

平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－ 微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明 －

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

14. 「乳児期の脂溶性ビタミン栄養の評価」

「食品中ビタミン K 類縁体含量の測定と女子大生を対象とした摂取量調査」

「思春期から青年期の Ca 代謝および骨代謝に対するビタミン D

および Ca 栄養の相互による影響の検討」

「ビタミン K 栄養の新規評価法の開発と思春期から高齢期のビタミン K 栄養評価への応用」

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学 教授

研究協力者 津川 尚子 神戸薬科大学

研究協力者 鎌尾 まや 神戸薬科大学

研究協力者 須原 義智 神戸薬科大学

研究協力者 峯上 卓也 神戸薬科大学

研究協力者 出野 奈穂子 神戸薬科大学

研究要旨

研究 1 乳児期の脂溶性ビタミン栄養の評価：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との関係を示すデータが必要となるが、日本人を対象とした栄養調査研究は少なく欧米のデータを使用しているのが現状である。本研究では、乳児の食事摂取基準策定のための基礎資料を得る目的で、LC-APCI/MS/MS による高感度定量法を用いて日本人授乳婦を対象とした母乳中脂溶性ビタミン濃度の調査研究をおこない、出産後日数と母乳中脂溶性ビタミン濃度の関係および各脂溶性ビタミン濃度間の相互関係について解析した。

研究 2 食品中ビタミン K 類縁体含量の測定と女子大生を対象とした摂取量調査：ビタミン K の体内利用に及ぼす他の脂溶性ビタミンの影響を調べる基礎データとして、日本人が日常的に摂取する食品のビタミン K 含量を類縁体別に測定し、女子大生を対象とした摂取量調査を実施した。

研究 3 思春期から青年期の Ca 代謝および骨代謝に対するビタミン D および Ca 栄養の相互による影響の検討：近年、血中 25-ヒドロキシビタミン D [25(OH)D] 濃度の低下とそれに伴う軽度な血中副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度上昇を呈するビタミン D 不足状態が骨粗鬆症のリスク因子として問題になっている。若年期における最大骨量を維持することが骨粗鬆症予防に重要であるが、我が国では若年期のビタミン D 不足のカットオフ値の設定やビタミン D の

必要量を策定する為の十分な疫学調査研究が乏しく、ビタミン D と共に骨形成に重要な Ca 栄養との相互による影響を評価した研究はほとんどない。そこで、思春期および青年期女性の Ca 代謝および骨代謝に対するビタミン D および Ca 栄養の相互による影響を検討した。思春期では、25(OH)D 濃度と Ca 摂取量が PTH 濃度低下における独立影響因子であることを確認し、Ca 摂取量の低下は血中 25(OH)D 濃度低下に伴う PTH 濃度の上昇効果を強めること、一方、血中 25(OH)D 濃度の低下は Ca 摂取量低下に伴う PTH 濃度上昇効果を強めることを確認した。このことから、思春期における両栄養素の栄養状態を良好に維持することの重要性が示唆された。一方、青年期女性のビタミン D 栄養を評価した結果、食事摂取基準目安量 5.5 $\mu\text{g/day}$ を満たす割合は 82%と高いものの、目安量以上を摂取しても血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 未満のビタミン D 不足者が約 62%存在することを確認した。また、対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL と Ca 摂取量の 4 分位点で 8 群に分類して骨密度を比較した結果、血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 以上かつ Ca 摂取量 649.7 mg/day 以上（平均約 850 mg/day ）を摂取する群において大腿骨近位部骨密度（Hip BMD）が有意に増加し、血中 PTH 濃度が有意に低下した。これらの結果は、若年健常女性の骨密度を高く維持するにはビタミン D と Ca 栄養を共に高く維持しなければならず、血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 以上の維持と、Ca 摂取量 850 mg/day 以上の摂取が有効であることが示唆された。

研究 4 ビタミン K 栄養の新規評価法の開発と思春期から高齢期のビタミン K 栄養評価への応用：ビタミン K 不足により、低カルボキシル化プロトロンビン（PIVKA-II）や低カルボキシル化 OC（ucOC）の血中濃度が上昇することから、血中 PIVKA-II および ucOC 濃度はビタミン K の不足マーカーとして利用できるが、これらを利用したビタミン K 栄養評価法については確定されていないのが現状である。そこで、ビタミン K 栄養評価を目的として曲率解析を応用した新規栄養評価法を開発し、血中 PIVKA-II 濃度ならびに ucOC 濃度を指標にビタミン K 摂取量のカットオフ値を推定した。その結果、血中 ucOC 濃度を指標とした骨に必要なビタミン K 摂取量のカットオフ値は、思春期男女で 155～188 $\mu\text{g/day}$ 、高齢者で 270 $\mu\text{g/day}$ と推定された。一方、思春期男女の血液凝固に必要なビタミン K 摂取量は 54～62 $\mu\text{g/day}$ （約 1 $\mu\text{g/kg/day}$ ）と推定された。このことから、血液凝固においては現在の食事摂取基準（男子：75～80 $\mu\text{g/day}$ 、女子：60～65 $\mu\text{g/day}$ ）のビタミン K 摂取量で充分であるが、骨の健康維持を目的とした場合にはより多くのビタミン K 摂取が必要であり、高齢者は若年者に比べてより多くのビタミン K 摂取が必要と推察された。高齢者については、さらに血中ビタミン K 濃度および血中 ucOC 濃度を用いて曲率解析を行い、ビタミン K 不足マーカーおよび臨床骨折予測因子としての血中 ucOC 濃度の意義について検討した。その結果、骨のビタミン K 不足を表す ucOC 濃度のカットオフ値として 4.1～4.4 ng/mL が得られた。血中 ucOC 濃度 4.5 ng/mL をカットオフ値とし、臨床骨折発生に対する比例ハザード解析、Kaplan-Meier 生存時間解析、ロジスティック回帰分析を行った結果、ucOC 濃度 4.5 ng/mL は骨におけるビタミン K 不足の検出とともに臨床骨折の予測マーカーになり得る可能性が示唆された。

研究 1：乳児期の脂溶性ビタミン栄養の評価

A. 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、これまでに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すると共に、授乳婦の血漿中脂溶性ビタミン濃度や食事摂取量との関係についての調査を実施した。そこで平成 19 年度の研究として、さらに母乳中脂溶性ビタミン濃度と出産後日数との関係および各脂溶性ビタミン濃度間の相互関係について解析した。

B. 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 3～265 日（0～8.8 ヶ月）の日本人授乳婦 82 名を対象とした。背景は以下の通りである。

年齢 : 30.8±4.5 歳（18-39 歳）

出産後日数 : 49.1±57.6 日（3-265 日）

[1.6±1.9 ヶ月（0.1-8.8 ヶ月）]

月]]

在胎週数 : 39.3±1.3 週（36-42 週）

出産形態 : 経膈分娩 68 名 帝王切開

14 名

(2) 母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定

a. ビタミン A, D, E 類の抽出（アルカリけん化法）

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ⁱ⁾ 50 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エタノール溶液ⁱⁱ⁾ 50 μL, 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℃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 A, E 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、残渣をエタノール 200 μL に溶解し、50 μL を LC-APCI/MS/MS に適用した。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、DMEQ-TAD 誘導体化をおこなった。

<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、0.4 % DMEQ-TAD 酢酸エチル溶液 150 μ L 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 150 μ L を加えて、室温で60分間放置した後、エタノール 1.5 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 μ L に溶解し、30 μ L を LC-APCI/MS/MS に適用した。なお、測定対象は vitamin D₃ (D₃)、vitamin D₂ (D₂)、25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] 及び 25-hydroxyvitamin D₂ [25(OH)D₂]とした。

b. ビタミン K 類の抽出 (リパーゼ消化法)

母乳 3.0 mL を褐色のスクリュウコック付遠沈管にとり、ビタミン K 内部標準物質エタノール溶液 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 LC-APCI/MS/MS に適用した。

c. ビタミン A、E、K 類の測定

ビタミン A、E、K 類は、以下の条件の LC-MS/MS にて測定した。

<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 (資生堂社製)

(4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μ m)

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 $\rightarrow$ 90 % のグラジエ

ント

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

流速 : 1.0 mL/min

温度 : 35 $^{\circ}$ 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 検出イオン :

Precursor ion/product ion (m/z)

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

β -carotene (m/z : 537.6/177.1)

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)
d₆-α-tocopherol (m/z : 436.5/171.1)
[¹⁸O₂]-PK (m/z : 455.4/191.1)
[¹⁸O₂]-MK-4 (m/z : 449.4/191.1)
[¹⁸O₂]-MK-7 (m/z : 653.7/191.1)

各脂溶性ビタミンの定量計算には、測定対象脂溶性ビタミン（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。

母乳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(ng)

V : 母乳量(mL)

d. ビタミンD類の測定

ビタミンD類は、以下の条件のLCMS/MSにて測定した。

<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 (資生堂社製)

(4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)

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→95 %のグラジ

エント

流速 : 1.0 mL/min.

