

平成 17 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）

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

Ⅲ. 分担研究者の報告書

1. 日本人の食事摂取基準の策定を目的とした新規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 神戸薬科大学衛生化学研究室 教授

研究協力者 須原義智，鎌尾まや，津川尚子 神戸薬科大学衛生化学研究室

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脂溶性ビタミン濃度の微量定量法を開発した。今年度は、昨年度に確立した LC-APCI/MS/MS による血中ビタミン K 及び 25-ヒドロキシビタミン D 濃度の測定法を発展させ、血中、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 (VK) の必要量を評価した。血中 VK 濃度と骨代謝における VK 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 VK 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 VK 要求性が加齢的に高まることを示唆する結果を得た。

1. 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

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。

【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.5mL 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 *d*₆-*all-trans*-retinol エタノール溶液¹⁾ 25μL 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⁾ 25μL、蒸留水 0.5mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 3.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。有機層 2.5mL 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 200μL に溶解し、50μL 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

0-10min (A) 100 %

10-40min (B) 0→90 % のグラジエント

40-100 min (A) : (B) = 10 : 90

流速：1.0mL/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)

*d*₆-*all-trans*-retinol (*m/z* : 275.2/192.4)

*d*₆-β-carotene (*m/z* : 543.6/180.1)

*d*₇-vitamin D₃ (*m/z* : 392.4/266.5)

*d*₆-25(OH)D₃ (*m/z* : 389.4/229.1)

*d*₆-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 (500ng/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。

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

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

S : 内部標準物質の添加量 (25ng)

V : 血漿 (血清) 量 (0.5mL)

1) *d*₆-*all-trans*-retinol (図 1) 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、325nm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 ($\mu\text{g/mL}$)

$$= A_{325\text{ nm}} \times 549/100$$

2) 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 D₃、 d_6 -25(OH)D₃、 d_6 - α -tocopherol、¹⁸O-PK、¹⁸O-MK-4 及び ¹⁸O-MK-7 (図1) 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。

【定量精度の確認】

図2に示すように、標準物質混合溶液ならびに血漿差試料において、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 3125ng 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)。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 250ng、 β -carotene 150ng、vitamin D₃ 2ng、25(OH)D₃ 10ng、 α -tocopherol 6.5 μg 、PK 0.75ng、MK-4 1ng、MK-7 4ng を添加して添加回収率を求めたところ、表1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2)。プ

ール血漿の vitamin D₃ 測定値の日差変動が大きくなった理由として、血漿中 vitamin 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3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. 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

前述の LC-APCI/MS/MS 法による血漿中脂溶性ビタミン濃度定量法を、母乳中脂溶性ビタミンの定量に応用した。

【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) ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの抽出(アルカリけん化法)

母乳 20.0mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として d_6 -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 12mL、7%ピロガロール・エタノール溶液 (w/v) 40mL、60%水酸化カリウム溶液 20mL 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 76mL、ヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）60mL 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）60mL 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）3mL 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 3.0mL 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、0.1M リン酸緩衝液（pH 7.7）12mL、リパーゼ（ブタすい臓製、ナカライテスク社製）0.3g を加え、混合した後、37 $^{\circ}$ C で 90 分間攪拌した。エタノール 12mL を加えた後、超音波処理をおこない、ヘキサン 12mL を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 10mL を褐色ナス型フラスコに移した。残った水層にヘキサン 12mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 12mL 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 3mL に溶解し、あらかじめヘキサン 10mL 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）5.0mL 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 20.0mL に all-*trans*-retinol 20 μ g、 β -carotene 0.6 μ g、vitamin D₃ 20ng、25(OH)D₃ 20ng、 α -tocopherol 30 μ g、PK 30ng、MK-4 20ng、MK-7 10ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 4 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. 日本人母乳試料中脂溶性ビタミン濃度

現在までに得られた母乳試料について、脂溶性ビタミン濃度を測定した。

【試料背景及び推定摂取量の計算】

母乳試料の背景（n=17）は以下のとおりである。

授乳婦年齢 : 29.7 \pm 5.0 才

母乳採取時期 : 出産後 2.2 \pm 1.5 ヶ月

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 \times 平均哺乳量
(780mL)

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 μ g all-*trans*-retinol 12 μ g β -carotene

ビタミン D 推定摂取量は 25(OH)D₃ 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=
vitamin D₃ 推定摂取量+5×25(OH)D₃ 推定摂取量

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 推定摂取量+MK-4 推定摂取量+
MK-7 推定摂取量×444.7/649
444.7 : MK-4 の分子量
649 : MK-7 の分子量

【結果】

出産後 0～5 ヶ月の授乳婦より提供された母乳中脂溶性ビタミン濃度及び推定摂取量を表 5 に示す。母乳中脂溶性ビタミン濃度より算出した推定摂取量は、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) をやや上回っていたが、ビタミン D については約 40% 程度と低かった。現在のところ、試料数が少なく、さらなる検討が必要であるが、実際の母乳の摂取では現行の基準値を満たすことが困難である可能性が示唆された。また、採血の協力が得られた対象者について血漿中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の相関を調べた結果、ビタミン D において有意な相関が認められた (図 6)。

