有意に低下した。 γ -および β -トコフェロールも α -トコフェロールよりは弱いものの α -TTP と結合するため、 α -トコフェロール摂取量の増加に伴って肝臓で α -TTP と競合することにより血中濃度が低下したと考えられる。

<ビタミン D>

ビタミン D 栄養を最もよく反映するビタミン D 代謝物は 25(OH)D である。25(OH)D 濃度測定法として現在最も繁用されているのは、Radioimmunoassay 法 (RIA 法) であるが、この方法では血中の 25(OH)D₂、25(OH)D₃ および 24,25(OH)₂D に対して同等の交差反応性を示す抗体を用いるため、RIA 測定値はこれらの代謝物の合算値を示す。一方、われわれが新規に開発した LC-APCI/MS/MS 法による測定 (平成 16 年度に報告) では、これらの代謝物を全て分別定量できる。そこで、今回の研究では LC-APCI/MS/MS 法によりビタミン剤に配合されたコレカルシフェロール (ビタミン D₃) 由来の 25(OH)D₃ 濃度と 25(OH)D₂、24,25(OH)₂D₃ を分別定量した。測定値としては、25(OH)D₃ 濃度および RIA 法で求められると同様の 25(OH)D₂/D₃ と 24,25(OH)₂D₃ の合算値を示す。

表 4-3 に示したように、血中 25(OH)D₃ 濃度は、摂取期間を通して有意に上昇した。対象者の初期血中 25(OH)D₃ 濃度は 20 ng/mL 前後であり、平均的にはビタミン D 栄養がほぼ充足された状態であったといえる。血中 25(OH)D 濃度の半減期は 1 ヶ月程

度と長いため、この初期値のビタミンD栄養は試験開始前のビタミンD摂取状態を反映している。一方、血中PTH濃度に有意な変化は見られなかった。血中PTH濃度の健常者の基準値は10~60 pg/mLであり、いずれの対象者もこの範囲に入っていた。血中PTH濃度は25(OH)D濃度が20 ng/mL以下で上昇し始めることから、ビタミン栄養がある程度充足している今回の対象者ではビタミンD摂取によるPTH濃度への影響は低かったと考えられる。一方、個々の測定値を比較すると、血中25(OH)D濃度とPTH濃度の変化にはある一定の関係が見られるように思われる。図4-8に示すように、血中PTH濃度が初期値に比べて低下した対象者は、No.3, 4, 9, 12である。この4名の血中25(OH)D₃あるいは25(OH)Dおよび24,25(OH)₂D₃濃度の合算値は良好に上昇し、4週目には30 ng/mLを超えている。No.5とNo.7に関しては、例外的であるが、No.5の血中PTH濃度の初期値は健常者下限に近く(16 pg/mL)、血中25(OH)D濃度が十分に上昇してもPTH濃度はそれ以上に低下しなかったのではないかと考えられた。No.7において、PTH濃度が低下しなかった理由は不明であるが、PTH濃度にはCaおよびP摂取量や腎機能なども関与するためこれらが影響した可能性も考えられる。Chapuyら⁹は、PTH濃度低下を指標としたビタミンD栄養のカットオフ値として30 ng/mLを提案しており、今回の結果からも血中25(OH)D濃度が30 ng/mLを超えるか否かはPTH濃度低下に影響を与えるものと考えられた。

ビタミンDの体内飽和量の評価にあつ

ては、ビタミンDの生体内栄養指標であるPTH濃度が一定の低値に達し、それ以上に低下しないビタミンD摂取量あるいは血中25(OH)D濃度ということを念頭に検討した。その結果、個々のデータから20~30ng/mLの範囲ではPTH濃度はほとんど変動しないが、30 ng/mL以上に上昇する場合はPTH濃度がさらに徐々に低下する傾向がみられ、明らかな体内飽和量を見出すことはできなかった。PTH濃度が一定の低値に達するのは、少なくとも25(OH)D濃度30 ng/mL以上であると思われる。本試験の最高摂取量である30 μg/dayの1週間摂取では、血中25(OH)D濃度が30 ng/mLに達する対象者とそうでない場合があるが、体内飽和量に達する摂取量は30 μg/day以上である可能性が高い。しかし、長半減期の25(OH)D濃度がビタミンDの摂取量を反映して反復摂取後一定濃度維持に到達するには約1ヶ月間が必要であると考えられ、もう少し長期間の観察が必要と判断された。

<ビタミンK>

ビタミンKには、K₁(フィロキノロン:PK)と側鎖構造の異なるK₂(メナキノロン)があり、ビタミン剤にはPKを添加している。血中ビタミンK濃度として、PKとメナキノロン-4(MK-4)、メナキノロン-7(MK-7)を測定した結果、いずれの濃度も有意に変化しなかった(表4-3)。ビタミン剤にはPKが添加されているため、血中PK濃度の上昇が予想されたが、上昇傾向がみられたのみでその変化は統計的に有意ではなかった。また、ビタミンK濃度と逆相関することが知られるucOC濃度も、低下の傾向はみら

れたが摂取期間を通して有意に変化しなかった。表には示していないが、PIVKaIIは十分な低値を示し、変化はみられなかった。個々の血中PK濃度とucOC濃度を図4-9に示した。血中PK濃度は、ほとんどの対象者において上昇したが、No.9では低下、No.11, 12では1週目と4週目の濃度にほとんど変化がみられなかった。そこで、PK濃度が著減したNo.9を除いて、血中PK濃度の変化率を計算した。変化率の計算は、1週目の血中濃度を1として2週目、3週目、4週目の変化率を個々に算出した。図4-10の左に全対象者のPK濃度変化率を、右にNo.9除外後の変化率を示した。その結果、No.9除外後の血中PK濃度は有意に上昇し、4週目の上昇率は1週目の1.24倍程度であった。フィロキノンは代謝回転が速く、経口摂取後4~6時間目に最高濃度に達し、12時間後には最高濃度の15%程度に減少、24時間後にはほとんど血中から消失する^{10, 11}。一方、MK-7の血中半減期はPKに比べてかなり長い¹⁰。今回の研究プロトコールでは、前日の夕食後にビタミン剤を摂取し、翌朝の朝食前に採血するため、摂取後の血中PK濃度かなり低下した状態であり、血中濃度は摂取量を反映し難かったと考えられた。

一方、No.5, 7, 10, 11, 12の対象者では血中ucOC濃度が低下したが、血中PK濃度が上昇した対象者とは必ずしも一致しなかった。ucOC濃度の変化率も低下傾向にあったが、有意ではなかった(図4-11)。これらのことから、今回の検討ではビタミンK摂取量からビタミンKの充足量あるいは飽和量を知ることが困難であると考えられた。本研究に

類似した報告として、Schurgersら¹²は抗血液凝固薬を服用させた健常成人に、50、100、150、200、250、300、500 $\mu\text{g/day}$ を順次7日間ずつ摂取させ、プロトロンビン時間(INR値)、血中非カルボキシル化凝固因子II(ucFIIc)およびucOC濃度の変動を調べている。その報告では、血液凝固に関連するINRは150 $\mu\text{g/day}$ で、ucFIIcは100 $\mu\text{g/day}$ で有意に低下したのに対し、骨関連指標であるucOCは300 $\mu\text{g/day}$ で有意に低下している。OCのカルボキシル化に必要なビタミンKは血液凝固に必要な量より高く、ビタミン剤②(270 $\mu\text{g/day}$)に近い服用量でucOCを低下させている。Schurgersらは予め抗血液凝固薬を服用させた健常成人を対象としているが、われわれの検討では全くの健常者にPKを摂取させているため、オステオカルシンのグラ化に関する作用が現れ難かったものと考えられた。

前述のように、血中PKあるいはMK-7濃度とucOC濃度は負相関することが知られており、われわれもucOC濃度を十分に低下させるために必要な血中PK、MK-7濃度は、年齢とともに増加することを昨年報告している¹³。そこで、1~4週目の全ての検体の血中PK濃度とucOC濃度の関係を調べた結果、いずれにおいても有意な相関はみられなかった(図4-12)。しかし、図4-13に示すようにNo.4の検体のみが血中PK濃度が高いにもかかわらずucOC濃度が例外的に高く、No.4を除く対象者で再度相関関係を評価した結果、PK、MK-7、TotalビタミンK濃度のいずれともucOC濃度は有意な負の相関関係を示した。血中ビタミンK

濃度は、摂取量と別に明らかに個人差がある(図 4-9)。血中では主にリポ蛋白質と結合して輸送されるため、一般的には血中のトリアシルグリセロール濃度と相関することが知られているが、今回の場合、トリアシルグリセロール、血中総脂質、総コレステロール濃度との相関はみられなかった。初期値の血中 PK 濃度とレチノール濃度あるいは α -トコフェロール濃度に相関は見られなかったが、BMI と血中 PK 濃度は有意に正相関した ($p=0.0243$, $r^2=0.447$)。MK-4 と MK-7 濃度については、BMI との相関は認められなかった。

これらのことから、血中 PK 濃度は BMI に関連する何らかの因子によってある程度規定されるものと判断され、ucOC 濃度は血中 PK 濃度に相関すると考えられた。PK 摂取の増加とともに ucOC の低下が見られる対象者もあったが、今回の研究結果からビタミン K 摂取の飽和量を求めることは困難であった。

【参考文献】

1. Silverman AK, Ellis CN, Voorhees JJ, Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J Am Acad Dermatol*, 1987, 16(5 Pt 1); 1027-39.
2. Leo MA, Lieber CS, Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69; 1071-85.
3. Olson JA, Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am J Clin Nutr*, 1987, 45; 704-16
4. Loerch JD, Underwood BA, Lewis KC, Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. *J Nutr*, 1979, 109; 778-86.
5. Haller J, Lowik MR, Ferry M, Ferro-Luzzi A, Nutritional status: blood vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotene. Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr*, 199, 45 S3; 63-82.
6. Bendich A, Langseth L. Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr*. 1989, 49; 358-71.
7. Gomez-Coronado D, Entrala A, Alvarez JJ, Ortega H, Olmos JM, Castro M, Sastre A, Herrera E, Lasuncion MA, Influence of apolipoprotein E polymorphism on plasma vitamin A and vitamin E levels *European Journal of Clinical Investigation*, 2002, 32; 251-258
8. 平井俊策 編, ビタミンEの臨床—最近の知見と臨床応用への展望—, 医薬ジャーナル社, p35-37.
9. Chapuy MC, Meunier PJ, Prevention of secondary hyperparathyroidism and hip fracture in elderly women with calcium and vitamin D₃ supplements. *Osteoporos Int*. 1996, 6 Suppl 3:60-3.
10. Schurgers LJ, Vermeer C, Determination of phylloquinone and menaquinones in food, *Haemostasis* 2000, 30; 298-307.
11. Hagstrom JN, Bovill EG, Soll RF, Davidson KW, Sadowski JA, The pharmacokinetics and lipoprotein fraction distribution of intramuscular vs. oral vitamin

- K₁ supplementation in women of childbearing age: effects on hemostasis. *Thromb Haemost*, 1995, 74; 1486-90.
12. Schurgers LJ, Shearer MJ, Hamulyak K, Stocklin E, Vermeer C, Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects. *Blood*, 2004, 104; 2682-9.
13. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T, Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr.* 2006, 83; 380-6.
- spectrometry”*Anal. Chem.* 2005, 77; 3001-7.
4. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Okano T, Determination of fat-soluble vitamins in human plasma, breast milk and food samples – Application in nutrition survey for establishment of “Dietary Reference Intakes for Japanese, *J Health Sci.* 2007, 53; in press.
5. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T, Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin, *Am J Clin Nutr.* 2006, 83; 380-6.

【投稿論文】

1. Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T,, Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.” *Anal. Chem.* 2005, 77; 757-63.
2. Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Okano T, Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards, *J. Chromatogr. B*, 2005, 816; 41-8
3. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T, Method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”*Anal. Chem.* 2005, 77; 3001-7.
4. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Okano T, Determination of fat-soluble vitamins in human plasma, breast milk and food samples – Application in nutrition survey for establishment of “Dietary Reference Intakes for Japanese, *J Health Sci.* 2007, 53; in press.
5. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T, Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin, *Am J Clin Nutr.* 2006, 83; 380-6.
6. 津川尚子、鎌尾まや、須原義智、岡野登志夫「血中 25-ヒドロキシビタミン D の新規定量法の開発と臨床応用」 *Osteoporosis Japan*, 2006, 14; 679-684
7. Naoko Tsugawa, Masataka Shiraki, Yoshitomo Suhara, Maya Kamao, Kiyoshi Tanaka, and Toshio Okano, Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab*, 投稿中
8. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, Nishino R, Ukita T, Tanaka K, Okano T, Multianalyte quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, 投稿中

【学会発表】

1. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登

- 志夫「内部標準-蛍光検出 HPLC 法を用いた食品中ビタミン K 類縁体の定量」日本栄養・食糧学会近畿支部大会、平成 16 年 10 月 16 日、滋賀県立大学
2. 津川 尚子、須原 義智、岡野 登志夫「RIA 法と LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度測定と比較」第 6 回日本骨粗鬆症学会、平成 16 年 11 月 18 日、大宮..
 3. 津川 尚子、岡野 登志夫、他「思春期の骨代謝におけるビタミン D 栄養の重要性」第 6 回日本骨粗鬆症学会、平成 16 年 11 月 18 日、大宮..
 4. 津川 尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野 登志夫、他「日本人高齢女性を中心としたビタミン K 栄養状態と骨代謝の関係」第 53 回関西カルシウム懇話会平成 16 年 11 月 23 日、大阪.
 5. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登志夫「内部標準-蛍光検出 HPLC 法による各種食品中ビタミン K 類縁体含量の測定」日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月 30 日、東京
 6. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫「LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度の測定」日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月 30 日、東京.
 7. 津川 尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫、他「思春期の骨代謝とビタミン D 栄養の関係」第 54 回関西カルシウム懇話会、平成 17 年 4 月 23 日、大阪.
 8. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登志夫「日本人の食事性ビタミン K 摂取量調査を目的とした食品中ビタミン K 類縁体の定量」日本ビタミン学会第 57 回大会、平成 17 年 5 月 26 日、志摩
 9. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫「LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度測定法の開発」日本ビタミン学会第 57 回大会、平成 17 年 5 月 27 日、志摩
 10. 岡野登志夫、津川尚子、須原義智、鎌尾まや “A Precise and Sensitive Method for the Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry” 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 2005. 6.26 Geneva.
 11. 津川尚子、岡野登志夫、他 “Vitamin D Status, Parathyroid Function and Bone Mineral Density in Japanese Adolescent Males and Females” 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 2005. 6.27 Geneva.
 12. 鎌尾まや、内野由理、上野雅子、山口紀子、津川尚子、白木正孝、上西一弘、石田裕美、岡野登志夫「高齢者におけるビタミン K 栄養調査を目的とした血漿中および食品中ビタミン K の定量」第 7 回日本骨粗鬆症学会、平成 17 年 10 月 14 日、大阪
 13. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫、他「日本人高齢女性における血中ビタミン K 濃度と骨折との関係」、第 7

回日本骨粗鬆症学会、平成 17 年 10 月 14 日、大阪.