温度 : 35°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 検出イオン :

Precursor ion/product ion (m/z)

DMEQ-TAD-D₃ (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)

ビタミンD類の定量計算には、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。

母乳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ビタミンDの濃度比

S : 内部標準物質の添加量(ng)

V : 母乳量(mL)

i) 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.

$$\text{d}_6\text{-all-trans-retinol 濃度}(\mu\text{g/mL}) = A_{325 \text{ nm}} \times 549/100$$

ii) その他の内部標準物質エタノール溶液 : d₆-β-carotene , d₇-D₃ , d₆-25(OH)D₃ , d₆-α-tocopherol , [¹⁸O₂]-phyllloquinone (PK), [¹⁸O₂]-menaquinone-4 (MK-4) 及び [¹⁸O₂]-menaquinone-7 (MK-7)をそれぞれ 1 µg/mL となるようエタノールに溶解した.

(3) 統計解析

JMP 5.0.1J を用いた.

C. 結果

各脂溶性ビタミンの母乳中濃度を表 1-1 に示す. 全対象者において, ビタミン A 類である all-trans-retinol, β-carotene の平均濃度は 0.455 (範囲 : 0.097~1.783, 中央値 : 0.406) µg/mL, 0.062 (範囲 : 0.002~0.375, 中央値 : 0.045) µg/mL であった. ビタミン D 類の母乳中濃度は低く, D₃, D₂, 25(OH)D₃ および 25(OH)D₂ の平均濃度は 0.088 (範囲 : 0.010~1.116, 中央値 : 0.061) ng/mL, 0.078 (範囲 : 0~1.300, 中央値 : 0.021), 0.081 (範囲 : 0.023

~0.172, 中央値 : 0.078) ng/mL および 0.003 (範囲 : 0~0.012, 中央値 : 0.003) ng/mL であった. 一方, α-tocopherol の母乳中濃度は最も高く, 5.087 (範囲 : 0.387~35.664, 中央値 : 3.590) µg/mL であった. また, ビタミン K 類である PK, MK-4 および MK-7 の平均濃度は 3.771 (範囲 : 0.953~12.382, 中央値 : 3.481) ng/mL, 1.795 (範囲 : 0.720~4.750, 中央値 : 1.611) ng/mL および 1.540 (範囲 : 0.074~15.861, 中央値 : 1.001) ng/mL であった.

次に, 対象者を出産後日数が 0~11, 11~30, 31~90, 91~180 および 91~180 日の 5 グループに分け, 各脂溶性ビタミン濃度と出産後日数の関係について解析した. 大部分の脂溶性ビタミン濃度は, 出産後日数が経過するにつれ減少傾向を示し, 出産後日数が 0-11 日のグループにおける母乳中 all-trans-retinol, β-carotene, 25(OH)D₂ および α-tocopherol 濃度は他のグループに比べ有意に高値であった (p < 0.05). 一方, 母乳中脂質濃度については各グループ間で有意な差異は認められなかった.

母乳中脂溶性ビタミン濃度と他の関連因子および各脂溶性ビタミン濃度間の関係を表 1-2 に示す. 出産後日数と母乳中 all-trans-retinol, β-carotene, α-tocopherol および MK-4 濃度は有意な負の相関を示した. 一方, 各脂溶性ビタミン濃度間の関係については, all-trans-retinol 濃度が β-carotene, 25(OH)D₂, α-tocopherol, PK, MK-4 および MK-7 濃度と有意な正の相関を示した他, β-carotene および α-tocopherol 濃度は 25(OH)D₂ およびビタミン K 類濃度と有意な正の相関を示した. ビタミン D 類については, D₃-D₂ 間および 25(OH)D₃-25(OH)D₂ 間に有意な正の相関が認められたが, D-25(OH)D 間には相関が認めら

れなかった。また、ビタミン K 類においては 3 種の類縁体間で有意な正の相関が認められた。加えて、母乳中脂質濃度は 25(OH)D₃, α -tocopherol, PK および MK-4 と有意な正の相関を示した。

D. 考察

25(OH)D は血漿中に 20~50 ng/mL の濃度で分布しているにもかかわらず、母乳中濃度は 0.1 ng/mL 以下と低いことが明らかとなった。

脂溶性ビタミン濃度と出産後日数の関係については、一般的に母乳中ビタミン A および E 類濃度は初乳中で高く、その後は徐々に減少し、成熟乳において一定になるとされている。Sakurai ら¹⁾の報告においても同様に、母乳中 all-trans-retinol, β -carotene, α -tocopherol 濃度は出産後日数が経過するにつれて減少しているが、D₃については出産後日数との関係は認められていない。また、Kojima ら²⁾は、母乳中 PK および MK-4 濃度は初乳中で高く、出産後日数が経過するにつれて減少すると報告している。これらの結果と考え合わせると、ビタミン K 類のなかでも MK-4 の母乳中濃度はビタミン A および E 類と同様に出産後日数に影響を受けるものと考えられる。

各脂溶性ビタミン濃度間の関係のうち、ビタミン D 類については、D₃-D₂ 間および 25(OH)D₃-25(OH)D₂ 間に有意な正の相関が認められたが、D-25(OH)D 間には相関が認められなかったことから、ビタミン D 類の血漿から母乳への分泌には化合物の極性が影響している可能性が考えられた。また、母乳中脂質濃度と各脂溶性ビタミン濃度の関係から、母乳中脂質濃度は母乳中ビタミン E および K

類濃度に影響を及ぼす重要な因子であると考えられるが、ビタミン A および D 類については血漿中結合タンパク質など、他の因子の寄与も大きいと予想された。

研究 2 : 食品中ビタミン K 類縁体含量の測定 と女子大生を対象とした摂取量調査

A. 目的

栄養素は単独で摂取されるものではなく、食事全体の成分として摂取される。我々の食事は多くの栄養素や他の成分から構成されており、その中のいくつかは互いに何らかの形で影響しあうと予想される。従って、今後は、単一の栄養素における生体への影響のみならず、栄養素-栄養素間の相互作用についても検討することが重要となる。しかし現在のところ、栄養素-栄養素間相互作用を解析するための有効なアプローチは確立されていない。

我々は、食事摂取基準策定の基礎資料を得るため、日本人を対象として、各脂溶性ビタミンの血漿中濃度測定や摂取量調査などの栄養調査研究を進めてきた。このようにして集積されたデータを用いて、脂溶性ビタミン間の相互作用について何らかの傾向を見出すことが可能ではないかと考えた。ビタミン E が生体内においてビタミン K に拮抗的に作用するという報告³⁾があることから、まずはビタミン K の体内利用率に及ぼす他の脂溶性ビタミンの影響を調べることを計画した。本年度はその準備段階として、ビタミン K 類摂取量を正しく評価するべく、我々が開発した改良型蛍光検出 HPLC 法⁴⁾を用いて、日本人が日常的に摂取している食品におけるビ

タミン K 類を定量し、女子大生における摂取量調査をおこなった。

B. 方法

(1) 食品試料からのビタミン K 類の抽出・測定

a. 一般的な食品試料からのビタミン K 類の抽出

可食部 1～5 g と内部標準物質溶液(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 IS-C16 および IS-C19³ 各 0.5 µg/100 µL エタノール) および海砂 1 g を乳鉢中ですりつぶし、アセトン 10 mL で 3 回抽出した。抽出液をろ過した後、分液ろうとに移し、ジエチルエーテル 40 mL で 2 回抽出した。ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ロータリーエバポレーターで乾固し、残渣を 5 mL のヘキサンに溶解した。得られたヘキサン溶液を、あらかじめヘキサン 20 mL で洗浄した 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) 10 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 1.0～2.5 mL のエタノールに溶解し、40 µL を 2 種類の条件の HPLC に適用した。

b. 油脂類からのビタミン K 類の抽出

試料 1.0～2.5 g と内部標準物質溶液 (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 IS-C16 および IS-C19 各 0.5 µg/100 µL エタノール) を混合し、5 mL のヘキサンに溶解した。得られた溶液を 5 分間振とうした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。ヘキサン層 4.5 mL を、あらかじめヘキサン 20 mL で洗浄した 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) 10 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 1.0～2.5 mL のエタノールに溶解し、40 µL を 2 種類の条件の HPLC に適用した。

c. ビタミン K 類の測定

ビタミン K 類は以下の 2 種類の条件の蛍光検出器付き HPLC で測定した。

<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 µm, 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 µm, 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.