今後、例数を増やして同様の検討を行うとともに、授乳婦の食事調査を実施し、脂溶性ビタミン摂取量と母乳中あるいは血漿中濃度の関係についても調べる予定である。

4. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の評価-骨に対するビタミン K の必要量の評価^{a)}

【目的】

ビタミン K (以下、VK) 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、VK はオステオカルシンやマトリックスグラ蛋白あるいはプロテイン S のような VK 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 VK 欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低 VK 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 VK 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 VK 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 VK 不足のマーカーには PIVKII (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対する VK 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 VK 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、VK、VK 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、BMI、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 6)。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 7)。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 4 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: 1.18ng/mL,

ucOC: 3.73ng/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 VK の潜在性欠乏が存在する可能性は高く、VK 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 VK 要求性が高まる可能性が示唆された。

【投稿論文】

- a) 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.

表 1 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 \pm S.D(%)	96.34 \pm 4.19	92.86 \pm 4.74	96.90 \pm 7.74	105.98 \pm 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 \pm S.D(%)	109.7 \pm 17.37	112.14 \pm 10.76	101.21 \pm 6.61	101.85 \pm 5.10
C.V.(%)	6.72	9.60	6.53	5.00

表 2 プール血漿における測定精度

	Retinol (μ g/dL)	β -carotene (μ g/dL)	Vitamin D ₃ (ng/mL)	25(OH)D ₃ (ng/mL)
同時再現性				
Mean \pm S.D.	55.52 \pm 1.63	28.46 \pm 2.27	0.33 \pm 0.03	22.67 \pm 1.49
C.V.(%)	2.94	7.97	8.81	6.56
日差再現性				
Mean \pm S.D.	60.19 \pm 3.29	29.80 \pm 1.71	0.33 \pm 0.06	22.67 \pm 1.01
C.V.(%)	5.47	5.73	17.20	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.	13.11 \pm 0.70	1.77 \pm 0.15	1.92 \pm 0.11	7.49 \pm 0.44
C.V.(%)	5.33	8.45	5.88	5.86
日差再現性				
Mean \pm S.D.	12.68 \pm 0.47	1.91 \pm 0.18	2.01 \pm 0.10	7.01 \pm 0.68
C.V.(%)	3.69	9.28	4.76	9.68

表3 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)D₃ (ng/mL)	α-tocopherol (mg/mL)
LC-APCI/MS/MS法	55.52\pm1.63	28.46\pm2.27	22.67\pm1.49	13.11\pm0.70
従来法	55.99\pm3.57 (蛍光検出HPLC法)	22.03\pm2.05 (可視検出HPLC法)	22.78\pm0.89 (化学発光法)	13.00\pm0.37 (蛍光検出HPLC法)

	PK (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)
LC-APCI/MS/MS法	1.77\pm0.15	1.92\pm0.11	7.49\pm0.44
従来法	1.49\pm0.12 (蛍光検出HPLC法)	1.95\pm0.11 (蛍光検出HPLC法)	7.66\pm0.42 (蛍光検出HPLC法)

値はMean \pm S.D.

表 4 母乳試料における添加回収率と同時再現性

	Retinol	β-carotene	Vitamin D₃	25(OH)D₃
添加回収率				
Mean±S.D. (%)	97.59±5.38	97.37±7.04	97.68±17.66	100.41±2.19
C.V.(%)	5.52	8.16	18.08	2.18
同時再現性				
Mean±S.D.	0.49±0.01 (μg/mL)	0.03±0.00 (μg/mL)	0.84±0.04 (ng/mL)	0.19±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±S.D. (%)	96.33±5.49	97.53±8.34	99.35±7.91	97.08±5.56
C.V.(%)	5.70	8.55	7.96	5.73
同時再現性				
Mean±S.D.	2.84±0.06 (mg/mL)	0.38±0.01 (ng/mL)	0.21±0.00 (ng/mL)	0.12±0.01 (ng/mL)
C.V.(%)	2.05	3.71	1.85	9.64

表5 母乳試料中脂溶性ビタミン濃度及び推定摂取量

	Retinol	β -carotene	Vitamin D ₃	25(OH)D ₃
測定値 (Mean)	0.42 (μg/mL)	0.05 (μg/mL)	0.15 (ng/mL)	0.22 (ng/mL)
推定摂取量	331 μg RE/day		0.98 μg/day	
2005年版食事摂取基準値 (0~5月、目安量)	250 μg RE/day		2.5 μg/day	

	α -tocopherol	PK	MK-4	MK-7
測定値 (Mean)	4.08 (μg/mL)	3.77 (ng/mL)	1.57 (ng/mL)	1.17 (ng/mL)
推定摂取量	3.2 mg/day	4.8 μg/day		
2005年版食事摂取基準値 (0~5月、目安量)	3.0 mg/day	4.0 μg/day		