14. 尾崎玲央、津川尚子、上西一弘、石田裕美、岡野登志夫「思春期におけるビタミン D 栄養と骨代謝」日本薬学会第 126 年会、平成 18 年 3 月 29 日、仙台
15. 津川 尚子、須原 義智、鎌尾 まや、尾崎 玲央、岡野 登志夫、田中 清、白木 正孝「日本人高齢女性における血中ビタミン K 濃度と骨代謝マーカーおよび骨折との関係」第 28 回ビタミン学会、平成 18 年 5 月 27 日、徳島
16. 津川尚子、尾崎玲央、上西一弘、石田裕美、岡野登志夫「副甲状腺ホルモンならびに踵骨骨密度を指標とした思春期ビタミン D 栄養の評価」第 24 回骨代謝学会、平成 18 年 7 月 7 日、東京
17. 鎌尾まや、津川尚子、須原義智、岡野登志夫「日本人の食事摂取基準策定を目的とした日本人授乳婦の脂溶性ビタミン栄養調査」フォーラム 2006 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 18 年 10 月 31 日、東京

1. 血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の開発

図 1-1 内部標準物質 (MK-4-¹⁸O、PK-¹⁸O、MK-7-¹⁸O) の化学構造

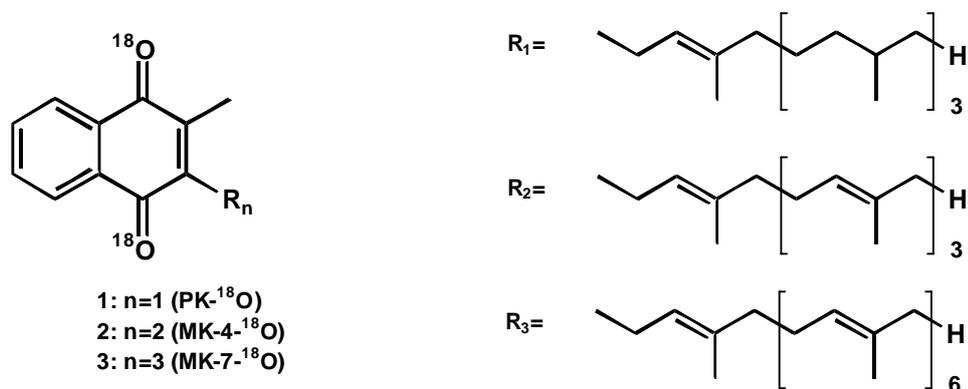
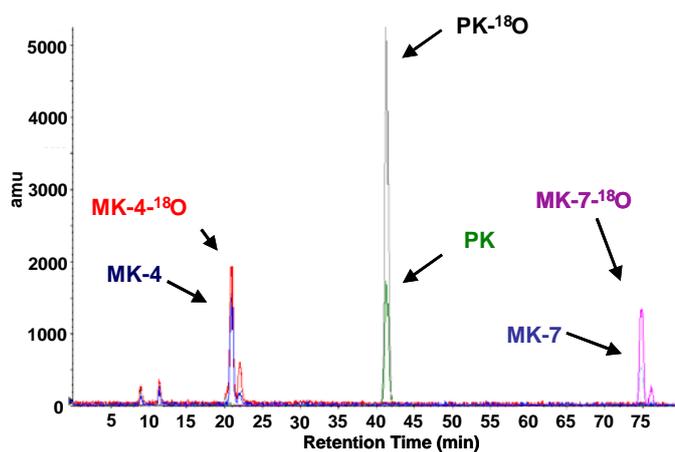


図 1-2 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム

(i) Standards and their internal standards



(ii) Human plasma sample with internal standards

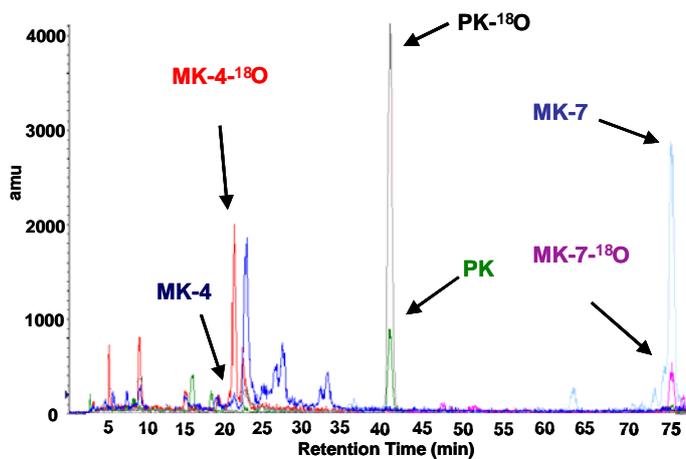


図 1-3 ビタミン K 類の標準検量線

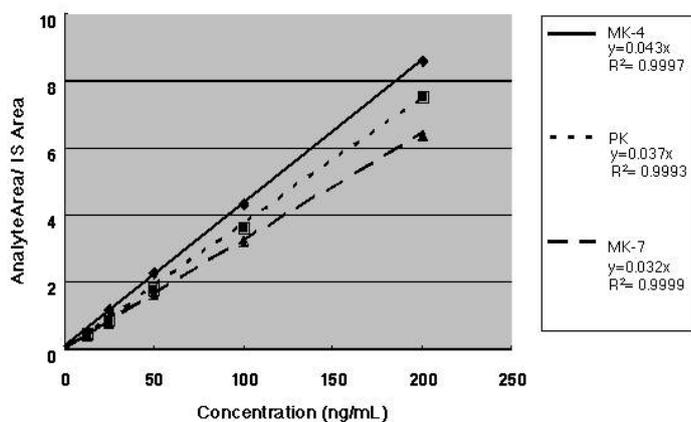


Figure S-1. Calibration Curves for Vitamin K Homologues

表 1-1 標準血清におけるビタミン K 濃度の測定と精度評価

		PK	MK-4	MK-7
Quantitation limit (pg/mL)		40	50	80
Recovery				
	Mean±S.D. (ng/mL)	1.89 ± 0.05	0.43 ± 0.02	3.19 ± 0.20
	RSD (%)	2.65	4.65	6.27
	Recovery (%)	98 ± 3	102 ± 5	102 ± 6
Intra-assay				
Control serum	Mean±S.D. (ng/mL)	0.95 ± 0.04	0.27 ± 0.01	1.44 ± 0.08
	RSD (%)	6.21	4.79	5.85
Inter-assay				
Control serum	Mean±S.D. (ng/mL)	1.03 ± 0.06	0.21 ± 0.02	1.51 ± 0.04
	RSD (%)	6.21	9.10	2.97

図 1-4 PK、MK-n および内部標準物質の化学構造

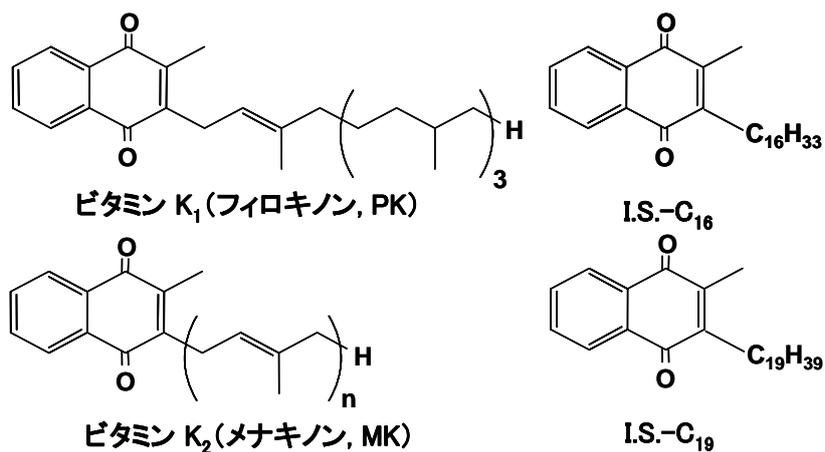


表 1-2 添加回収実験の結果

		PK	MK-4	MK-7
低濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	103±5.2	93±8.6	97±6.1
	変動係数 (%)	5.0	9.2	6.3
中濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	99±2.3	101±2.5	101±4.6
	変動係数 (%)	2.3	2.5	4.6
高濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	99±2.0	99±5.2	104±3.2
	変動係数 (%)	2.0	5.3	3.1

PK 添加量 : 低濃度 0.4 ng、中濃度 0.8 ng、高濃度 1.6 ng

MK-4 添加量: 低濃度 0.1 ng、中濃度 0.2 ng、高濃度 0.4 ng

MK-7 添加量: 低濃度 0.75 ng、中濃度 1.5 ng、高濃度 3.0 ng

表 1-3 日内変動および日差変動

		PK	MK-4	MK-7
日内変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.145±0.014	0.179±0.014	0.067±0.013
	変動係数 (%)	9.6	7.5	19.3
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.270±0.084	0.353±0.021	0.693±0.061
	変動係数 (%)	6.6	6.0	8.8
日差変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.152±0.008	0.191±0.011	0.076±0.011
	変動係数 (%)	5.3	5.7	13.9
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.193±0.058	0.332±0.031	0.598±0.038
	変動係数 (%)	4.9	9.2	6.3

表 1-4 健常人およびMK-4を投薬されている骨粗鬆症患者の血漿中
ビタミン K 濃度

		PK	MK-4	MK-7
健常人 (n=20)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.814±1.107	0.149±0.172	16.27±20.5
LC-APCI/MS 法	平均±標準誤差 (ng/mL)	2.163±1.340	0.392±0.457	17.53±22.5
骨粗鬆症患者 (n=10)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.621±0.245	46.83±46.41	4.179±6.28
LC-APCI/MS 法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.850±0.272	51.89±44.88	4.128±6.37