食品中ビタミン K 含量($\mu\text{g}/100\text{g}$)= $\text{RS}/\text{V} \times 100$

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 (μg)

V: 試料量 (g)

(2) 女子大生を対象とした摂取量調査

インフォームドコンセントが得られた女子大学生 125 名 (埼玉県に位置する女子栄養大学の在学学生, 平均年齢 21.2 歳) を対象とした. 平日 2 日, 休日 1 日を含む計 3 日間の食事摂取量を重量法にて記録した. 本研究で測定対象となった食品からのビタミン K 摂取量は, 後に示す類縁体別ビタミン K 含量を用いて算出した. 本研究で測定対象としなかった食品からのビタミン K 摂取量については, 5 訂増補日本食品成分表に収載されたビタミン K 含量を用いて計算した. ただし, 植物性食品は PK として, 動物性食品は MK-4 として計算した. また, MK-7 については, 以下の式により MK-4 換算重量とした後, 摂取量を求めた.

MK-7 の MK-4 換算重量= $\text{C} \times 444.7/649.0$

C: MK-7 含量

444.7: MK-4 の分子量

649.0: MK-7 の分子量

C. 結果

今回測定対象とした 11 食品群, 58 品目の食品中ビタミン K 類縁体含量を表 2-1 に示す. PK は小松菜, しそ, しゅんぎく, ブロッコリー, ほうれん草などの緑色野菜類に多く含まれていた. また, やきのり, ひじき, カットわかめなどの海藻類, 大豆油, 調合油などの植物性油脂類および抹茶にも多くの PK が含まれていた. 紅茶の茶葉には PK が多く含まれていたが, 溶出液中ではほとんど検出されなかった. マヨネーズなどの調味料にも比較的多くの PK が含まれていることが明らかとなった. MK-4 は魚介類, 肉類, 卵類, 乳製品, 調味料・香辛料に広く分布していたが, 平均的な含量は PK に比べて低かった. なかでも鶏もも肉, 卵黄, マヨネーズなどの食品には比較的多くの MK-4 が含まれていた. 一方, MK-7 は納豆類に特異的に多く含まれており, その含量は 700~1000 g/100 g であった.

次に, 女子大生におけるビタミン K 類縁体摂取量の分布を図 2-1 に示す. 総ビタミン K 摂取量は平均 $230.2 \pm 143.3 \mu\text{g}/\text{day}$ となり, 対象者の 94.4% が食事摂取基準における目安量 (60 mg/day, 18-29 歳女性) に達していた. 類縁体別の平均摂取量は, PK 155.9 ± 91.1 , MK-4 16.9 ± 10.4 および MK-4 換算 MK-7 $57.4 \pm 83.7 \text{ mg}/\text{day}$ となり, 総ビタミン K 摂取量に対する各類縁体の割合は 67.7, 7.3 および 24.9 % であった. また, 各食品群の総ビタミン K 摂取量に占める割合を算出したところ, 野菜類および納豆を含む豆類で全体の 78.3 % を占めていることが明らかとなった.

(図 2-2). 同様に, 各食品群の PK, MK-4, MK-7 摂取量に占める割合を算出したところ, PK では野菜類が, MK-4 では肉類が, MK-7 では納豆類を含む豆類が主な摂取源であった. 従って, 東日本在住の若年女性におけるビタミン K 摂取には, 野菜類由来の PK および納豆由来の MK-7 が大きく寄与しているものと考えられた.

D. 考察

以上より, ビタミン K 摂取量を類縁体別に詳しく評価することが可能となった. 目的の項で述べたように, 高用量のビタミン E サプリメントがビタミン K 不足の指標となる血漿中 PIVKA-II 濃度を上昇させるという報告がある. 従って, 今後は植物性油脂中に豊富に含まれるビタミン E や, 添加物として添加されたビタミン E がビタミン K の生体利用性に及ぼす影響についての検討も必要であると考えられる. また, 様々な食品に含まれている各ビタミン K 類縁体の生体利用性の違いについても興味をもたれる.

研究 3: 思春期から青年期の Ca 代謝および骨代謝に対するビタミン D および Ca 栄養の相互による影響の検討

A. 目的

ビタミン D 栄養の評価には, ビタミン D 摂取量, 血中 25(OH)D 濃度に加えて, 体内のビタミン D 栄養状態を鋭敏に反映する血中副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度が指標として用いられる. ビタミン D 栄養の段階は, 大きく欠乏, 不足, 充足の 3 段階に分けられる. ビタミン D 不足では, 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(図 3-1). 現在, ビタミン D 栄養の充足は血中 25(OH)D 濃度と PTH 濃度が逆相関関係を示すことを利用して, PTH 濃度が上昇しない 25(OH)D 濃度という観点から求められている. しかし, 一方で血中 PTH 濃度は Ca 摂取量不足によっても上昇することから, Nutrition-Nutrition Interaction としてビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互作用を評価することが必要になる. そこで, 12~18 歳の思春期男女および 19 歳~29 歳の青年期女性を対象に, Ca 代謝調節ホルモンである PTH 濃度あるいは骨密度に対する血中 25(OH)D 濃度を指標としたビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による影響について解析した.

B. 方法

(1) 対象者

思春期: 12~18 歳の健常な思春期男女 324 名を対象とした. 対象者の内訳は, 中学 1 年 (男子 58 名, 女子 54 名), 高校 1 年 (男子 54 名, 女子 57 名), 高校 3 年 (男子 46 名, 女子 55 名) .

青年期: 19~29 歳 (平均 21.2 歳) の健常女性合計 296 人.

(2) 測定項目

身体関連項目: 年齢, 身長, 体重. 栄養摂取量: ビタミン D, Ca 摂取量ならびに三大栄養素とエネルギー摂取量を調査した. 血中骨代謝関連項目: 血中 25(OH)D, PTH 濃度ならびに青年期女性については血中骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性, I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (crosslinked

N-telopeptide of type I collagen :NTX), soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand (sRANKL) 濃度を測定した。骨密度：青年期女性について腰椎椎体骨骨密度 (L2-4 BMD), 大腿骨近位部骨密度 (Hip BMD)を DXA 法にて測定した。

(3) 統計解析

思春期男女を対象とした血中 PTH 濃度に対するビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による作用の解析：25(OH)D 濃度と PTH 濃度の負相関関係における, Ca 摂取量の影響を検討するために, 対象者を Ca 摂取量の中央値(553 mg/day) で 2 群にわけ, 両群の回帰式を共分散分析法 (ANCOVA) にて比較した。一方, Ca 摂取量と PTH 濃度の負相関関係におけるビタミン D 栄養の影響を検討するために, 対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/day で 2 群にわけ, 両群の回帰式を共分散分析法 (ANCOVA) にて比較した。

青年期女性を対象とした血中 PTH 濃度および骨密度に対するビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による作用の解析:血中 PTH 濃度および骨密度に対するビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による影響を検討するために, 対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL と Ca 摂取量の 4 分位点 (356.4, 464.2, 649.7 mg/day) を用いて 8 群に分類し, 各群の L2-4 BMD, Hip BMD, 血中 PTH 濃度を比較した。2 群間の比較は, Student's t-test を用いて, 2 群以上の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey-Kramer HSD-test を用いて有意差検定した。

統計解析ソフトとして, SAS 社製 JMP7.0.1J を用いた。

C. 結果

思春期男女を対象とした血中 PTH 濃度に対するビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による作用の解析：

表 3-1 に対象者の背景を示す。血中 25(OH)D 濃度は平均 26.1 ± 7.1 ng/mL で, 一般的なビタミン D 充足指標である 20 ng/mL を上回っていた。PTH 濃度は, 平均 40.7 ± 16.9 pg/mL であり, 標準値上限の 60 pg/mL よりも下回っていた。ビタミン D 摂取量は, 平均 10.4 ± 2.7 μ g/day で, 2010 年版日本人の食事摂取基準の目安量 (12-14 歳 : 3.5 μ g/day, 15 ~17 歳 : 4.5 μ g/day) を上回っており, 対象者のビタミン D 摂取量は良好であると判断された。Ca 摂取量は, 平均 586.1 ± 272.1 mg/day で, 2010 年版日本人の食事摂取基準の推奨量 (男子 : 12~14 歳 1000 mg/day, 15 ~17 歳 800 mg/day, 女子 : 12~14 歳 800 mg/day, 15~17 歳 : 650 mg/day) を下回っていた。