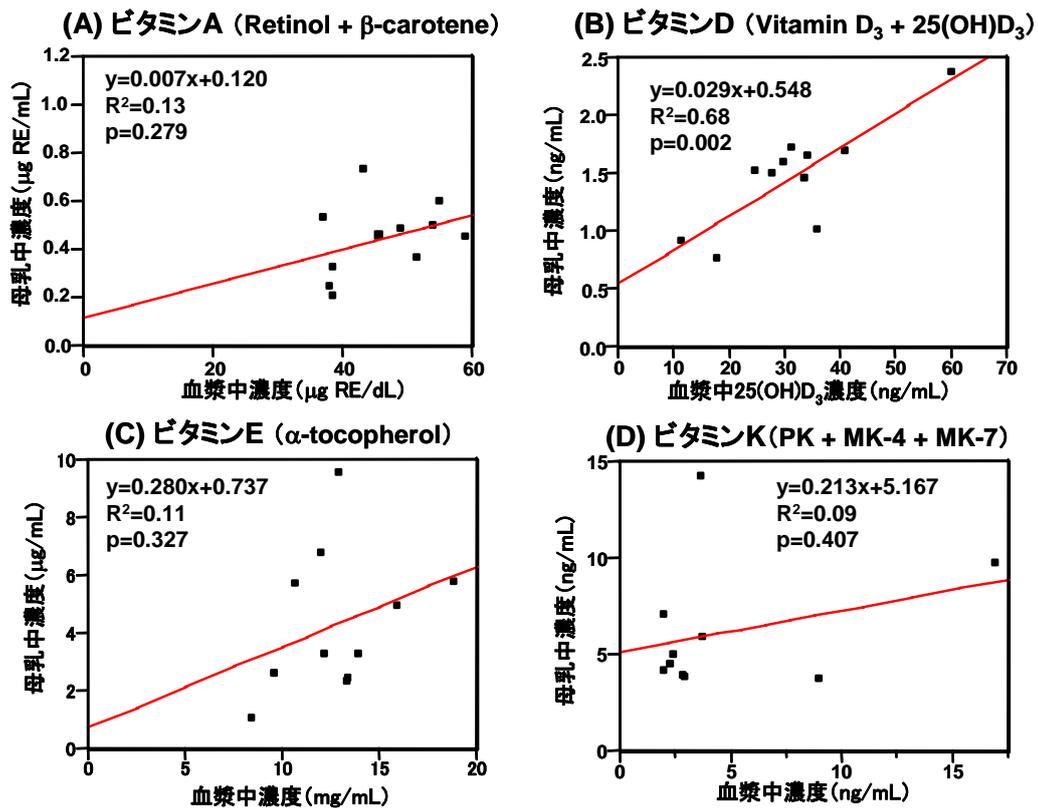


図3 血漿中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の相関

-骨に対するビタミン K の必要量の評価-

表 6 血中ビタミン K 濃度と骨代謝関連因子との関係

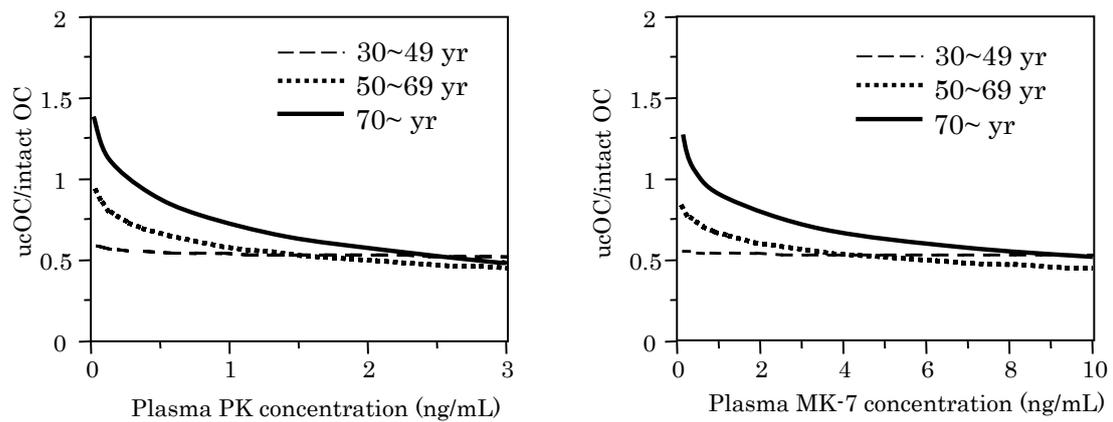
	K ₁		MK-4		MK-7	
	r	p	r	p	r	p
Age	-0.146	0.004	-0.006	0.916	-0.125	0.013
BMI	0.147	0.004	0.093	0.092	0.086	0.087
Cholesterol	0.122	0.016	-0.017	0.759	0.156	0.002
Triacylglycerol	0.342	<0.001	0.047	0.398	0.062	0.221
K ₁	—	—	—	—	—	—
MK-4	0.153	0.005	—	—	—	—
MK-7	0.173	0.001	0.009	0.875	—	—
ucOC	-0.216	<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 vitamer K concentration with each parameter.

表 7 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.



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 .

図4 年齢層別の血中 PK, MK-7 濃度と ucOC/intactOC 比の関係