図 1-5 蛍光検出法と LC-APCI/MS 法の相関

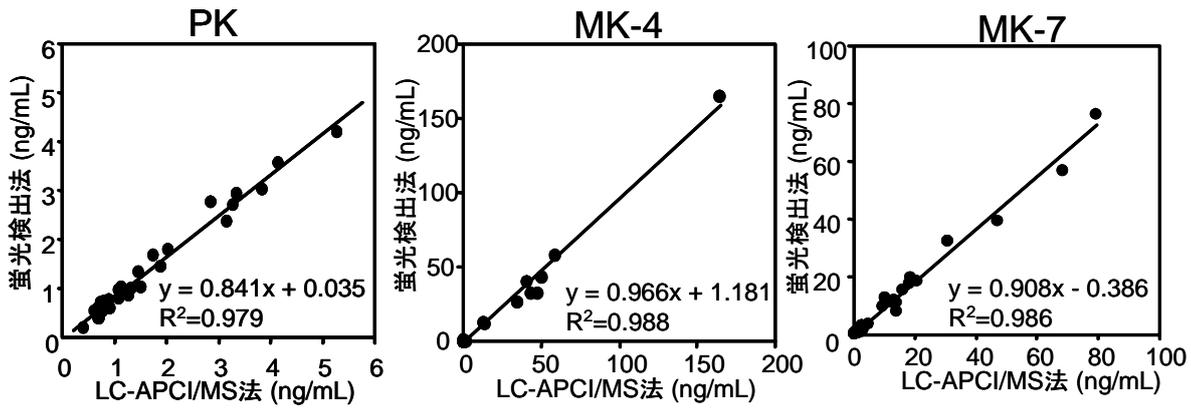


図 1-6 25(OH)D₂/D₃、24, 25(OH)₂D₃ 及び [²H₆]-25(OH)D₃ の化学構造

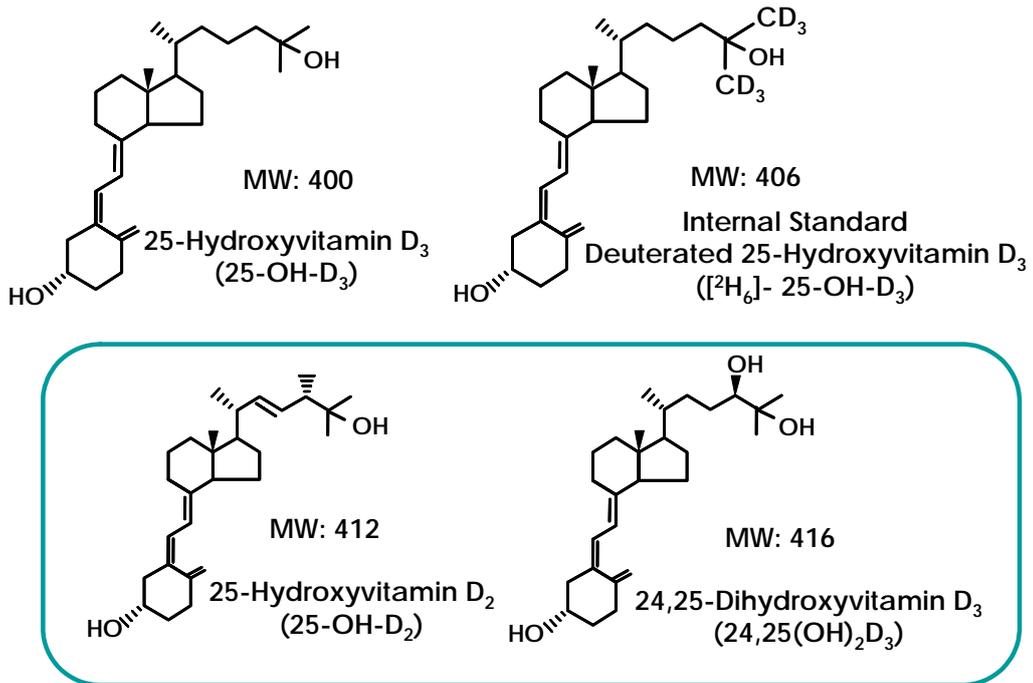


図 1-7 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム

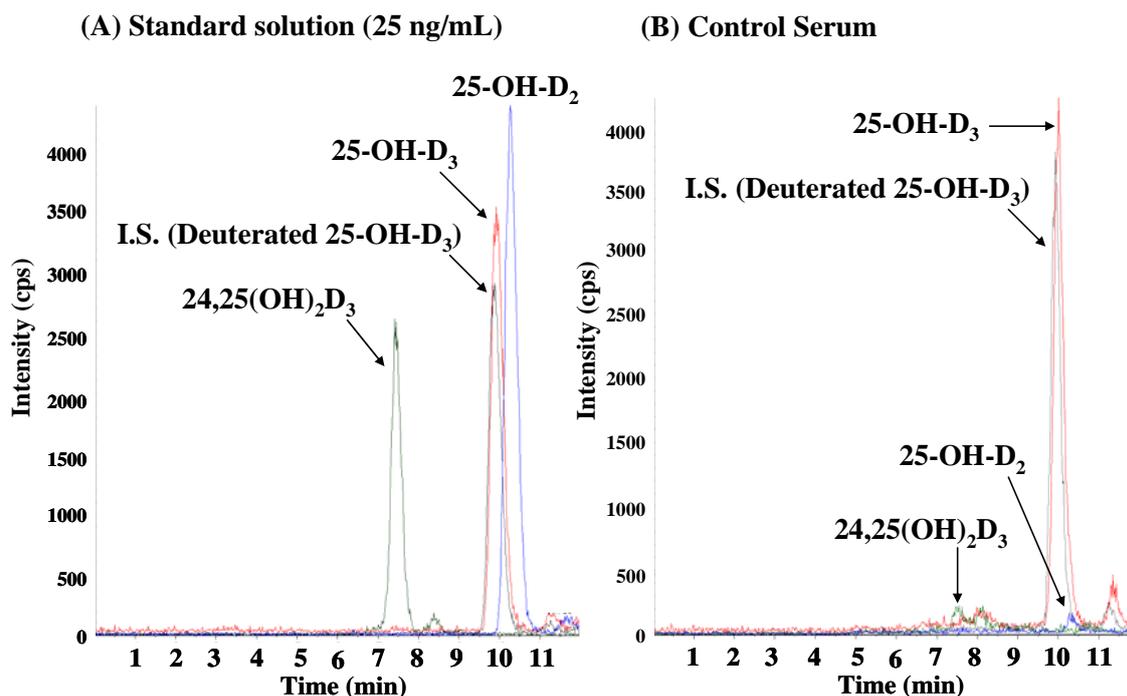
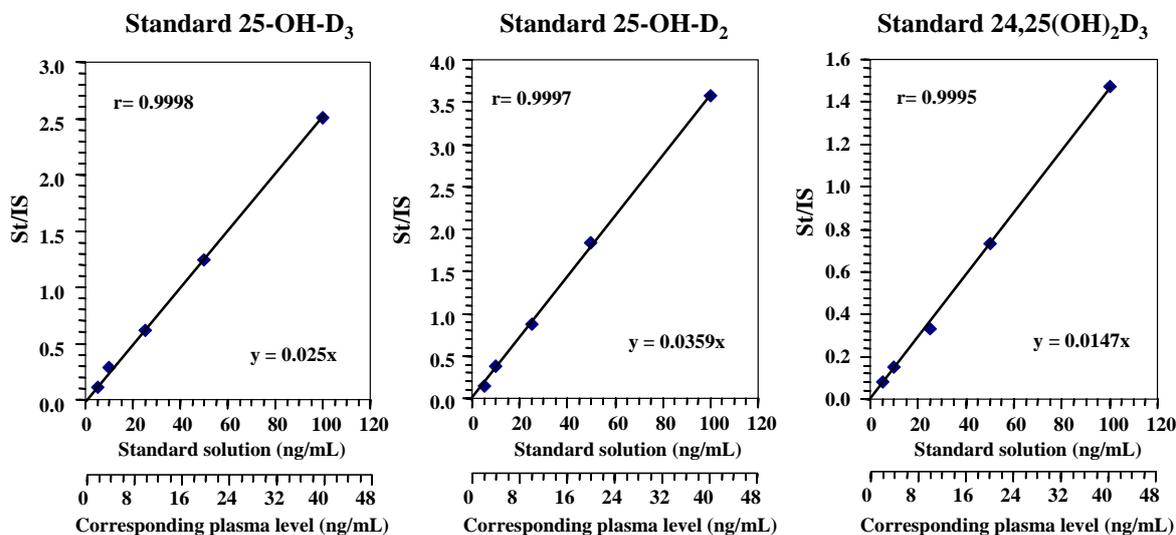


図 1-8 ビタミン D 代謝物の標準検量線



Calibration curves for 25-OH-D₃, 25-OH-D₂ and 24,25(OH)₂D₃.

Deuterated 25-OH-D₃ was used as internal standard for three vitamin D metabolites. All values were calculated as ratios St (intensity of standard are) / IS (intensity of internal standard area). The measured data of samples were converted to the concentration in 1 ml of plasma according to the following equation: plasma concentration (ng/mL) = measured data x (20/50).

表 1-5 標準血清を用いたビタミン D 代謝物濃度の精度評価

Metabolites	Mean±SD	RSD %
25-OH-D₃		
Intra assay (n=10)	20.0 ± 1.1 ng/mL	5.7
Inter assay (n=5)	18.6 ± 0.5 ng/mL	2.5
Recovery (n=5)	103.8 ± 4.3 (%)	4.1
25-OH-D₂		
Intra assay (n=10)	2.5 ± 0.1 ng/mL	4.5
Inter assay (n=5)	2.7 ± 0.1 ng/mL	5.1
Recovery (n=5)	99.3 ± 2.2 (%)	2.2
24,25(OH)₂D₃		
Intra assay (n=10)	2.8 ± 0.3 ng/mL	11.4
Inter assay (n=5)	2.5 ± 0.3 ng/mL	9.9
Recovery (n=5)	98.8 ± 5.1 (%)	5.2

図 1-9 LC-APCI/MS/MS 法と RIA 法による 25(OH)D 濃度測定値の比較

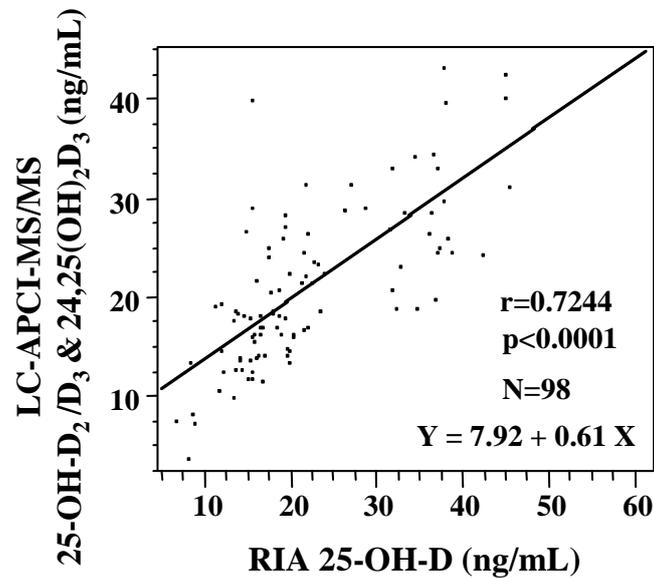


表 1-6 25(OH)D 濃度と血中 PTH 濃度との相関

	Whole PTH		Total intact PTH	
	r	p value	r	p value
LC-APCI MS/MS				
25-OH-D ₃	- 0.2078	0.0401*	- 0.2323	0.0213 *
25-OH-D ₂ /D ₃	- 0.2294	0.0231 *	- 0.2489	0.0135 *
25-OH-D ₂ /D ₃ & 24,25(OH) ₂ D ₃	- 0.2273	0.0244 *	- 0.2461	0.0146 *
RIA 25-OH-D	- 0.0817	0.4240	- 0.0587	0.5660

図 1-10 内部標準物質の化学構造

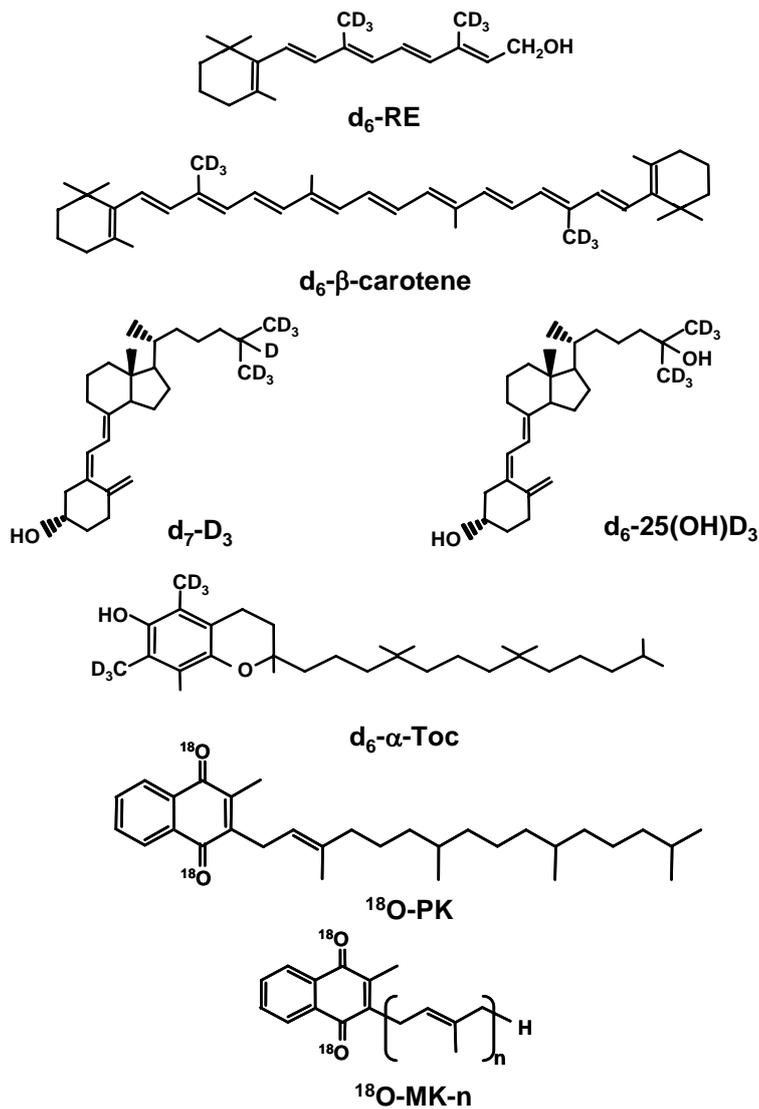


図 1-11 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム

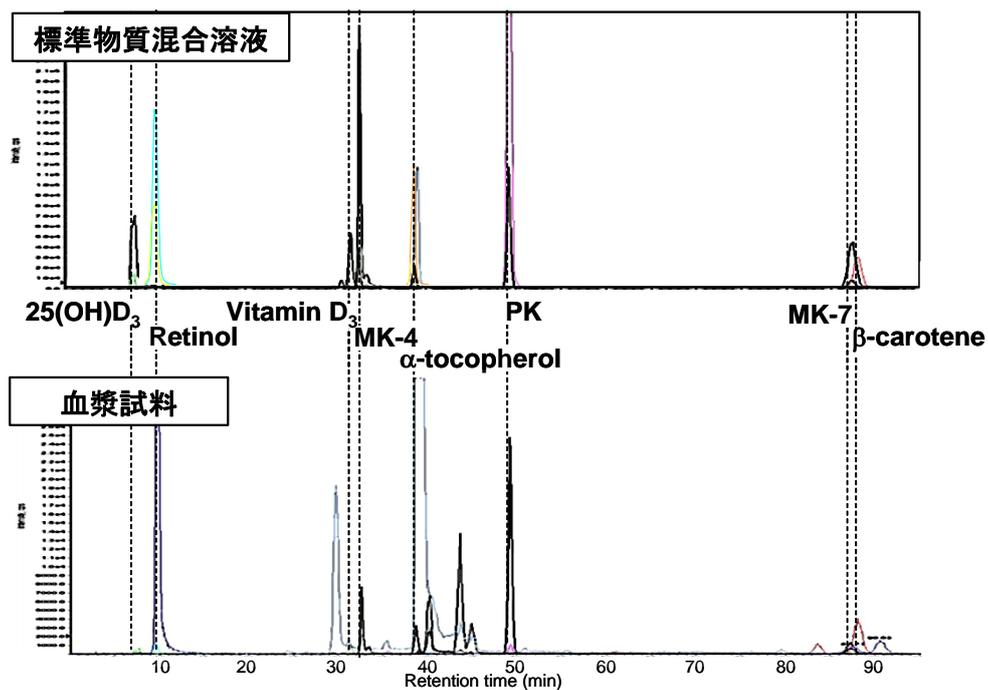


表 1-7 検出限界とプール血漿における添加回収率

	Retinol	β-carotene	Vitamin D ₃	25(OH)D ₃
検出限界(pg)	500	250	250	250
添加回収率 Mean±S.D(%)	96.34±4.19	92.86±4.74	96.90±7.74	105.98±5.42
C.V.(%)	4.34	5.10	7.98	5.12

	α-tocopherol	PK	MK-4	MK-7
検出限界(pg)	100	25	25	50
添加回収率 Mean±S.D(%)	109.7±17.37	112.14±10.76	101.21±6.61	101.85±5.10
C.V.(%)	6.72	9.60	6.53	5.00

表 1-8 プール血漿における測定精度

	Retinol ($\mu\text{g/dL}$)	β -carotene ($\mu\text{g/dL}$)	Vitamin D ₃ (ng/mL)	25(OH)D ₃ (ng/mL)
同時再現性 Mean \pm S.D. C.V.(%)	55.52 \pm 1.63 2.94	28.46 \pm 2.27 7.97	0.33 \pm 0.03 8.81	22.67 \pm 1.49 6.56
日差再現性 Mean \pm S.D. C.V.(%)	60.19 \pm 3.29 5.47	29.80 \pm 1.71 5.73	0.33 \pm 0.06 17.20	22.67 \pm 1.01 4.47

	α -tocopherol (mg/mL)	PK (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)
同時再現性 Mean \pm S.D. C.V.(%)	13.11 \pm 0.70 5.33	1.77 \pm 0.15 8.45	1.92 \pm 0.11 5.88	7.49 \pm 0.44 5.86
日差再現性 Mean \pm S.D. C.V.(%)	12.68 \pm 0.47 3.69	1.91 \pm 0.18 9.28	2.01 \pm 0.10 4.76	7.01 \pm 0.68 9.68

表 1-9 プール血漿測定値の従来法との比較

	Retinol ($\mu\text{g/dL}$)	β -carotene ($\mu\text{g/dL}$)	25(OH)D ₃ (ng/mL)	α -tocopherol (mg/mL)
LC-APCI/MS/MS法	55.52 \pm 1.63	28.46 \pm 2.27	22.67 \pm 1.49	13.11 \pm 0.70
従来法	55.99 \pm 3.57 (蛍光検出HPLC法)	22.03 \pm 2.05 (可視検出HPLC法)	22.78 \pm 0.89 (化学発光法)	13.00 \pm 0.37 (蛍光検出HPLC法)

	PK (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)
LC-APCI/MS/MS法	1.77 \pm 0.15	1.92 \pm 0.11	7.49 \pm 0.44
従来法	1.49 \pm 0.12 (蛍光検出HPLC法)	1.95 \pm 0.11 (蛍光検出HPLC法)	7.66 \pm 0.42 (蛍光検出HPLC法)

値はMean \pm S.D.