血中 25(OH)D 濃度と PTH 濃度の関係を評価するにあたり, 両パラメーターの分布の正規性を評価した結果, 25(OH)D, PTH 濃度ともに正規分布から外れたことより Log 変換値を用いて相関関係を評価した。その結果, 血中 25(OH)D 濃度と PTH 濃度は, 有意な負の相関関係を示した ($p < 0.001$) (図 3-2)。一方, Ca 摂取量も PTH 濃度と有意な負相関関係を示した ($p < 0.001$) (図 3-3)。その他, 血中 PTH 濃度と関連性を示す因子を単回帰分析により調べた結果, 血中 1,25(OH)₂D 濃度は有意な正相関関係を示し, 一方, ビタミン D 摂取量と PTH 濃度には有意な関係は認められなかった (表 3-2)。次に, 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 3-2)。血中 25(OH)D 濃度,

1,25(OH)₂D 濃度, Ca 摂取量を予測因子とした場合, いずれの因子も独立して PTH 濃度に影響する因子であった。

そこで, 25(OH)D 濃度と PTH 濃度の負相関関係における Ca 摂取量の影響を検討するために, 対象者を Ca 摂取量の中央値 (553 mg/day) で 2 群にわけ, 両群の回帰式を共分散分析法 (ANCOVA) にて比較した (図 3-4)。
Ca 摂取量 553 mg/day 未満の低 Ca 摂取群の平均 Ca 摂取量は 383 ± 114 mg/day, 553 mg/day 以上の低 Ca 摂取群の平均 Ca 摂取量は 789 ± 229 mg/day であった。低 Ca 群と高 Ca 群の 25(OH)D 濃度 - PTH 濃度の回帰式を比較すると, 図 3-4 に示されるように低 Ca 摂取群では血中 25(OH)D 濃度の低下に伴って PTH 濃度が上昇しやすいことが確認された。

次に, Ca 摂取量と PTH 濃度の負相関関係におけるビタミン D 栄養の影響を検討するために, 対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL で 2 群にわけ, 両群の回帰式を共分散分析法 (ANCOVA) にて比較した (図 3-5)。
25(OH)D 濃度 20 ng/mL 未満の低 25(OH)D 濃度群の平均血中濃度は 17.1 ± 2.1 ng/mL, 20 ng/mL 以上の低 25(OH)D 濃度群の平均血中濃度は 28.6 ± 5.9 ng/mL であった。低 25(OH)D 群と高 25(OH)D 群の Ca 摂取量 - PTH 濃度の回帰式を比較すると, 図 3-5 に示されるように低 25(OH)D 群では Ca 摂取量の低下に伴って PTH 濃度が上昇しやすいことが確認された。

青年期女性を対象とした血中 PTH 濃度および骨密度に対するビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による作用の解析: 表 3-3 に対象者の年齢, 体格, 栄養摂取量と身体計測値の基準値ならびに食事摂取基準 (2010 年版) による基準値を示した。対象者の身長, 体重, BMI の平均値はほぼ日本人の平均値の付近にあ

り, 主な栄養素摂取量の平均値はほぼ目安量, 推奨量を満たしていたが, エネルギー摂取量がやや低く, Ca 摂取量の平均値は推奨量未満であった。ビタミン D 摂取量の平均値は 12.4 μ g/day であった (図 3-6)。
2010 年版食事摂取基準における目安量が 5.5 μ g/day であることから, 本調査の対象者はビタミン D 摂取量が比較的高い集団といえ, 5.5 μ g/day 以上を摂取する対象者は 82.4% であった。しかしながら, 血中 25(OH)D 濃度の平均値は 18.4 ng/mL であり (図 3-7), 一般的なビタミン D 不足のカットオフ値を 20 ng/mL とすると, 平均的にやや不足状態といえる。5.5 μ g/day 未満のビタミン D 摂取である対象者のうち, 血中 25(OH)D 濃度が < 20 ng/mL のビタミン D 不足者は 75% であったが, 5.5 μ g/day 以上のビタミン D を摂取する対象者においても < 20 ng/mL のビタミン D 不足者は 62% 存在した。血中 25(OH)D 濃度と血中 PTH 濃度は有意な負相関関係を示したことから, 後述の曲率解析法によりカットオフ値を算出した結果, 19.96 ng/mL の値が得られた。

次に, 対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL と Ca 摂取量の 4 分位点 (356.4, 464.2, 649.7 mg/day) を用いて 8 群に分類し, 各群の L2-4 BMD と Hip BMD を比較した。この 8 群の背景データとして血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量を図 3-8 に示す。血中 25(OH)D 濃度の平均値は, 20 ng/mL 未満群で約 15 ng/mL, 20 ng/mL 以上群で約 23 ng/mL となり, 各々の Ca 摂取量 4 分位群間では差を認めなかった。一方, Ca 摂取量第 1 位～第 4 位群の Ca 摂取量は約 260, 400, 550, 850 mg/day であり, 各々 25(OH)D 濃度群間に差がないことを確認した。次に, これらの群における Hip BMD を比較した結果 (図 3-9), ビタミン D 不足状

態である <20 ng/mL では Ca 摂取量 4 分位群間に有意差を認めなかったが、 ≥ 20 ng/mL では Ca 摂取量の増加に応じて Hip BMD が高くなり、Ca 摂取量 4 分位第 4 位群の Hip BMD は第 1 位群に比べて有意に高かった。また、Ca 摂取量 4 分位の第 4 位群同士の比較では、わずかに有意ではないもののビタミン D 栄養が充足した ≥ 20 ng/mL のほうが高い傾向を示した ($p = 0.054$)。L2-4 BMD については、8 群間に有意差を認めなかった。次に、8 群の血中 PTH 濃度を比較した結果 (図 3-10)、 < 20 ng/mL 群の血中 PTH 濃度は全体的に ≥ 20 ng/mL 群よりも高く、Ca 摂取量の増加に応じた変化は認められなかった。一方、 ≥ 20 ng/mL 群では、統計的に有意ではなかったものの ($p = 0.112$)、Ca 摂取量の増加に応じて PTH 濃度が低下する傾向がみられた。また、Ca 摂取量 4 分位の第 4 位群同士の比較において、 < 20 ng/mL 群よりも ≥ 20 ng/mL 群のほうが有意に低い血中 PTH 濃度を示した。

D. 考察

ビタミン D 栄養と Ca 栄養が密接な関係にあることは明らかであるが、PTH 濃度を指標としてこれら両栄養素の栄養状態を総合的に評価した報告は少ない。思春期を対象とした研究として、インド在住の思春期男女において、フィチン酸摂取量と Ca 摂取量の比が PTH 濃度と血中 25(OH)D 濃度の関係に及ぼす影響が報告されている⁵⁾。フィチン酸は穀類・豆類に多く含まれる腸管 Ca 吸収を抑制する食事成分である。インド都市部に住む思春期男女は地方在住者よりも Ca 摂取量やや高く、一方、地方在住者はフィチン酸摂取量が有意に高い。従って、フィチン酸摂取量/Ca 摂取量比は都市在住者で低く、地方在住

者で高くなる。この両群の 25(OH)D 濃度と PTH 濃度の相関関係を比較すると、フィチン酸摂取量/Ca 摂取量比が高い地方在住者のほうが 25(OH)D 濃度の低下に伴って PTH 濃度が上昇しやすい結果となっている。これは、本研究において低 Ca 摂取群に見られたと同様の結果であり、血中 PTH 濃度を指標にビタミン D 栄養の充足を評価するにあたって、Ca 摂取量の関与を考慮する必要があることを示唆するものである。我が国をはじめ、インド、中国などのアジア諸国の思春期の Ca 摂取量は、欧米諸国に比べるとかなり低い。本研究の対象者の平均 Ca 摂取量は、586.1 mg/day であり、平均的な日本人の Ca 摂取量を示すものであったが、フィンランドの 14～16 歳女子では平均 1216 mg/day⁶⁾、パリ在住の 13～17 歳思春期男子では 809 mg/day⁷⁾ である。これらのことを考えると、ビタミン D 栄養の充足基準を評価するにあたり、欧米諸国で研究評価された数値をそのまま日本人にあてはめることはできず、日本における独自の評価が必要であることが強く示唆された。また、Ca 摂取量とビタミン D 栄養は PTH 濃度に対して相互作用し、Ca 摂取量が低い思春期学生においてはビタミン D の必要量がより高くなると判断された。

一方、青年期女性のビタミン D 栄養状態をビタミン D 摂取量と血中 25(OH)D 濃度の両面から評価した結果、ビタミン D 摂取量の平均値は 12.4 μ g/day で約 84% の対象者は摂取基準を満たしていたものの、目安量 5.5 μ g/day 以上であってもそのうちの過半数 (62%) は血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 未満のビタミン D 不足者であることがわかった。日本人若年女性 (18～29 歳) を対象とした他の調査でも、血中 25(OH)D 濃度の平均値は 14.2 ng/mL あ

るいは 13.6 ng/mL であり, ビタミン D 不足者が過半数存在している^{8,9)}. 今回の対象者は通常の生活をする健常若年女性であることから, 日常的に浴びる紫外線照射量も含め 5.5μg/day のビタミン D 摂取はビタミン D 栄養の充足に不十分である可能性が示唆された. ビタミン D 栄養を評価する基準には一般的に血中 25(OH)D 濃度の 20 ng/mL が用いられる. しかし, この値は主に欧米人の血中 PTH 濃度を指標として評価されたものであり, 日本人, 特に若年者を対象とした報告はほとんどない. 血中 PTH 濃度はビタミン D 栄養だけでなく, Ca 摂取量とも関連して変動する. したがって, Ca 摂取量が欧米人に比べて半分程度である日本人においても, 同様のカットオフ値を用い評価してよいかどうか明らかではない. そこで, 曲率解析法を用いて若年成人女性のデータを元にカットオフ値を評価した結果, 19.96 ng/mL が得られ, 日本人若年女性においてビタミン D 不足のカットオフ値 20 ng/mL を用いることは適当であると判断した.

次に, ビタミン D 栄養と Ca 栄養の相互による骨密度への影響を検討した結果, 血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 以上の群において Ca 摂取量の増加に伴った Hip BMD の増加が観察され, 血中 25(OH)D 濃度が充足域にある場合は Ca 摂取量の影響が BMD に現れやすいと考えられた. 一方, L2-4 BMD でも同様の傾向が見られたが有意差は得られなかった. 血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量が共に高い群において Hip BMD が増加した理由の一つとして, 血中 PTH 濃度の低下が関与すると考えられた. Bischoff-Ferrari ら¹⁰⁾ は 20 歳以上のアメリカ人 (女性 4958 人, 男性 5003 人) を対象とし, 血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量が

Hip BMD に与える影響を調査した. この研究では, 男女別に対象者を血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 未満, 20 以上 30 ng/mL 未満, 30 ng/mL 以上の 3 群に分け, それぞれの群における Ca 摂取量の 4 分位群と Hip BMD の比較を行っている. その結果, 女性の血中 25(OH)D 濃度が 20 未満の場合にのみ, Ca 摂取量が多い群で Hip BMD が有意に高くなる ($p = 0.005$) という結果となった. このときの女性の Ca 摂取量 4 分位群の Ca 摂取量の中央値は低い群より 512, 617, 737, 961 mg/day であった. 本研究における Ca 摂取量 4 分位群の中央値は 277, 406, 556, 811 mg/day であり, これと比較すると彼らの研究の Ca 摂取量はかなり高く, 結果をそのまま日本人にあてはめて考えることはできない. しかし, BMD に対する Ca 摂取量とビタミン D 栄養との相互による影響を考慮することは重要と考えられ, 今回の結果から若年女性の BMD を高く維持するためにはビタミン D と Ca 栄養を共に高く維持する必要がある, 血中 25(OH)D 濃度 20 ng/mL 以上の維持と Ca 摂取量 850 mg/day 以上の摂取が有効と判断された.

研究 4 : ビタミン K 栄養の新規評価法の開発と思春期から高齢期のビタミン K 栄養評価への応用

A. 目的

ビタミン K は, ビタミン K 依存性タンパク質 (VKDP) のグルタミン酸残基を γ -カルボキシグルタミン酸へ変換する酵素の補因子として働く. 代表的な VKDP として, 血液凝固系にかかわる血液凝固因子第 II, VII,

IX および X 因子，骨組織で発現するオステオカルシン（OC）があり，これらは Gla 化されることにより血液凝固や骨形成を促進するように働く．ビタミン K が欠乏すると出血などの明確な血液凝固異常の症状があらわれるが，軽度の欠乏，すなわち不足状態では低カルボキシル化プロトンビン

（PIVKA-II）と低カルボキシル化 OC（ucOC）濃度が上昇するため，これらはビタミン K の不足マーカーとして利用できる．

現在，ビタミン K の食事摂取基準は血液凝固遅延を指標として設定されており，正常な血液凝固能を維持するに必要なビタミン K 摂取量 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日が目安量の設定基準となっている．これにより，成人男性では $75 \mu\text{g}/\text{日}$ ，成人女性では $60 \sim 65 \mu\text{g}/\text{日}$ が目安量として設定されている．この策定値の根拠となる研究は，ビタミン K 制限食摂取時の血中フィロキノン（PK）濃度と尿中 PIVKA-II 濃度を回復させるに必要なビタミン K 摂取量を介入試験で確認したものであるが，わずか 10 人の若年米国人男性（年齢 28.3 ± 3.2 歳）を対象者に検討された研究である¹¹⁾．Suttie らが報告したこの研究では，平均体重 72 kg の対象者では $82 \mu\text{g}/\text{day}$ 程度のビタミン K 摂取量（約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/day）が必要であるとされ，日本人の目安量はこれを根拠として体重換算されている．現在のところ，日本人を対象としたビタミン K 必要量に関する研究はなく，日本人の摂取基準策定の科学的根拠に乏しいのが現状である．また，上記のようにビタミン K 目安量はビタミン K の血液凝固作用を指標として策定されているが，ビタミン K 栄養の骨密度増加や骨折予防における役割も重要である¹²⁻¹⁴⁾．血中の PIVKA-II と ucOC をそれぞれ血液凝固と骨のビタミン K 不足

マーカーとして比較した場合，骨に必要なビタミン K は血液凝固に比べて多いことが示唆されている^{15,16)}．また，われわれは OC の Gla 化に必要な血中ビタミン K 濃度は加齢と共に高くなることを確認しており¹⁷⁾，高齢者では若年者より多くのビタミン K 摂取量を必要とする可能性が示唆される．現在，骨におけるビタミン K の栄養評価研究は不足しているため，骨代謝に必要なビタミン K 摂取量を食事摂取基準に反映させることは困難である．しかし，血中 ucOC 濃度が VK 不足マーカーとして骨折に関連することが明らかとなっており，血中 ucOC 濃度を用いて骨のビタミン K 栄養状態を評価し，必要量を求めていくことは非常に重要な課題である．特に若年者の場合，骨折の発生頻度が少ないために骨折がビタミン K 栄養の評価対象にならないことから，血中 ucOC 濃度が骨の VK 栄養マーカーとして非常に重要になる．これまで若年者の骨に対するビタミン K 栄養の調査研究はほとんどなく，またその評価方法も確立されていない．そこで，本研究ではビタミン K 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度および ucOC 濃度の関係をもとに，曲率解析を応用した新規ビタミン K 栄養評価法を開発し，思春期から高齢期における血液凝固と骨に必要なビタミン K 摂取量のカットオフ値を算定した．

一方，骨におけるビタミン K 不足マーカーである ucOC の血中濃度は，それ自身が骨折の予測マーカーとなり得る可能性が示唆されている．そこで，高齢者を対象に臨床骨折（長管骨骨折と症状を伴う脊椎骨折）の発生を end point として，観察開始時腰椎骨密度，既存骨折，血中 ucOC 濃度，血中ビタミン K 濃度（ $n = 190$ ），体格等との関連を検討した．

B. 方法

(1) 対象者

若年期：中学1年（12～13歳）、高校3年（17～18歳）の男女および青年期女性（19～29歳）のうち特定の疾患をもたない健康者1,199人を対象とした。対象者の内訳は、中学1年 男子166人 女子176人、高校3年 男子185人 女子217人、青年期女性455人である。高齢期：ビタミンK摂取量のカットオフ値の評価は、通院閉経後女性182人（平均年齢 65.5 ± 9.8 歳）を対象とした。一方、ビタミンK不足マーカーおよび臨床骨折予測因子としての血中ucOC濃度の意義に関する検討では、平均年齢 64.4 ± 9.4 歳の閉経後通院女性436人を対象とした。いずれも、ワルファリン、ビタミンK製剤、ビスフォスフォネート製剤、ステロイド、女性ホルモン、その他、骨代謝およびビタミンK栄養に関連する薬剤を服用するものは除外した。

(2) 測定項目

ビタミンK摂取量：思春期男女および高齢期女性については上西らが報告した食事摂取頻度調査票（food frequency questionnaire：FFQ）¹⁸⁾を用い、青年期女性は佐々木らが報告した食事歴法質問票（diet history questionnaire：DHQ）¹⁹⁾を用いて算出した。両法ともに過去1ヶ月間の食習慣をアンケートによって調べ、栄養素や食品群別摂取量を換算するものである。

血中 PIVKA-II 濃度：全自動電気化学発光免疫測定装置ピコルミ III [三光純薬社製]を用いて測定した。本法は、抗 PIVKA-II 抗体結合ビーズを固相とし、電気的変化で発光するルテニウム (Ru) 錯体を標識した抗プロトンビンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法による電気化学発光免疫測定法