図1-12 標準溶液および血漿抽出液の LC-APCI/MS/MS クロマトグラム

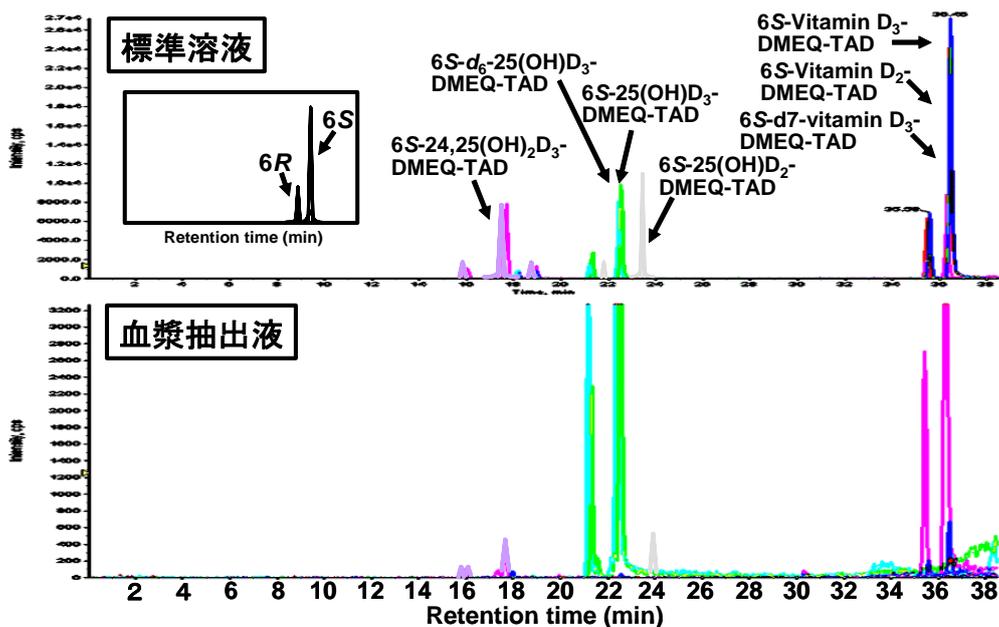


表 1-10 検出限界及びプール血漿を用いて算出した添加回収率、日内再現性、日差再現性

	D ₃	D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂	24,25(OH) ₂ D ₃
検出限界 (pg)	2	2	3	3	6
添加回収率					
Mean ± SD (%)	108.5 ± 2.5	108.7 ± 4.2	97.6 ± 2.2	92.5 ± 3.3	94.2 ± 6.0
C.V. (%)	2.3	3.9	2.2	3.6	6.4
日内再現性					
Mean ± SD (ng/mL)	0.729 ± 0.015	0.064 ± 0.005	21.48 ± 0.485	0.575 ± 0.018	1.311 ± 0.056
C.V. (%)	2.0	7.8	2.3	3.2	2.3
日差再現性					
Mean ± SD (ng/mL)	0.823 ± 0.051	0.066 ± 0.009	21.50 ± 1.41	0.580 ± 0.044	1.387 ± 0.099
C.V. (%)	6.2	13.7	6.5	7.6	7.1

表 1-11 プール母乳を用いて算出した添加回収率及び日内再現性

	D ₃	D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂
添加回収率				
Mean ± SD (%)	97.5 ± 3.8	105.0 ± 4.7	93.9 ± 3.0	90.9 ± 8.8
C.V. (%)	3.9	4.5	3.1	9.7
日内再現性				
Mean ± SD (ng/mL)	0.040 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.117 ± 0.005	0.006 ± 0.001
C.V. (%)	5.4	11.9	4.0	9.8

表 1-12 母乳試料における添加回収率と同時再現性

	Retinol	β -carotene	Vitamin D ₃	25(OH)D ₃
添加回収率				
Mean \pm S.D. (%)	97.59 \pm 5.38	97.37 \pm 7.04	97.68 \pm 17.66	100.41 \pm 2.19
C.V.(%)	5.52	8.16	18.08	2.18
同時再現性				
Mean \pm S.D.	0.49 \pm 0.01 (μ g/mL)	0.03 \pm 0.00 (μ g/mL)	0.84 \pm 0.04 (ng/mL)	0.19 \pm 0.01 (ng/mL)
C.V.(%)	6.03	3.82	4.80	2.93

	α -tocopherol	PK	MK-4	MK-7
添加回収率				
Mean \pm S.D. (%)	96.33 \pm 5.49	97.53 \pm 8.34	99.35 \pm 7.91	97.08 \pm 5.56
C.V.(%)	5.70	8.55	7.96	5.73
同時再現性				
Mean \pm S.D.	2.84 \pm 0.06 (mg/mL)	0.38 \pm 0.01 (ng/mL)	0.21 \pm 0.00 (ng/mL)	0.12 \pm 0.01 (ng/mL)
C.V.(%)	2.05	3.71	1.85	9.64

図1-13 標準溶液および血漿抽出液の LC-APCI/MS/MS クロマトグラム

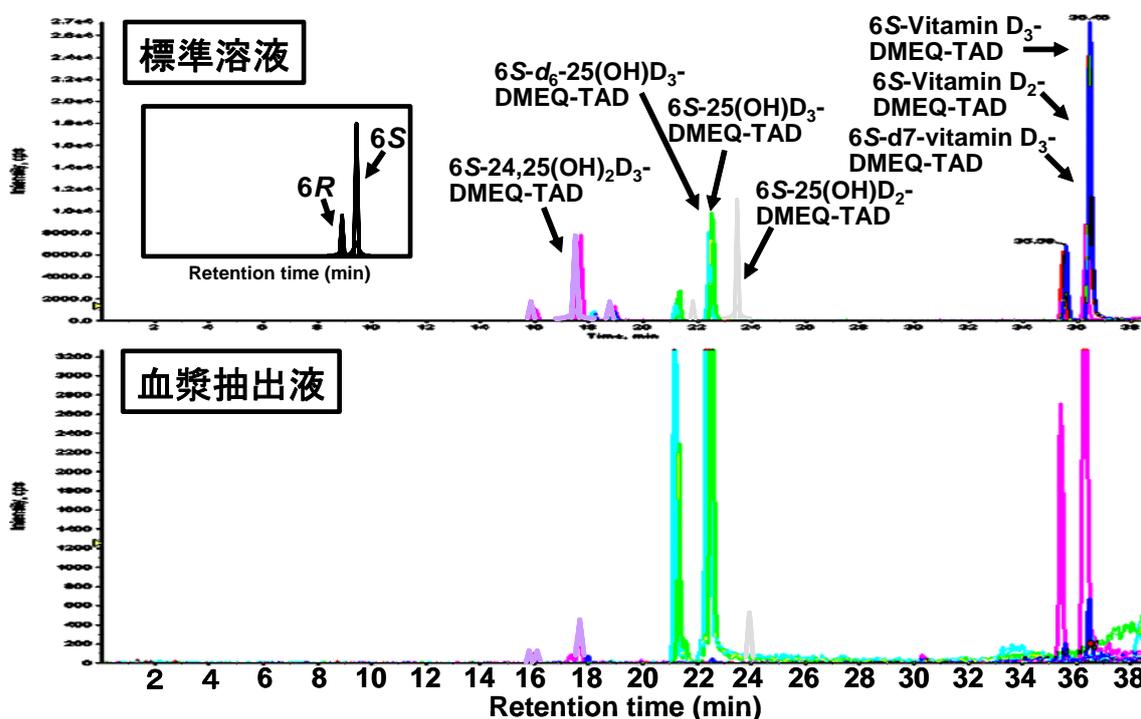


表 1-13 検出限界及びプール血漿を用いて算出した添加回収率、日内再現性、日差再現性

	D ₃	D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂	24,25(OH) ₂ D ₃
検出限界 (pg)	2	2	3	3	6
添加回収率					
Mean ± SD (%)	108.5 ± 2.5	108.7 ± 4.2	97.6 ± 2.2	92.5 ± 3.3	94.2 ± 6.0
C.V. (%)	2.3	3.9	2.2	3.6	6.4
日内再現性					
Mean ± SD (ng/mL)	0.729 ± 0.015	0.064 ± 0.005	21.48 ± 0.485	0.575 ± 0.018	1.311 ± 0.056
C.V. (%)	2.0	7.8	2.3	3.2	2.3
日差再現性					
Mean ± SD (ng/mL)	0.823 ± 0.051	0.066 ± 0.009	21.50 ± 1.41	0.580 ± 0.044	1.387 ± 0.099
C.V. (%)	6.2	13.7	6.5	7.6	7.1

表 1-14 プール母乳を用いて算出した添加回収率及び日内再現性

	D ₃	D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂
添加回収率				
Mean ± SD (%)	97.5 ± 3.8	105.0 ± 4.7	93.9 ± 3.0	90.9 ± 8.8
C.V. (%)	3.9	4.5	3.1	9.7
日内再現性				
Mean ± SD (ng/mL)	0.040 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.117 ± 0.005	0.006 ± 0.001
C.V. (%)	5.4	11.9	4.0	9.8

2. 日本人授乳婦を対象とした脂溶性ビタミンの栄養調査

表 2-1 各脂溶性ビタミンの母乳中濃度及び乳児の母乳からの推定摂取量

ビタミン名	化合物名	0-5 ヶ月		6-11 ヶ月	
		母乳中濃度 Mean ± SD	推定摂取量 Mean ± SD	母乳中濃度 Mean ± SD	推定摂取量 Mean ± SD
A	all- <i>trans</i> -retinol	0.47 ± 0.27 (µg/mL)	368 ± 210 (µg RE/day)	0.27 ± 0.12 (µg/mL)	211 ± 94 (µg RE/day)
	β-carotene	0.064 ± 0.063 (µg/mL)		0.043 ± 0.048 (µg/mL)	
D	D ₃	0.092 ± 0.131 (ng/mL)	0.46 ± 0.26 (µg/day)	0.034 ± 0.016 (ng/mL)	0.47 ± 0.21 (µg/day)
	D ₂	0.072 ± 0.156 (ng/mL)		0.181 ± 0.099 (ng/mL)	
	25(OH)D ₃	0.082 ± 0.037 (ng/mL)		0.073 ± 0.041 (ng/mL)	
	25(OH)D ₂	0.0032 ± 0.0023 (ng/mL)		0.0033 ± 0.0018 (ng/mL)	
E	α-tocopherol	5.2 ± 5.1 (µg/mL)	4.1 ± 4.0 (mg/day)	2.5 ± 1.0 (µg/mL)	1.9 ± 0.8 (mg/day)
K	PK	3.8 ± 2.2 (ng/mL)	5.2 ± 2.8 (µg/day)	3.4 ± 1.5 (ng/mL)	4.3 ± 1.8 (µg/day)
	MK-4	1.8 ± 0.7 (ng/mL)		1.5 ± 0.4 (ng/mL)	
	MK-7	1.6 ± 2.3 (ng/mL)		0.9 ± 0.9 (ng/mL)	

表 2-2 各脂溶性ビタミンの母乳中濃度と関連因子との関係¹

	母乳中濃度									
	all- <i>trans</i> -retinol		β-carotene		D ₃		D ₂		25(OH)D ₃	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
年齢	-0.177	0.121	-0.118	0.302	0.212	0.063	0.190	0.095	0.180	0.115
出産後日数	-0.351	0.002	-0.343	0.002	-0.050	0.666	-0.152	0.185	-0.105	0.360
BMI	0.137	0.265	-0.059	0.631	-0.102	0.407	-0.060	0.627	-0.022	0.856
母乳中脂質濃度	0.152	0.188	0.088	0.448	0.079	0.494	-0.087	0.452	0.473	<.001
血漿中濃度 ²	0.098	0.483	0.684	<.001	0.485	<.001	0.281	0.042	0.499	<.001
食事摂取量 ³	0.226	0.064	0.209	0.087	0.202	0.098	0.185	0.132	0.001	0.994

	母乳中濃度									
	25(OH)D ₂		α-tocopherol		PK		MK-4		MK-7	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
年齢	-0.226	0.047	-0.166	0.147	0.051	0.657	-0.032	0.783	-0.083	0.477
出産後日数	-0.102	0.374	-0.312	0.005	-0.262	0.021	-0.360	0.001	-0.101	0.378
BMI	0.006	0.960	0.072	0.561	-0.043	0.726	-0.011	0.929	-0.118	0.339
母乳中脂質濃度	0.202	0.078	0.276	0.015	0.549	<.001	0.510	<.001	0.080	0.492
血漿中濃度 ¹	0.297	0.031	0.090	0.524	0.159	0.256	-0.031	0.826	0.419	0.002
食事摂取量 ²	0.048	0.697	0.037	0.765	0.213	0.081	0.251	0.039	0.217	0.075

¹ 太字は有意(p<0.05)であることを示す。

² 母乳中濃度と同一化合物の血漿中濃度との関係を示す。

³ all-*trans*-retinol、β-carotene に対してはビタミン A 摂取量、D₃、D₂、25(OH)D₃、25(OH)D₂ に対してはビタミン D 摂取量、α-tocopherol に対してはビタミン E 摂取量、PK、MK-4、MK-7 に対してはビタミン K 摂取量との関係を示す。

表 2-3 母乳中および血漿中ビタミン D 濃度、ビタミン D 摂取量の季節間変動

		冬季 (n=27)	夏季 (n=18)	p ¹
		Mean ± SD	Mean ± SD	
母乳中濃度 (ng/mL)	D ₃	0.117 ± 0.031	0.077 ± 0.038	0.417
	D ₂	0.134 ± 0.036	0.013 ± 0.045	0.042
	25(OH)D ₃	0.062 ± 0.007	0.101 ± 0.008	0.001
	25(OH)D ₂	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.847
血漿中濃度 (ng/mL)	D ₃	0.267 ± 0.167	0.672 ± 0.160	0.093
	D ₂	0.026 ± 0.006	0.013 ± 0.006	0.180
	25(OH)D ₃	17.5 ± 1.9	18.9 ± 1.8	0.582
	25(OH)D ₂	0.56 ± 0.04	0.33 ± 0.03	<0.001
	24,25(OH) ₂ D ₃	0.93 ± 0.23	1.68 ± 0.22	0.025
食事摂取量 (μg/day)		8.7 ± 1.3	8.3 ± 1.3	0.835

¹ ANOVA により算出した。太字は有意(p<0.05)であることを示す。

3. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の評価

表 3-1 血中ビタミン K 濃度と骨代謝関連因子との関係

	K ₁		MK-4		MK-7	
	r	p	r	p	r	p
Age	-0.146	0.004	-0.006	0.916	-0.125	0.013
BMI	0.147	0.004	0.093	0.092	0.086	0.087
Cholesterol	0.122	0.016	-0.017	0.759	0.156	0.002
Triacylglycerol	0.342	<0.001	0.047	0.398	0.062	0.221
K ₁	—		—		—	
MK-4	0.153	0.005	—		—	
MK-7	0.173	0.001	0.009	0.875	—	
ucOC	-0.216	<0.001	0.020	0.720	-0.227	<0.001
ucOC/intactOC	-0.203	0.001	-0.005	0.927	-0.181	0.001
NTx	-0.071	0.189	-0.066	0.249	-0.015	0.781
DPD	-0.223	<0.001	-0.065	0.254	-0.091	0.101
BAP	0.013	0.815	0.001	0.988	0.004	0.937

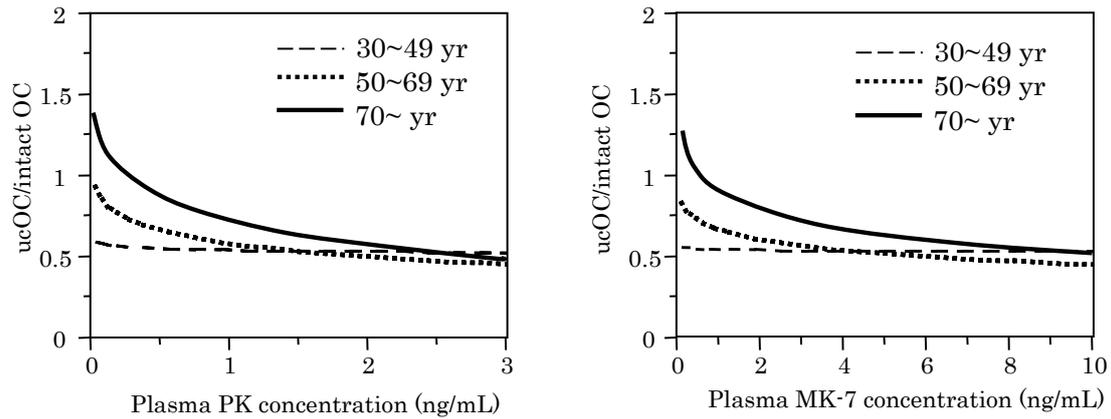
Pearson's correlation coefficient (*r*) and the corresponding *p* values were used to evaluate the relationship of the plasma vitamin K concentration with each parameter.