(Electro-chemiluminescence immunoassay：ECLIA) を原理としている²⁰⁾。血中 ucOC 濃度：全自動電気化学発光免疫測定装置ピコルミ III [三光純薬社製]を用いて測定した。本法は、抗 ucOC 抗体結合ビーズを固相とし、電気的変化で発光する Ru 錯体を標識した Ru 標識抗 OC 抗体を用いたサンドイッチ法による ECLIA を原理としている²¹⁾。

血中ビタミンK濃度：LC-APCI/MS/MS法²²⁾により、閉経後高齢女性436人の血中PK濃度、メナキノン-7 (MK-7) 濃度を測定した。

(3) 統計解析

曲率解析法によるカットオフ値の算出²³⁾：ビタミンK摂取量と血中 PIVKA-II あるいは ucOC 濃度の関係を示す非線形対数回帰式を Passing & Bablock 回帰分析法により得る。ビタミンK摂取量と血中 PIVKA-II あるいは ucOC 濃度の平均 + 3SD の値をもとに、この回帰式の線上における上限値を求める。この上限値をそれぞれ100として、各変数を100分率に換算し曲率解析を行う。曲率解析とは、曲線の内側に接する円の半径を求める方法で、その円の半径が極小になる点、すなわち、ビタミンK摂取量の低下に伴って血中 ucOC 濃度が最も急激に変化する点をカットオフ値として評価した。

血中 ucOC 濃度の臨床骨折の予知における意義：曲率解析で求められたビタミンK不足を表す血中 ucOC 濃度が、臨床骨折の予知に役立つか否かを比例ハザード、生存時間解析、およびロジスティック回帰分析で評価した。

C. 結果

曲率解析法によるカットオフ値の算出：

まず、新規に開発した栄養評価法である曲率解析法の有用性を評価するにあたり、従来

ビタミン D 栄養評価に用いられていた二群間比較法との比較を行った。二群間比較法とは、各年齢・性別の対象者を VK 摂取量 100, 150, 200, 250, 300, 350 あるいは 400 $\mu\text{g}/\text{日}$ を基準値として 2 群に分け、基準値以上群と未満群の血中 ucOC 濃度を Student's t-test を用いて有意差検定し、最も差が得られる (p 値が最低か t 値の絶対値が最高) 基準値をカットオフ値として評価する方法である。この方法で ucOC を指標としたビタミン K 摂取量のカットオフ値を評価した結果、思春期男子では中学 1 年 : 300 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年 : 100 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年 : 300 $\mu\text{g}/\text{日}$ となり、女子では中学 1 年 : 250 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年 : 150 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年 : 400 $\mu\text{g}/\text{日}$ 、若年成人女性 : 300 $\mu\text{g}/\text{日}$ となった。このように、二群間比較法では、100 $\mu\text{g}/\text{日}$ ~ 400 $\mu\text{g}/\text{日}$ までの範囲で性別・年齢に無関係に大きく異なるカットオフ値が得られ、この方法はビタミン K 栄養の評価には不向きであると考えられた (詳細については平成 20 年度報告書を参照)。一方、新規に開発した曲率解析法は、前述の研究 3 の青年期女性のビタミン D 栄養評価に適用した際にも、一般的なビタミン D 不足のカットオフ値である血中 25(OH)D 濃度 20ng/mL を与え、その有用性が確認された。そこで、次にビタミン K 栄養の評価に適用した。

若年期の対象者のビタミン K 摂取量、血中 PIVKA-II 濃度および血中 ucOC 濃度を示す (表 4-1)。ビタミン K 摂取量の平均値は、全年代ともに食事摂取基準 (2010 年版) を満たしていた。血中 PIVKA-II 濃度は、高校 3 年女子で低いものの、男女ともに年齢に関係した一定の傾向はみられなかった。血中 ucOC 濃度は男女とも年齢の上昇に伴い、有意に低下した。また、男子の血中 ucOC 濃度は女子

よりも有意に高かった。血中 PIVKA-II 濃度とビタミン K 摂取量との関係を表 4-2 に示す。ビタミン K 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度は、高校 3 年生男女では有意に負相関したが、中学 1 年男女および青年期女性において有意な関係を示さなかった。表 4-1 より、この時期の血中 PIVKA-II 濃度は年齢に応じた変化がほとんどないため、男子では中学 1 年生と高校 3 年生を併せた集団、女子では中学 1 年生と高校 3 年生を併せた集団、およびそれに青年期女性を加えた集団を設定し相関関係を調べた。その結果、いずれにおいても有意な負相関関係が認められた。次に、ビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係を示す (表 4-3)。ビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度は、いずれの年齢グループにおいても有意な負相関関係を示した。ビタミン K 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度に有意な相関関係のあったグループに対して得られた回帰式を曲率解析法に適用し、血中 PIVKA-II 濃度を指標とするビタミン K 摂取量のカットオフ値を算出した (図 4-1, 表 4-4)。その結果、ビタミン K 摂取量のカットオフ値は 52~62 $\mu\text{g}/\text{day}$ となった。同様の方法で血中 ucOC 濃度を指標とするビタミン K 摂取量のカットオフ値を算出した結果、153~221 $\mu\text{g}/\text{day}$ となった (図 4-2, 表 4-5)。さらに、高齢期女性の血中 ucOC 濃度とビタミン K 摂取量について同様の検討を加えた (図 4-3, 表 4-6)。高齢期女性のビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度は有意な負相関関係を示し、この関係から求められたビタミン K 摂取量のカットオフ値は 269 $\mu\text{g}/\text{day}$ であった。

血中 ucOC 濃度の臨床骨折の予知における意義 : 対象者の背景データを表 4-7 に示す。臨床骨折患者の年齢、血中 ucOC 濃度は非骨

折者に比べて有意に高く、観察開始時の L_{2-4} BMD および血中フィロキノン (PK) 濃度は有意に低いことを確認した。次に、臨床骨折に対する独立影響因子を検討するために年齢、血中 ucOC 濃度、 L_{2-4} BMD を予測因子として重回帰分析を行った結果、血中 ucOC 濃度は臨床骨折に対する独立影響因子として検出された (表 4-8)。次に、血中ビタミン K (PK および MK-7) 濃度と血中 ucOC 濃度に有意な負の相関関係が認められたことより、両者の関係を示す回帰式をもとに曲率解析法を用いて血中 ucOC 濃度のカットオフ値を求めた結果、血中 PK 濃度、MK-7 濃度、PK + MK-7 濃度と血中 ucOC 濃度の関係から求められるビタミン K 不足を表す血中 ucOC 濃度のカットオフ値は 4.1~4.4 ng/mL と推定された (表 4-9)。この結果を考慮して、血清 ucOC 濃度 4.5 ng/mL をビタミン K 不足のカットオフ値と設定し、4.5 ng/mL 以上の H-ucOC 群とそれ以下の L-ucOC 群で臨床骨折発生率を比較した。その結果、H-ucOC 群と L-ucOC 群の骨折発生率はそれぞれ 22.9%、13.1%であり、骨折発生における H-ucOC 群の相対危険度は 1.75 (95%CI, 1.147-2.670) であった。また、H-ucOC 群の年齢は L-ucOC 群よりも有意に高いため、年齢調整後の相対危険度を算出したところ、1.74 (95%CI: 1.655-1.833) となり、やはり H-ucOC 群の骨折リスクは有意に高いことを確認した。次に、イベント発生時間を考慮し、血中 ucOC 濃度 (L 群, H 群)、年齢、腰椎骨密度、既存骨折を予測因子とした比例ハザード解析を行った結果、H-ucOC 群では有意に臨床骨折発生リスクが高まることを確認された ($p = 0.0188$)。Kaplan-Meier 生存時間解析では、Logrank 検定 ($p = 0.0033$) および Wilcoxon 検定 ($p = 0.0116$) のいずれにお

いても有意差が認められた (図 4-4)。このことから、血中 ucOC 濃度 4.5 ng/mL は比較的短期から長期に渡っての骨折発生の予測因子となりえると判断された。また、ロジスティック回帰分析を行い、集団の骨折発生率が 25%に到達すると予想される年齢を推定した結果、L-ucOC 群では 80.2 歳であるのに対して、H-ucOC 群では 69.1 歳となった。

D. 考察

対象者の平均ビタミン K 摂取量は、197~271 $\mu\text{g/day}$ であり、日本人の食事摂取基準 (2010 年版) の 60~75 $\mu\text{g/day}$ を満たしていた。ビタミン K 不足の指標となる血中 PIVKA-II 濃度を調べた結果、高校 3 年女子では低いものの、年齢による大きな差はみられなかった。