表 3-2 ステップワイズ重回帰分析による ucOC、ucOC/intactOC 比、尿中 DPD と年齢、PK、MK-7 との関係

	ucOC		ucOC/intactOC		DPD	
	r ²	<i>p</i>	r ²	<i>p</i>	r ²	<i>p</i>
Age	0.054	<0.001	0.030	0.008	0.095	<0.001
PK	0.047	0.001	0.041	0.002	0.050	<0.001
MK-7	0.052	<0.001	0.033	0.009	no relation	

Stepwise multiple linear regression analyses were performed to explore determinants of ucOC, ucOC/intactOC or DPD. Plausible predictors (age, BMI, cholesterol, triacylglycerol, PK, MK-4, MK-7) were included in the original model. Forward stepwise regression was performed, and a *p* value greater than 0.25 was used for variable removal.

図 3-1 年齢層別の血中 PK, MK-7 濃度と ucOC/intactOC 比の関係



Regression curves and *p* values were obtained from non-linear logarithmic regression analysis using the plasma PK or MK-7 concentration and ucOC/intact OC. Number of subjects were 30~49 yr (n=52), 50~69 yr (n=208) and 70~yr (n=136). The equations of regression curves using the plasma PK concentration and ucOC/intact OC were $y = 0.546 - 0.015 \log x$ ($p=0.8151$) for 30~49yr, $y = 0.589 - 0.117 \log x$ ($p=0.0020$) for 50~69 yr and $y = 0.748 - 0.224 \log x$ ($p=0.0101$) for 70~yr. Intercepts of three age groups were significantly different ($p<0.001$, ANCOVA). The equations of regression curves using the plasma MK-7 concentration and ucOC/intact OC were $y = 0.550 - 0.006 \log x$ ($p=0.8401$) for 30~49yr, $y = 0.677 - 0.094 \log x$ ($p<0.0001$) for 50~69 yr and $y = 0.870 - 0.172 \log x$ ($p=0.0005$) for 70~yr. Significant differences were detected in intercepts ($p<0.001$, ANCOVA) and slopes ($p<0.022$, ANCOVA) of three age groups.

表 3-3 対象者の背景

パラメーター	全対象者	学年別			ANOVA (学年間比較)
		中学1年 (12-13 y)	高校1年 (15-16 y)	高校3年 (17-18 y)	
< 男子 >					
Body height (cm)	165.3 ± 9.9***	153.8 ± 7.6	169.2 ± 5.9 ***	171.5 ± 5.4 ***	<0.001
Body weight (kg)	56.7 ± 12.0 ***	45.3 ± 9.0	59.2 ± 9.4 ***	64.7 ± 8.8 ***	<0.001
BMI (kg/m ²)	20.6 ± 3.0	19.0 ± 2.8	20.6 ± 2.7	22.0 ± 2.8 ***	<0.001
25OHD (ng/mL)	24.3 ± 7.3***	23.5 ± 6.2 *	24.5 ± 7.4 ***	24.8 ± 7.9 ***	0.179
PTH (pg/mL)	39.0 ± 17.1	44.7 ± 18.1	40.1 ± 17.8	32.6 ± 12.8	<0.001
Vitamin D intake (μg/d)	10.0 ± 2.7 **	9.9 ± 2.9	10.1 ± 2.5	9.9 ± 2.7	0.808
Ca intake (mg/d)	554 ± 289***	555 ± 282	562 ± 315 ***	553 ± 288 ***	0.945
< 女子 >					
Body height (cm)	156.9 ± 5.7	153.5 ± 5.4	158.2 ± 5.3	158.1 ± 5.3	<0.001
Body weight (kg)	50.6 ± 7.5	45.8 ± 7.0	52.2 ± 7.4	52.6 ± 6.3	<0.001
BMI (kg/m ²)	20.5 ± 2.5	19.4 ± 2.5	20.8 ± 2.7	21.0 ± 2.1	<0.001
25OHD (ng/mL)	21.1 ± 6.8	22.2 ± 6.0	21.2 ± 6.7	20.1 ± 7.4	0.005
PTH (pg/mL)	38.0 ± 15.4	43.4 ± 17.3	38.8 ± 14.9	32.1 ± 11.8	<0.001
Vitamin D intake (μg/d)	10.1 ± 2.5	10.2 ± 2.6	10.0 ± 2.4	10.1 ± 2.5	0.783
Ca intake (mg/d)	471 ± 199	507 ± 221	459 ± 187	454 ± 189	0.010

*<0.05, **<0.01, ***<0.001: 男女間比較 (Student's t-test)

表 3-4 ステップワイズ重回帰分析による血中 PTH 濃度に対する影響因子の解析

	Group	Significant variables	Estimate	r ²	p
〈男子〉	全対象者	25OHD	-0.468	0.042	<0.001
		Ca intake	-0.006	0.010	0.011
	中学1年(12-13 y)	25OHD	-0.633	0.058	0.003
		Ca intake	-0.013	0.016	0.033
高校1年 (15-16 y)	25OHD	-0.333	0.022	0.035	
高校3年 (17-18 y)	25OHD	-0.369	0.046	0.001	
〈女子〉	全対象者	Ca intake	-0.013	0.017	<0.001
		Ca intake	-0.016	0.025	0.010
	高校1年 (15-16 y)	Ca intake	-0.020	0.047	<0.001
	高校3年 (17-18 y)	25OHD	-0.247	0.024	0.020

予測因子(血中 25OHD濃度、Ca摂取量、ビタミンD摂取量)

表 3-5 男子学生におけるカットオフ値の評価

血中25OHD濃度 (ng/mL)	中学1年		高校1年		高校3年	
	血中PTH濃度 (pg/mL)	p	血中PTH濃度 (pg/mL)	p	血中PTH濃度 (pg/mL)	p
<15	56.6±21.2	0.019	50.6±26.3	0.011	31.4±12.3	0.696
≥15	44.0±17.7		39.3±16.9		32.7±12.9	
<20	49.1±20.8	0.027	44.0±21.1	0.028	36.1±16.8	0.010
≥20	32.8±16.5		38.5±16.1		31.1±10.5	
<25	46.6±19.8	0.061	41.7±19.0	0.103	35.0±14.7	0.003
≥25	41.6±14.3		38.0±16.0		29.8±9.80	

表 3-6 女子学生におけるカットオフ値の評価

血中25OHD濃度 (ng/mL)	中学1年		高校1年		高校3年	
	血中PTH濃度 (pg/mL)	p	血中PTH濃度 (pg/mL)	p	血中PTH濃度 (pg/mL)	p
<15	44.1±29.9	0.841	39.6±15.9	0.692	34.4±12.5	0.086
≥15	43.3±15.3		38.7±14.6		31.3±11.5	
<20	44.0±19.0	0.689	39.9±15.4	0.228	33.8±12.9	0.034
≥20	43.0±16.1		37.8±14.3		30.4±10.3	
<25	43.7±18.7	0.692	39.4±15.6	0.308	33.0±12.5	0.049
≥25	42.6±12.9		37.3±12.7		29.5±9.20	

表 3-7 血中 25(OH)D 濃度の分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
＜男子＞											
中学1年	23.5	6.2	5.4	12.7	16.2	19.2	23.0	27.4	31.4	37.8	42.5
高校1年	24.5	7.4	3.4	12.4	16.3	19.2	23.6	28.4	34.5	42.4	46.8
高校3年	24.8	7.9	8.2	11.4	15.1	18.9	24.2	30.4	35.7	40.9	50.1

＜女子＞											
中学1年	22.2	6.0	10.3	12.9	14.9	17.6	21.9	25.9	29.9	36.3	40.6
高校1年	21.2	6.7	7.2	10.5	13.3	16.1	20.1	25.6	30.6	36.8	40.0
高校3年	20.1	7.4	5.7	8.4	11.4	14.3	19.0	24.5	29.9	36.6	42.2

(ng/mL)

表 3-8 ビタミン D 摂取量の分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
＜男子＞											
中学1年	9.9	2.9	2.0	4.5	6.5	8.5	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0
高校1年	10.1	2.5	4.0	6.0	8.0	8.5	10.0	12.0	14.0	16.0	16.0
高校3年	9.9	2.7	4.0	4.2	6.5	8.5	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0

＜女子＞											
中学1年	10.1	2.6	4.0	6.0	6.5	8.5	10.0	12.0	12.5	16.0	20.0
高校1年	10.0	2.4	4.5	6.0	6.5	8.5	10.0	12.0	14.0	14.7	16.0
高校3年	10.1	2.5	4.0	4.5	6.5	8.5	10.0	12.0	14.0	16.0	20.0

(μ g/d)

表 3-9 対象者の背景

パラメータ	学年別			ANOVA (学年間比較)
	中学1年 (12-13 y)	高校1年 (15-16 y)	高校3年 (17-18 y)	
<男子>				
身長 (cm)	153.6 ± 7.69	169.3 ± 5.75 *	171.6 ± 5.34 *	<0.001
体重 (kg)	45.3 ± 9.29	59.2 ± 9.20 *	65.1 ± 9.22 *	<0.001
BMI (kg/m ²)	19.1 ± 2.87	20.6 ± 2.65	22.1 ± 2.95 *	<0.001
血中PK濃度 (ng/mL)	0.45 ± 0.29 *	0.76 ± 0.54	1.15 ± 1.00 *	<0.001
血中MK-4濃度 (ng/mL)	0.07 ± 0.05	0.07 ± 0.06 *	0.11 ± 0.13	<0.001
血中MK-7濃度 (ng/mL)	3.04 ± 5.96	6.23 ± 17.10	6.48 ± 10.99	0.017
血中Total K濃度 (ng/mL)	2.93 ± 4.62 *	7.83 ± 18.70	7.49 ± 11.06	0.005
ビタミンK摂取量 (μg/day)	212.5 ± 122.2	222.7 ± 180.3	196.6 ± 129.2	0.226
血中ucOC濃度 (ng/mL)	40.4 ± 22.43 *	19.7 ± 13.46 *	12.2 ± 7.02 *	<0.001
<女子>				
身長 (cm)	153.6 ± 5.48	158.2 ± 5.33	157.9 ± 5.24	<0.001
体重 (kg)	45.9 ± 6.98	52.2 ± 7.17	52.2 ± 6.30	<0.001
BMI (kg/m ²)	19.4 ± 2.48	20.9 ± 2.68	20.9 ± 2.07	<0.001
血中PK濃度 (ng/mL)	0.57 ± 0.42	0.84 ± 0.68	0.94 ± 0.66	<0.001
血中MK-4濃度 (ng/mL)	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.05	0.08 ± 0.11	<0.001
血中MK-7濃度 (ng/mL)	3.78 ± 6.62	5.01 ± 13.89	8.25 ± 19.35	0.006
血中Total K濃度 (ng/mL)	4.68 ± 7.37	7.48 ± 16.81	10.8 ± 21.07	0.011
ビタミンK摂取量 (μg/day)	228.5 ± 145.0	193.9 ± 135.4	209.7 ± 128.5	0.036
血中ucOC濃度 (ng/mL)	27.5 ± 17.03	9.51 ± 5.45	6.54 ± 3.49	<0.001

(平均±標準偏差) * p<0.05 男子vs 女子(Student's t-test)

表 3-10 血中ビタミン K 濃度と ucOC 濃度の相関関係

パラメーター	血中ucOC濃度 (ng/mL)					
	全対象者		男子		女子	
	r	p	r	p	r	p
血中PK濃度 (ng/mL)	-0.260	<0.001	-0.297	<0.001	-0.220	<0.001
血中MK-4濃度 (ng/mL)	-0.061	0.072	-0.110	0.021	-0.068	0.156
血中MK-7濃度 (ng/mL)	-0.233	<0.001	-0.273	<0.001	-0.218	<0.001
血中Total K濃度 (ng/mL)	-0.310	<0.001	-0.333	<0.001	-0.282	<0.001
ビタミンK摂取量 (μ g/day)	-0.079	0.007	-0.104	0.015	-0.061	0.124

血中PK, MK-7, Total K濃度はLog変換

表 3-11 血中 PK 濃度を用いたカットオフ値の評価

血中PK濃度 (ng/mL)	中学1年		高校1年		高校3年	
	血中 ucOC 濃度 (ng/mL)	p	血中 ucOC 濃度 (ng/mL)	p	血中 ucOC 濃度 (ng/mL)	p
<男子>						
<0.3	45.3±23.2	0.045	18.4±9.7	0.547	12.0±6.7	0.911
≥0.3	37.9±21.7		20.0±14.1		12.3±7.1	
<0.6	41.8±22.6	0.129	19.5±11.8	0.834	12.5±7.2	0.788
≥0.6	35.4±21.4		19.9±14.8		12.2±7.0	
<0.9	41.6±22.7	0.014	20.2±13.9	0.428	12.4±7.4	0.785
≥0.9	25.2±11.1		18.5±12.4		12.1±6.7	
<1.2	40.9±22.6	0.172	19.4±13.3	0.347	12.0±6.9	0.595
≥1.2	28.1±13.6		21.0±14.2		12.6±7.4	
<女子>						
<0.3	32.0±21.8	0.033	9.7±5.9	0.815	6.8±2.9	0.706
≥0.3	25.9±14.6		9.5±5.4		6.5±3.5	
<0.6	29.4±18.5	0.042	8.9±4.5	0.116	7.3±3.6	0.013
≥0.6	23.9±13.0		10.0±6.1		6.1±3.4	
<0.9	27.8±17.4	0.592	9.0±4.5	0.021	7.0±3.2	0.029
≥0.9	25.9±15.0		10.7±6.9		5.9±3.8	
<1.2	27.2±17.1	0.464	9.3±5.1	0.178	6.6±3.3	0.637
≥1.2	30.6±16.0		10.4±6.5		6.3±4.0	

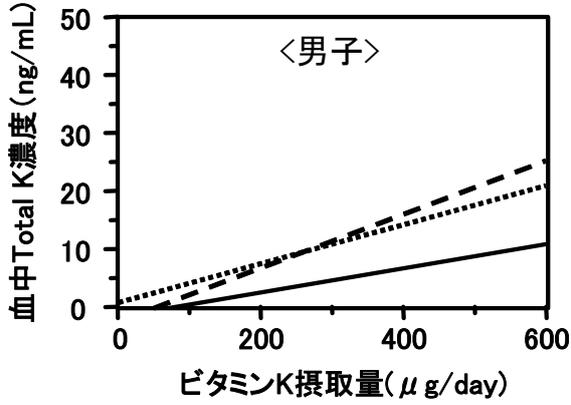
表 3-12 血中 MK-7 濃度を用いたカットオフ値の評価

血中MK-7濃度 (ng/mL)	中学1年		高校1年		高校3年	
	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p
<男子>						
<0.5	45.6±23.1		20.5±13.4	0.626	13.4±8.1	0.381
≥0.5	37.4±21.5	0.022	19.4±13.5		12.1±6.8	
<1.0	45.2±23.1		22.0±16.0	0.017	13.8±7.9	0.023
≥1.0	33.4±19.5	0.001	17.4±10.1		11.4±6.4	
<2.0	43.9±23.4		21.0±15.2	0.080	13.5±7.9	0.011
≥2.0	30.9±16.3	0.001	17.6±9.8		10.9±5.7	
<4.0	43.1±22.9		20.7±14.3	0.070	13.2±7.5	0.006
≥4.0	29.2±16.3	0.002	16.7±10.2		10.2±5.3	
<女子>						
<0.5	29.9±20.1	0.177	9.9±6.0	0.515	5.8±2.8	0.204
≥0.5	26.3±15.1		9.4±5.3		6.7±3.6	
<1.0	29.9±18.4		9.9±5.3	0.258	7.0±3.7	0.099
≥1.0	24.0±14.2	0.024	9.1±5.6		6.2±3.3	
<2.0	29.6±17.9		10.1±5.4	0.016	7.1±3.5	0.006
≥2.0	23.2±14.2	0.020	8.3±5.4		5.8±3.3	
<4.0	29.1±18.0		9.8±5.7	0.052	7.0±3.4	0.009
≥4.0	23.0±13.1	0.034	8.1±4.0		5.6±3.4	

表 3-13 血中 Total ビタミン K 濃度を用いたカットオフ値の評価

血中Total K濃度 (ng/mL)	中学1年		高校1年		高校3年	
	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p	血中ucOC濃度 (ng/mL)	p
<男子>						
<1.0	50.9±24.5		22.8±16.0	0.357	12.6±8.5	0.966
≥1.0	38.0±22.1	0.004	19.8±13.9		12.5±7.1	
<2.0	48.3±24.6		22.4±16.9	0.077	14.2±8.4	0.039
≥2.0	31.0±17.0	<0.001	18.4±11.0		11.7±6.4	
<4.0	45.8±24.5		21.6±15.7	0.085	13.8±8.1	0.011
≥4.0	30.2±15.7	0.005	17.6±10.3		11.0±5.6	
<6.0	44.5±24.0		21.0±14.8	0.239	13.4±7.7	0.017
≥6.0	30.4±19.0	0.037	17.8±11.6		10.5±5.4	
<女子>						
<1.0	34.9±22.5		9.0±3.9	0.527	7.2±1.7	0.728
≥1.0	26.1±15.0	0.013	10.1±5.7		6.6±3.5	
<2.0	31.1±20.1	0.252	10.2±4.8	0.710	7.4±3.3	0.027
≥2.0	27.0±16.1		9.9±6.0		6.2±3.4	
<4.0	31.4±19.8	0.065	10.6±6.1	0.049	7.2±3.3	0.007
≥4.0	24.2±14.1		8.6±4.1		5.8±3.5	
<6.0	30.6±19.6	0.251	10.5±5.9	0.029	7.1±3.2	0.026
≥6.0	25.8±14.6		7.9±3.5		5.8±3.6	

図 3-2 ビタミン K 摂取量と血中 Total ビタミン K 濃度の関係

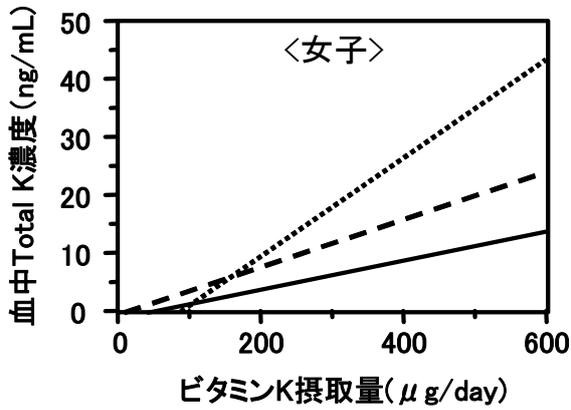


—— 中学1年男子
 $Y = 0.02X - 1.43$
 $r=0.564, n=117, p<0.001$

--- 高校1年男子
 $Y = 0.05X - 2.29$
 $r=0.448, n=160, p<0.001$

..... 高校3年男子
 $Y = 0.03X + 0.98$
 $r=0.385, n=183, p<0.001$

ANCOVA
 Slope $p=0.040$
 Intercept $p=0.102$



—— 中学1年女子
 $Y = 0.02X - 0.98$
 $r=0.510, n=116, p<0.001$

--- 高校1年女子
 $Y = 0.04X - 0.37$
 $r=0.308, n=153, p<0.001$

..... 高校3年女子
 $Y = 0.08X - 7.21$
 $r=0.519, n=166, p<0.001$

ANCOVA
 Slope $p<0.001$
 Intercept $p=0.035$

表 3-14 血中 Total ビタミン K 濃度を 1, 2, 4, 6 ng/mL に到達させるための
推定ビタミン K 摂取量

	到達血中濃度 (ng/mL)			
	1	2	4	6
<男子>				
中学1年生	122	172	222	272
高校1年生	66	86	106	126
高校3年生	1	34	67	101
<女子>				
中学1年生	99	149	199	249
高校1年生	34	59	84	109
高校3年生	103	115	128	140

推定VK摂取量(μg/day)

日本人の食事摂取基準(2005年版): ビタミン K 目安量

男性	(12~14歳)	70 μg/day
	(15~17歳)	80 μg/day
女性	(12~14歳)	65 μg/day
	(15~17歳)	60 μg/day

表 3-15 血中 PK 濃度分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル値								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
<男子>											
中学1年	0.45	0.29	0.05	0.06	0.17	0.26	0.39	0.55	0.86	1.26	1.73
高校1年	0.76	0.54	0.05	0.09	0.24	0.38	0.62	1.01	1.47	2.05	3.38
高校3年	1.15	1.00	0.08	0.17	0.35	0.56	0.92	1.33	2.34	3.91	8.56
<女子>											
中学1年	0.57	0.42	0.06	0.10	0.17	0.28	0.45	0.72	1.15	1.85	2.36
高校1年	0.84	0.68	0.08	0.17	0.28	0.39	0.63	1.08	1.69	2.60	5.05
高校3年	0.94	0.66	0.19	0.24	0.32	0.48	0.77	1.21	1.71	2.62	5.16

(ng/mL)

表 3-16 血中 MK-7 濃度分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル値								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
＜男子＞											
中学1年	3.04	5.96	0.13	0.20	0.32	0.42	0.61	2.57	7.77	27.3	38.0
高校1年	6.23	17.1	0.21	0.26	0.34	0.51	1.05	4.07	11.5	47.6	138
高校3年	6.48	11.0	0.02	0.24	0.36	0.68	1.78	6.12	19.7	46.2	58.2

＜女子＞											
中学1年	3.78	6.62	0.04	0.09	0.22	0.41	0.59	4.38	12.6	25.4	36.0
高校1年	5.01	13.9	0.24	0.28	0.37	0.56	1.08	2.64	10.2	50.0	152
高校3年	8.25	19.4	0.10	0.22	0.42	0.67	1.42	6.21	21.4	67.9	172

(ng/mL)

表 3-17 血中 Total ビタミン K 濃度分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル値								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
＜男子＞											
中学1年	2.93	4.62	0.44	0.52	0.65	0.83	1.21	2.67	6.46	17.8	29.4
高校1年	7.83	18.7	0.47	0.59	0.86	1.24	2.21	5.38	13.9	57.1	141
高校3年	7.49	11.1	0.38	0.72	1.15	1.62	3.59	6.97	19.2	49.3	61.0

＜女子＞											
中学1年	4.68	7.37	0.21	0.46	0.59	0.79	1.43	5.16	14.6	33.5	37.2
高校1年	7.48	16.8	0.52	0.66	1.18	1.51	2.58	4.59	16.2	56.0	153
高校3年	10.8	21.1	0.69	0.90	1.27	1.71	3.33	9.89	28.6	69.5	174

(ng/mL)

表 3-18 ビタミン K 摂取量分布

	平均	標準 偏差	パーセンタイル値								
			0 (最小値)	2.5	10	25	50 (中央値)	75	90	97.5	100 (最大値)
＜男子＞											
中学1年	213	122	14	28	56	123	198	268	408	521	568
高校1年	223	180	0	0	56	126	198	268	397	568	1754
高校3年	197	129	0	0	56	100	184	268	362	537	652

＜女子＞											
中学1年	229	145	0	28	84	140	205	268	418	582	926
高校1年	194	135	0	0	56	112	170	226	404	534	1024
高校3年	210	128	0	20	70	126	184	246	380	554	624

(μ g/day)

4. ビタミン摂取量が血液中と尿中のビタミン含量に及ぼす影響

～生活習慣一次予防のための生体飽和量を求める研究～(脂溶性ビタミン)

表 4-1 ビタミン剤摂取スケジュール

	食事	ビタミン摂取	尿	採血	
1週目	第1日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事		第2回目～翌日第1回目 採取	
	第2日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事			
	第3日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事			
	第4日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事		第2回目～翌日第1回目 採取	
	第5日(自宅)	採血後、自由食	ビタミン剤①		有
	第6日(自宅)	自由食	ビタミン剤①		
	第7日(ホテル)	自由食	ビタミン剤①		
2週目	第1日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤①	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第2日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤①		
	第3日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤①		
	第4日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤①	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第5日(自宅)	採血後、自由食	ビタミン剤②		有
	第6日(自宅)	自由食	ビタミン剤②		
	第7日(ホテル)	自由食	ビタミン剤②		
3週目	第1日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤②	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第2日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤②		
	第3日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤②		
	第4日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤②	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第5日(自宅)	採血後、自由食	ビタミン剤③		有
	第6日(自宅)	自由食	ビタミン剤③		
	第7日(ホテル)	自由食	ビタミン剤③		
4週目	第1日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤③	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第2日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤③		
	第3日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤③		
	第4日(ホテル)	朝、昼、夕、夜は所定の食事	ビタミン剤③	第2回目～翌日第1回目 採取	
	第5日(自宅)				有

[生活リズム]
起床6:30
朝食7:40～8:00
昼食12:30～13:00
夕食18:20～18:50
夜食21:30
就寝23:30
※ビタミン摂取は朝、昼、夕食後

表 4-2 ビタミン剤中の脂溶性ビタミン含量

	レチニルアセテート (REとして)	α-トコフェロール	コレカルシフェロール	フィロキノ
ビタミン剤①	0.45	9	0.005	0.075
ビタミン剤②	1.35	27	0.018	0.27
ビタミン剤③	2.7	54	0.036	0.54
食事摂取基準 推奨量	0.75	—	—	—
目安量	—	9	0.005	0.075
上限量	3	800	0.05	—

単位:mg

表 4-3 血中脂溶性ビタミン濃度と生体栄養指標の変化

	1週目 (摂取前)	2週目 (①摂取後)	3週目 (②摂取後)	4週目 (③摂取後)	ANOVA (p値)
N	11	11	10	10	
Retinol (mg/L)	0.542 ± 0.115	0.572 ± 0.118	0.554 ± 0.13	0.574 ± 0.154	0.932
α-tocopherol (mg/L)	9.6 ± 2.7	10.5 ± 2.3 *	11.9 ± 2.4 ***	13.1 ± 3.1 ***	0.025
β-tocopherol (mg/L)	0.16 ± 0.0	0.15 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.13 ± 0.0 *	0.176
γ-tocopherol (mg/L)	0.75 ± 0.3	0.62 ± 0.2 ***	0.37 ± 0.1 ***	0.26 ± 0.1 ***	<0.001
δ-tocopherol (mg/L)	0.05 ± 0.0	0.05 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.136
PK (ng/mL)	1.36 ± 0.5	1.30 ± 0.6	1.43 ± 0.6	1.56 ± 0.6	0.747
MK-4 (ng/mL)	0.02 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.281
MK-7 (ng/mL)	2.5 ± 2.7	2.4 ± 3.0	3.0 ± 3.6	2.0 ± 2.5	0.896
ucOC (ng/mL)	6.2 ± 1.5	6.0 ± 1.4	5.78 ± 1.6	5.8 ± 1.6	0.926
25(OH)D ₃ (ng/mL)	19.9 ± 4.4	23.7 ± 3.8	26.9 ± 5.3 **	28.5 ± 4.8***	<0.001
25(OH)D & 24,25(OH) ₂ D ₃ (ng/mL)	22.5 ± 5.2	25.6 ± 4.4	28.6 ± 5.9 *	30.3 ± 5.5 **	0.009
PTH (pg/mL)	29.2 ± 10.7	27.8 ± 8.2	31.4 ± 8.0	28.9 ± 8.6	0.833

*p<0.05, 対応のある検定 (Control=1週目)
 ** p<0.01, 対応のある検定 (Control=1週目)
 ***p<0.001, 対応のある検定 (Control=1週目)