そこで、次に曲率解析法を用いて血中 PIVKA-II 濃度をビタミン K 不足指標としてカットオフ値を検討した結果、52~62 $\mu\text{g/day}$ が得られ、日本人の食事摂取基準 (2010 年版) のビタミン K 目安量よりもやや低かった。また、この値を体重換算すると、約 1 $\mu\text{g/kg/day}$ となり、Suttie らが報告した若年米国人男性の介入試験の結果¹¹⁾とほぼ一致するものであった。このことから、食事摂取基準の策定値は血液凝固に関しては十分な量であることが示唆された。一方、血中 ucOC 濃度を指標とした場合のカットオフ値は思春期で 153~188 $\mu\text{g/day}$ であり、青年期女性では 221 $\mu\text{g/day}$ とやや高い結果となった。さらに、高齢女性では 270 $\mu\text{g/day}$ とさらに高い摂取量が得られ加齢と共に骨におけるビタミン K 必要量が増す可能性が考えられた。また、これらの値は、血中 PIVKA-II 濃度を指標とするよりも高値であった。高齢者の骨

折を指標とした疫学研究から、骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン（2006 年版）では、骨粗鬆症治療のビタミン K 摂取量を 250～300 µg/day とし、また血中 ucOC 濃度を指標としたビタミン K 制限食によるビタミン K 不足からの回復には、450 µg/day 以上必要であることが報告されている²⁴⁾。Booth らは、Framingham Osteoporosis Study のコホート研究において平均 254 µg/day のビタミン K 摂取群の骨折リスクは、平均 56 µg/day のビタミン K 摂取群に比べて約 1/3 に有意に低くなることを報告しており¹³⁾、今回の高齢者のカットオフ値もこれに近似する結果となった。これらの結果は、骨に必要なビタミン K 摂取量は血液凝固に必要な量よりも多く、思春期から若年期で約 200 µg/day、高齢期では 250～300 µg/day 程度の摂取が必要であることを示唆する結果であった。一方、ビタミン K 不足を表す血中 ucOC 濃度が高齢者の臨床骨折を予測できるか否かを検討した。ビタミン K 不足を表す血中 ucOC 濃度は 4.1～4.4 ng/mL と推定されたことから、これらを含む ucOC のカットオフ値として 4.5 ng/mL と設定し、前向き研究により検討した結果、年齢補正による相対危険度、比例ハザード、生存時間解析、およびロジスティック回帰分析いずれにおいても血中 ucOC 濃度 4.5 ng/mL 以上の対象者は臨床骨折のリスクが高いことが示された。先のビタミン K 摂取量のカットオフ値を求めた高齢期女性の対象集団において、ビタミン K 摂取量のカットオフ値 270 µg/day を摂取したときの血中 ucOC 濃度を逆算したところ、4.1 ng/mL が得られ、血中濃度から推定された ucOC 濃度とほぼ一致した。これらのことから、臨床骨折予防においても 270 µg/day 以上のビタミン K

摂取量が必要であることが示唆された。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

- a. Kamao M., Tsugawa N., Suhara Y., Wada A., Mori T., Murata K., Nishino R., Ukita T., Uenishi K., Tanaka K., Okano T. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* (2007) 859, 192-200.
- b. Kamao M., Suhara Y., Tsugawa N., Uwano M., Yamaguchi N., Uenishi K., Ishida H., Sasaki S., Okano T. Vitamin K content of foods and dietary vitamin K intake in Japanese young women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2007) 53, 464-70.
- c. Tsugawa N., Shiraki M., Suhara Y., Kamao M., Ozaki R., Tanaka K., Okano T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* (2008) 26, 79-85.
- d. Nakamura K., Tsugawa N., Saito T., Ishikawa M., Tsuchiya Y., Hyodo K., Maruyama K., Oshiki R., Kobayashi R., Nashimoto M., Yoshihara A., Ozaki R., Okano T., Yamamoto M. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone* (2008) 42, 271-77.

- e. Kuwabara A., Tanaka K., Tsugawa N., Nakase H., Tsuji H., Shide K., Kamao M., Chiba T., Inagaki N., Okano T., Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporos Int* (2009) 20, 935-42.
 - f. Himeno M., Tsugawa N., Kuwabara A., Fujii M., Kawai N., Kato Y., Kihara N., Toyoda T., Kishimoto M., Ogawa Y., Kido S., Noike T., Okano T., Tanaka K. Effect of vitamin D supplementation in the institutionalized elderly. *J Bone Miner Metab* (2009) 27, 733-37.
 - g. Ohta H., Kuroda T., Onoe Y., Orito S., Ohara M., Kume M., Harada A., Tsugawa N., Okano T., Sasaki S. The impact of lifestyle factors on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a cross-sectional study in Japanese women aged 19-25 years. *J Bone Miner Metab* (2009) 27, 682-88.
 - h. Nakamura K., Saito T., Yoshihara A., Ishikawa M., Tsuchiya Y., Oshiki R., Kobayashi R., Maruyama K., Hyodo K., Nashimoto M., Tsugawa N., Okano T., Oyama M., Yamamoto M. Low calcium intake is associated with increased bone resorption in postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Public Health Nutr* (2009) 12, 2366-70.
 - i. Kuwabara A., Tsugawa N., Tanaka K., Fujii M., Kawai N., Mukae S., Kato Y., Kojima Y., Takahashi K., Omura K., Kagawa R., Inoue A., Noike T., Kido S., Okano T. Improvement of vitamin D status in Japanese institutionalized elderly by supplementation with 800 IU of vitamin D₃. *J Nutr Sci Vitaminol* (2009) 55, 453-58.
 - j. 津川尚子, 岡野登志夫. ビタミン D と骨粗鬆症. *ビタミン*(2009) 83, 651-58.
 - k. 津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 土井綾子, 小池さやか, 鎌尾まや, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫. 思春期のビタミン K 栄養評価—曲率解析法を応用した新規評価法の開発. *Osteoporosis Japan* (2010) 18, 27-31.
 - l. Komaba H., Goto S., Fujii H., Hamada Y., Kobayashi A., Shibuya K., Tominaga Y., Otsuki N., Nibu K., Nakagawa K., Tsugawa N., Okano T., Kitazawa R., Fukagawa M. Depressed expression of Klotho and FGFR1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* (2010) 77, 232-38.
 - m. Kuwabara A., Himeno M., Tsugawa N., Kamao M., Fujii M., Kawai N., Fukuda M., Ogawa Y., Kido S., Okano T., Tanaka K. Hypovitaminosis D and K are highly prevalent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly. *Asia Pac J Clin Nutr* (2010) in press.
2. 学会発表
 - a. 津川尚子, 尾崎玲央, 上西一弘, 石田裕美, 須原義智, 鎌尾まや, 岡野登志夫「思春期男女の血中 25-ヒドロキシビタミン D 濃度と副甲状腺ホルモン濃度の負相関関係における活性型ビタミン D 濃度および Ca 摂取量の関与」日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月 28 日

- b. 津川尚子, 尾崎玲央, 上西一弘, 石田裕美, 須原義智, 鎌尾まや, 岡野登志夫「思春期のビタミンD栄養に関する疫学調査研究」日本ビタミン学会第59回大会, 長崎, 2007年5月25日
- c. Okano T., Kamao M., Tsugawa N., Suhara Y., Tanaka K., Uenishi K., Ishida H. “A nutrition survey about the status of fat-soluble vitamins in Japanese women” American Society for Bone and Mineral Research 29th Annual Meeting, Hawaii, USA, 2007, 9,19.
- d. Tsugawa N, Uenishi K, Ishida H, Ozaki R, Okano T, “Effect of Plasma 1,25-Dihydroxy- vitamin D Concentration or Calcium Intake on Negative Correlation between Plasma 25-Hydroxyvitamin D and PTH Concentrations in Japanese Adolescents”, American Society for Bone and Mineral Research 29th Annual Meeting, Hawaii, USA, 2007, 9,19.
- e. 津川尚子, 鎌尾まや, 須原義智, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫, 「思春期におけるビタミンK栄養評価とビタミンK不足マーカーとしての低カルボキシル化オステオカルシンの有用性の評価」日本薬学会第128年会, 横浜, 2008年3月27日
- f. 鎌尾まや, 津川尚子, 須原義智, 岡野登志夫「日本人授乳婦を対象とした母乳中脂溶性ビタミン濃度の調査研究」日本薬学会第128年会, 横浜, 2008年3月27日,
- g. 津川尚子, 佐々木敏, 鎌尾まや, 村上健太郎, 高橋佳子, 上西一弘, 山崎美津代, 早渕仁美, 合田敏尚, 岡純, 馬場啓子, 大木和子, 渡邊令子¹, 杉山佳子, 岡野登志夫「女子大学生におけるビタミンD栄養の評価」第60回関西カルシウム懇話会, 大阪, 2008年4月5日
- h. 津川尚子, 佐々木敏, 鎌尾まや, 村上健太郎, 高橋佳子, 上西一弘, 山崎美津代, 早渕仁美, 合田敏尚, 岡純, 馬場啓子, 大木和子, 渡邊令子, 杉山佳子, 岡野登志夫「血中 25OHD 濃度および PTH 濃度を指標とした女子大学生のビタミンD栄養の評価」日本ビタミン学会第60回大会, 仙台, 2008年6月14日
- i. 津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 小池さやか, 土井綾子, 鎌尾まや, 須原義智, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「微分解析法を用いたビタミンD必要量の評価」第10回日本骨粗鬆症学会, 大阪, 2008年10月31日
- j. 津川尚子, 小池さやか, 土井綾子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 鎌尾まや, 須原義智, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「曲率解析法を用いた新規ビタミン K 栄養評価法の開発」日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月26日
- k. 出野奈穂子, 津川尚子, 鎌尾まや, 岡野登志夫, 佐々木敏, 村上健太郎, 高橋佳子, 上西一弘, 山崎美津代, 早渕仁美, 合田敏尚, 岡純, 馬場啓子, 大木和子, 渡邊令子, 杉山佳子, 「女子大学生におけるビタミンE栄養の評価」日本薬学会第129年会, 京都, 2009年3月28日
- l. 津川尚子, 小池さやか, 土井綾子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 鎌尾まや, 須原義智, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「曲率解析法を応用したビタミン K 栄養の評価法の開発」日本ビタミン学会第61回大会, 京都, 2009年5月30日