図 4-1 1週目の血中濃度を基準とした血中レチノール濃度の変化率

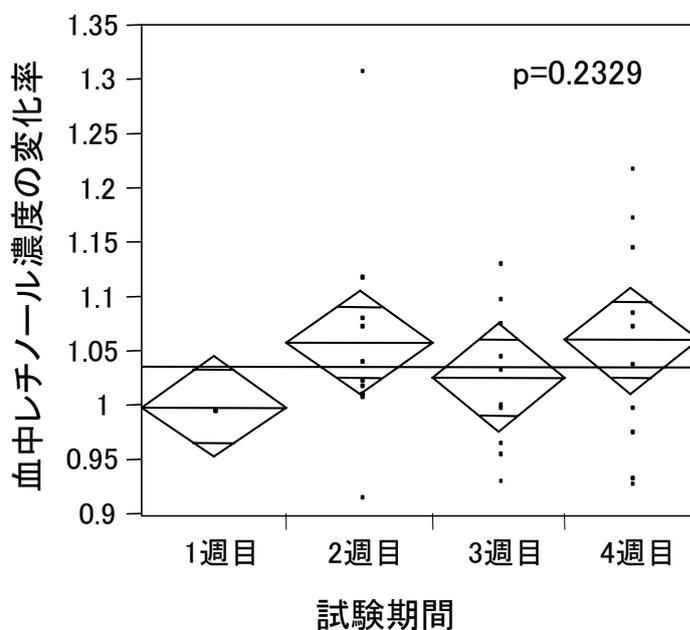


図 4-2 個人別血中レチノール濃度の変化

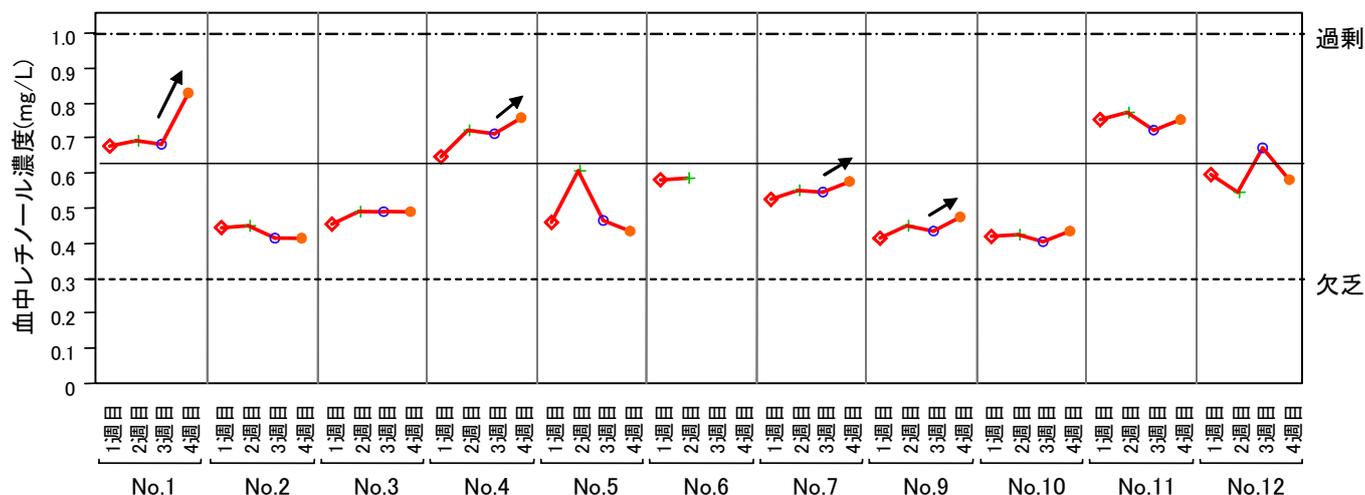


図 4-3 1週目の血中濃度を基準とした血中ビタミンE同属体濃度の変化率

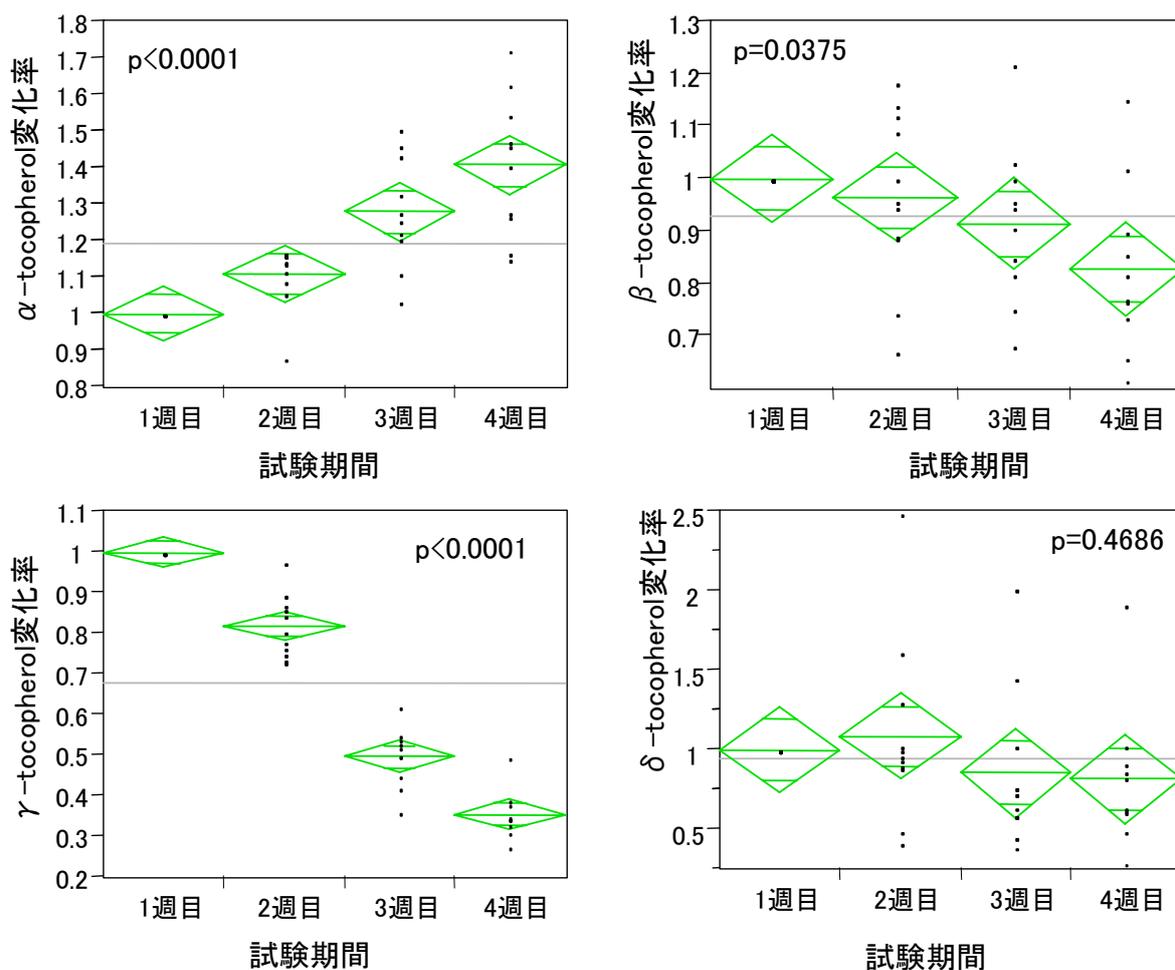


図 4-4 個人別血中ビタミン E 同属体濃度の変化

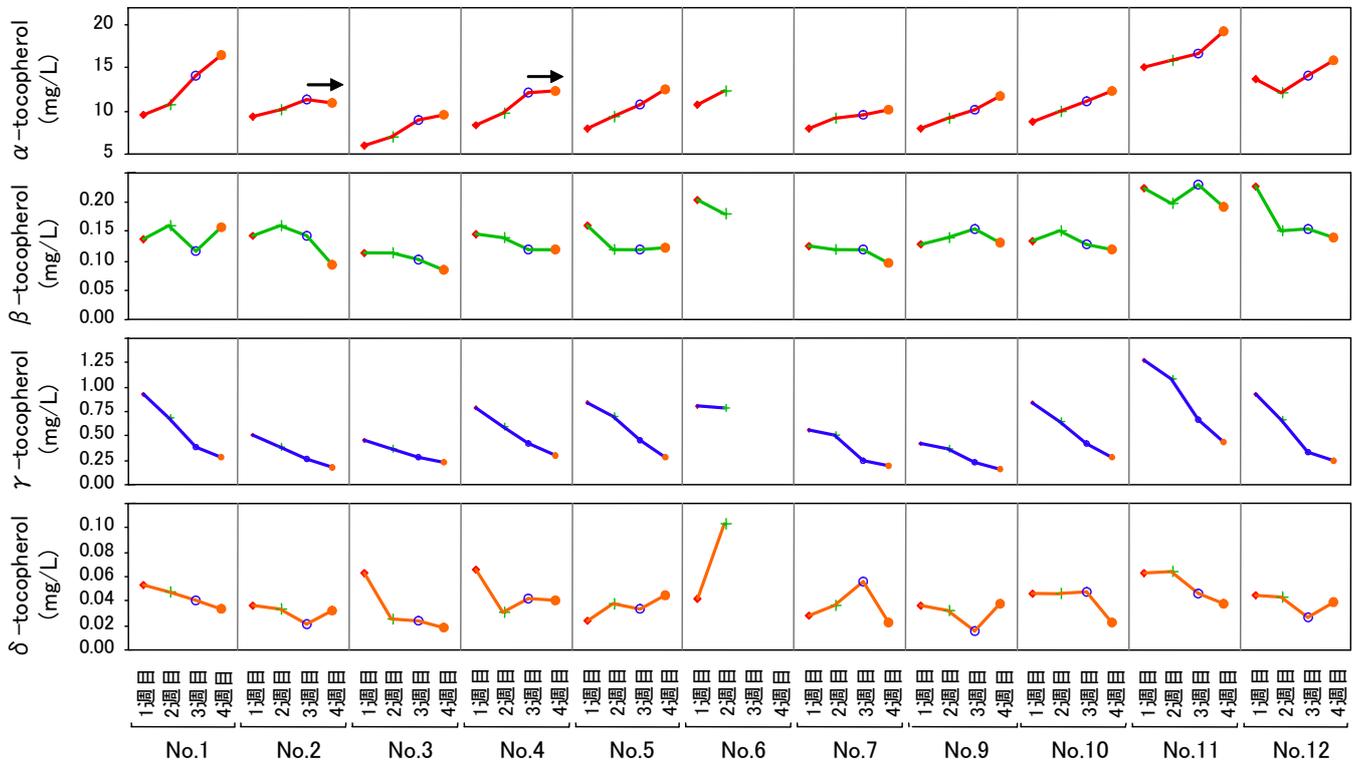


図 4-5 血中 α -トコフェロール濃度と BMI の関係

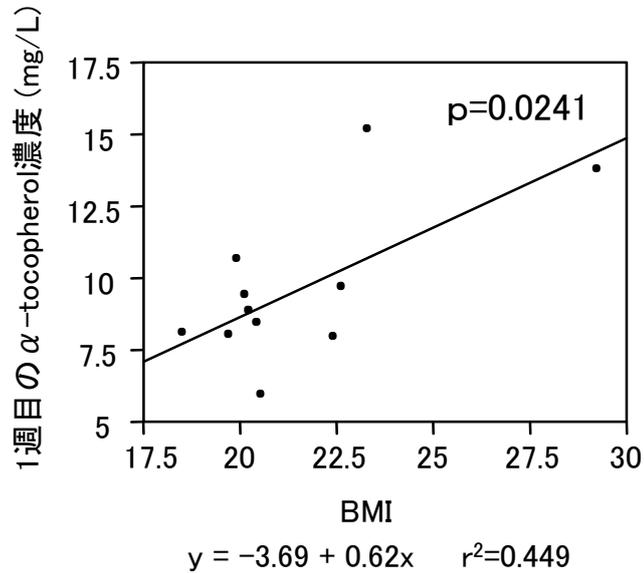


図 4-6 血中 α -トコフェロール濃度と血中レチノール濃度の関係

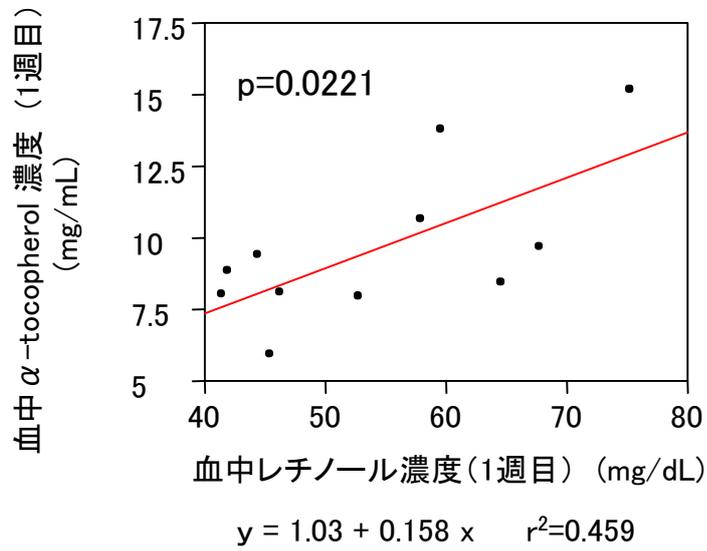


図 4-7 血中レチノール濃度とBMIの関係

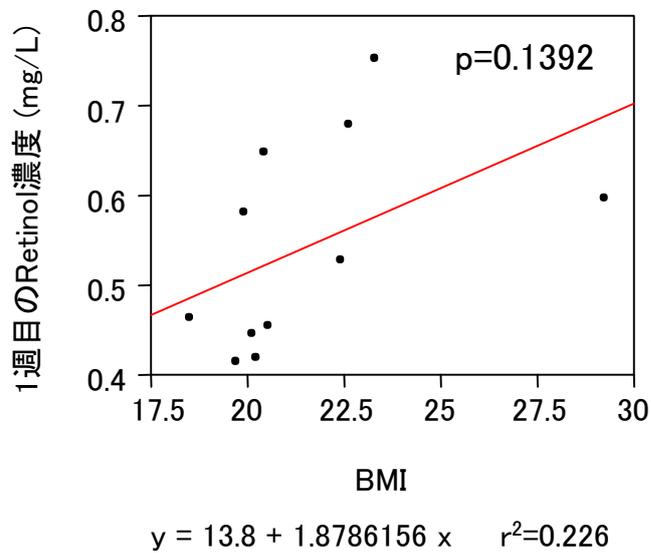
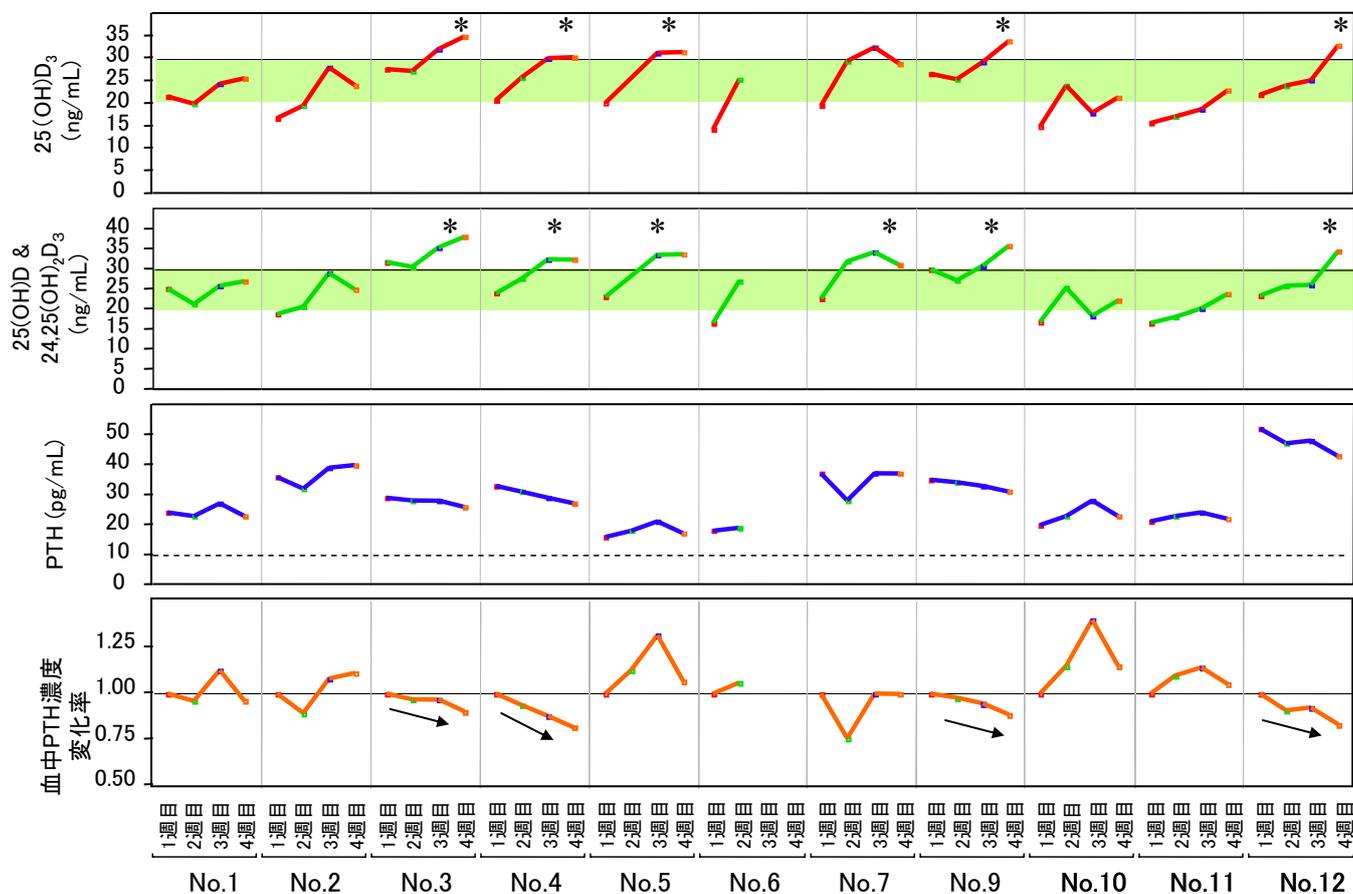


図 4-8 個人別血中 25(OH)D₃、25(OH)D & 24,25(OH)₂D₃ 濃度および PTH 濃度の変化



* 4週目の血中25(OH)D₃あるいは25(OH)D & 24,25(OH)₂D₃合算値が30 ng/mLを超えた対象者

図 4-9 個人別血中 PK および ucOC 濃度の変化

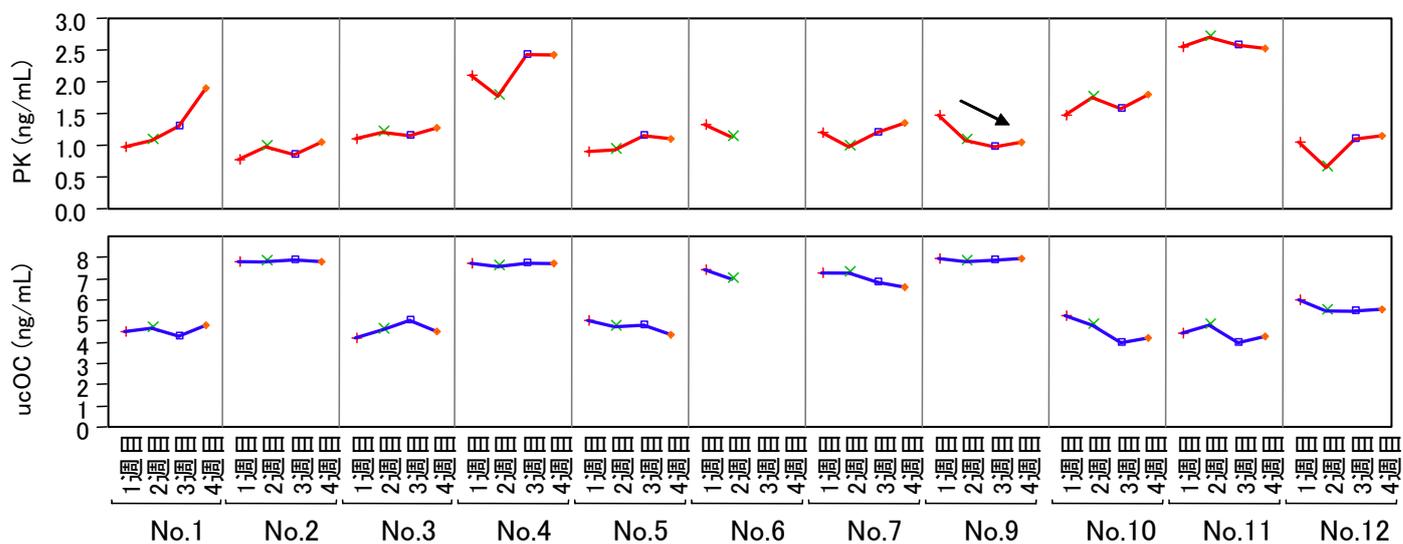


図 4-10 1 週目の血中濃度を基準とした血中 PK 濃度の変化率

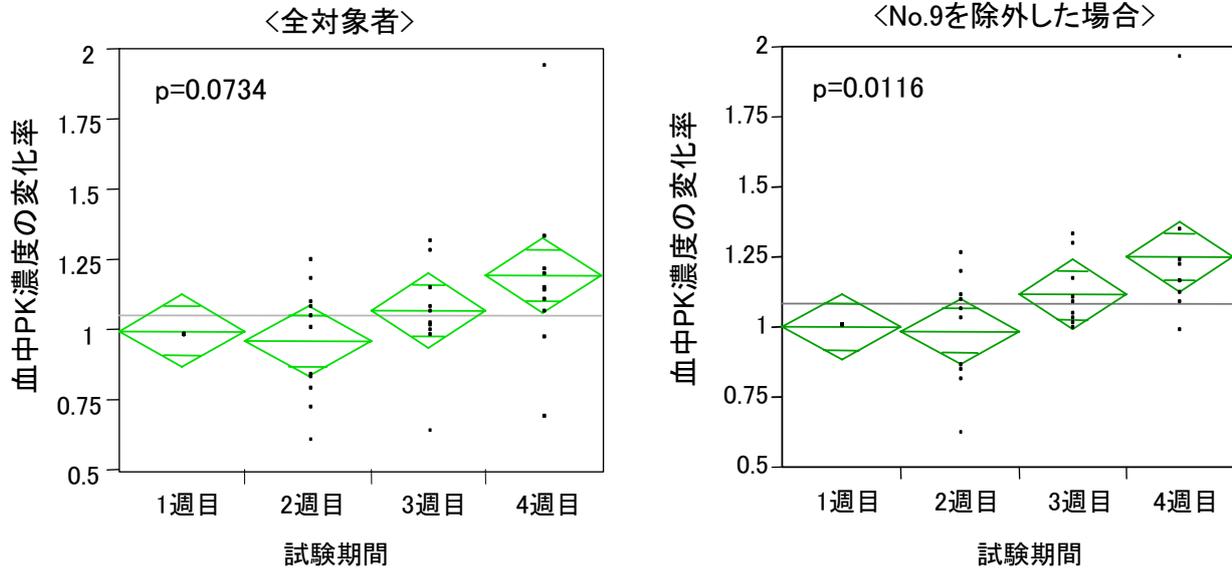


図 4-11 1 週目の血中濃度を基準とした血中 ucOC 濃度の変化率

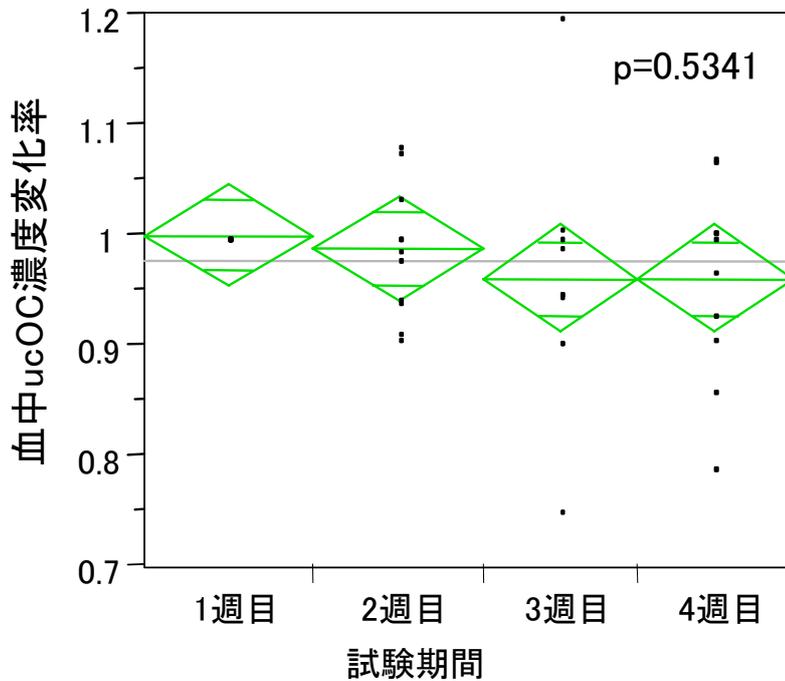


図 4-12 血中ビタミン K 濃度と ucOC 濃度の関係

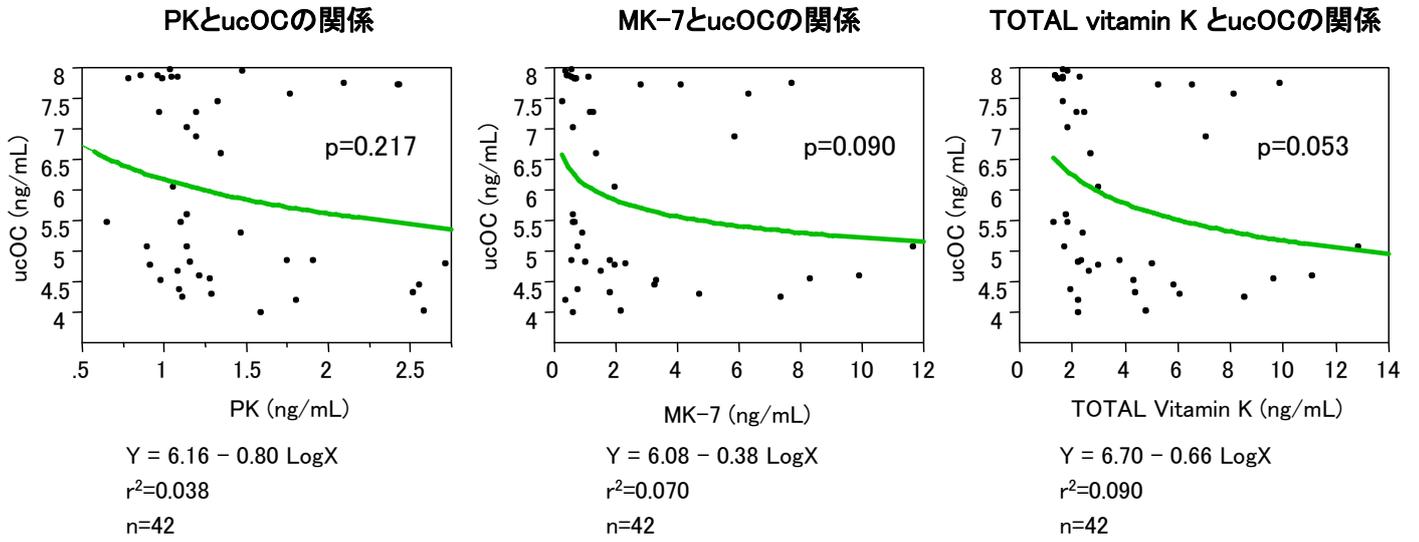


図 4-13 個人別血中 Total ビタミン K 濃度および ucOC 濃度の変化

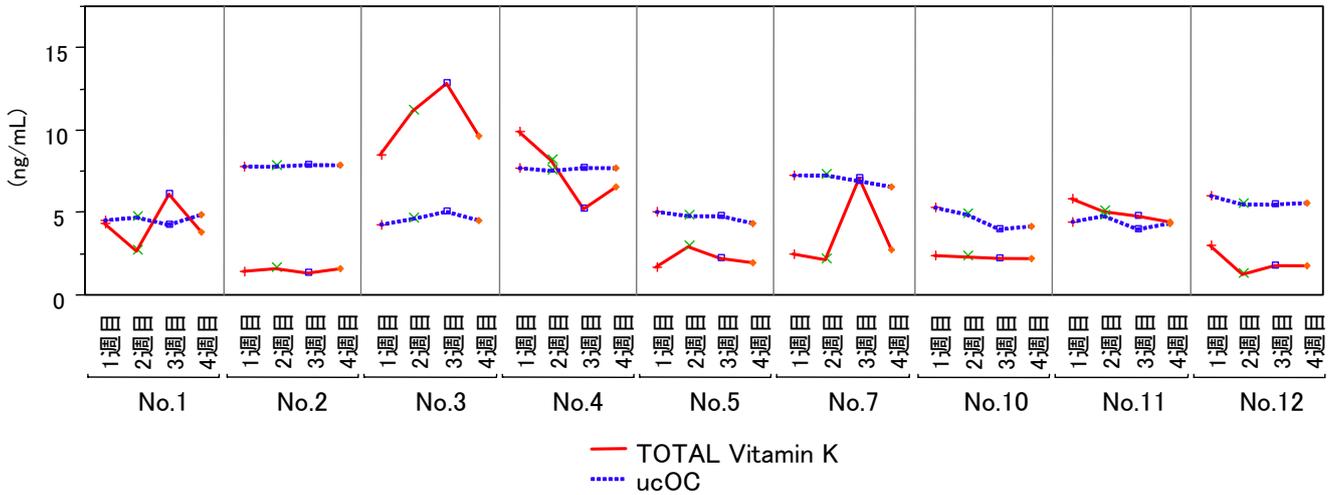
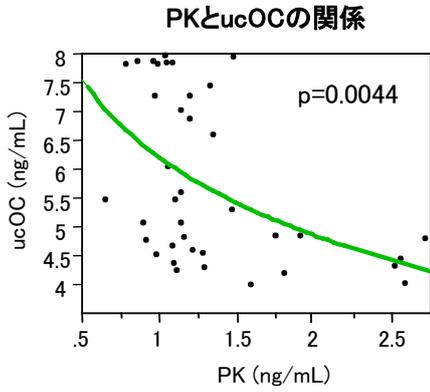
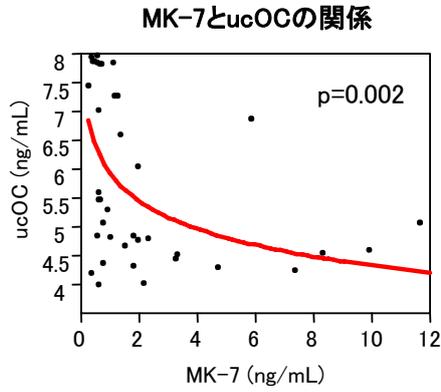


図 4-14 血中ビタミン K 濃度と ucOC 濃度の関係(一部除外)

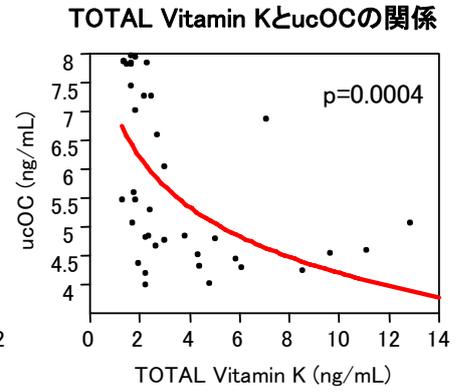
<No.4 を除外>



$$Y = 6.2 - 1.9 \text{ Log}X$$
$$r^2=0.204$$
$$n=38$$



$$Y = 5.93 - 0.69 \text{ Log}X$$
$$r^2=0.235$$
$$n=38$$



$$Y = 7.07 - 1.25 \text{ Log}X$$
$$r^2=0.302$$
$$n=38$$