- m. Tsugawa N., Takase T., Minekami T., Uenishi K., Ishida H., Kamao M., Suhara Y., Okano T. A novel evaluation method for vitamin K status in adolescents. The 31th Annual meeting of American Society for bone and mineral research, Denver, 2009 年 9 月 12 日
- n. 津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 土井綾子, 小池さやか, 鎌尾まや, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「思春期のビタミン K 栄養評価～曲率解析法を応用した新規評価法の開発～」第 11 回日本骨粗鬆症学会, 名古屋, 2009 年 10 月 14 日
- o. 桑原晶子, 津川尚子, 藤井美野里, 河合信子, 迎 幸子, 加藤譲, 小島康子, 高橋香, 小村一誠, 加川鈴子, 井上章, 野池利彰, 木戸詔子, 田中清, 岡野登志夫「日本人施設入居高齢者におけるビタミン D₃ 介入試験」第 11 回日本骨粗鬆症学会, 名古屋, 2009 年 10 月 14 日
- p. 津川尚子, 白木正孝, 鎌尾まや, 須原義智, 岡野登志夫「臨床骨折予測因子としての血清中低カルボキシル化オステオカルシンの有用性の評価」第 11 回日本骨粗鬆症学会, 名古屋, 2009 年 10 月 16 日
- q. 峯上卓也, 津川尚子, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「曲率解析法を用いた新規栄養評価法の開発と応用～血液凝固及び骨形成におけるビタミン K 必要量の比較～」第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年 10 月 24 日
- r. 高瀬友貴, 津川尚子, 岡野登志夫「血管石灰化に関与する低カルボキシル化マトリックスグラタンパク質の血中濃度測定法の開発とビタミン K 栄養評価への応用」第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大

会, 大阪, 2009 年 10 月 24 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

H. 参考文献

1. 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.
2. 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, 457-63.
3. Booth S.J., Golly I., Satchek J.M., Roubenoff R., Dallal G.E., Hamada K., Blumberg J.B. Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status. *Am J Clin Nutr* (2004) 80, 143-48.
4. 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, 41-48.
5. Harinarayan C.V., Ramalakshmi T., Prasad U.V., Sudhakar D., Srinivasarao P.V., Sarma K.V., Kumar E.G. High prevalence of low dietary calcium, high phytate consumption, and vitamin D deficiency in healthy south Indians. *Am J Clin Nutr* (2007) 85, 1062-67.
6. Outila T.A., Kärkkäinen M.U., Lamberg-Allardt C.J. Vitamin D status

- affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density. *Am J Clin Nutr* (2001) 74, 206-10.
7. Guillemant J., Taupin P., Le H.T., Taright N., Allemandou A., Pérès G., Guillemant S. Vitamin D status during puberty in French healthy male adolescents. *Osteoporos Int* (1999) 10, 222-25.
 8. Nakamura K., Tsugawa N., Saito T., Ishikawa M., Tsuchiya Y., Hyodo K., Maruyama K., Oshiki R., Kobayashi R., Nashimoto M., Yoshihara A., Ozaki R., Okano T., Yamamoto M. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone* (2008) 42, 271-77.
 9. Nakamura K., Nashimoto M., Tsuchiya Y., Obata A., Miyanishi K., Yamamoto M. Vitamin D insufficiency in Japanese female college students: a preliminary report. *Int J Vitam Nutr Res* (2001) 71, 302-05.
 10. Bischoff-Ferrari H.A., Kiel D.P., Dawson-Hughes B., Orav J.E., Li R., Spiegelman D., Dietrich T., Willett W.C. Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults. *J Bone Miner Res* (2009) 24, 935-42.
 11. Suttie J.W., Mumma-Schendel L.L., Shah D.V., Lyle B.J., Greger J.L. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am J Clin Nutr* (1988) 47, 475-80.
 12. Feskanich D., Weber P., Willett W.C., Rockett H., Booth S.L., Colditz G.A. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* (1999) 69, 74-79.
 13. Booth S.L., Tucker K.L., Chen H., Hannan M.T., Gagnon D.R., Cupples L.A., Wilson P.W., Ordovas J., Schaefer E.J., Dawson-Hughes B., Kiel D.P. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* (2000) 71, 1201-08.
 14. Tsugawa N., Shiraki M., Suhara Y., Kamao M., Ozaki R., Tanaka K., Okano T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* (2008) 26, 79-85.
 15. Binkley N.C., Krueger D.C., Kawahara T.N., Engelke J.A., Chappell R.J., Suttie J.W. A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr* (2002) 76, 1055-60.
 16. Jesudason D., Need A.G., Horowitz M., O'Loughlin P.D., Morris H.A., Nordin B.E. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Bone* (2008) 31, 626-30.
 17. 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, 380-86.
18. Uenishi K., Ishida H., Nakamura K.,
Development of a simple food frequency
questionnaire to estimate intakes of calcium
and other nutrients for the prevention and
management of osteoporosis. *J Nutr Sci*
Vitaminol, (2008) 54, 25-29.
19. Murakami K., Sasaki S., Takahashi Y.,
Okuda H., Hirota N., Notsu A., Fukui M.,
Date C. Association between dietary
acid-base load and cardiometabolic risk
factors in young Japanese women. *Br J Nutr*
(2008) 99, 639-48.
20. 高津和子, 中西敏己, 渡辺啓祐, 奥田
博明, 斉藤 聡, 田中正俊, 赤羽賢浩, 林
直諒, 熊田博光, 谷川久一, 河合 忠, 鈴
木 宏, *臨牀と研究*, (1996) 73, 224-32.
21. 西村 順, 荒井紀光, 藤松順一, *医学と
薬学* (2007) 57, 523-35.
22. 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.
23. 津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 土井綾
子, 小池さやか, 鎌尾まや, 上西一弘, 石
田裕美, 岡野登志夫, 思春期のビタミン
K 栄養評価—曲率解析法を応用した新規
評価法の開発. *Osteoporosis Japan* (2010)
18, 27-31.
24. Booth S.L., Martini L., Peterson J.W.,
Saltzman E., Dallal G.E., Wood R.J. Dietary
phylloquinone depletion and repletion in
older women. *J Nutr* (2003) 133, 2565-69.

表 1-1. 各脂溶性ビタミンの母乳中濃度¹

出産後日数		全対象者 (n = 82)	0-10 (n = 8)	11-30 (n = 43)	31-90 (n = 18)	91-180 (n = 8)	181-270 (n = 5)
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
年齢	(y)	30.8±4.5	27.6±6.3 ^a	32.0±3.6 ^a	30.3±4.5 ^a	30.4±5.6 ^a	28.6±4.3 ^a
Retinol	(μg/mL)	0.455±0.264	1.026±0.398 ^a	0.418±0.138 ^b	0.384±0.145 ^b	0.359±0.219 ^b	0.267±0.117 ^b
β-carotene	(μg/mL)	0.062±0.063	0.188±0.112 ^a	0.059±0.037 ^b	0.033±0.023 ^b	0.033±0.031 ^b	0.043±0.048 ^b
D ₃	(ng/mL)	0.088±0.128	0.075±0.046 ^a	0.103±0.169 ^a	0.079±0.056 ^a	0.075±0.079 ^a	0.035±0.016 ^a
D ₂	(ng/mL)	0.078±0.156	0.129±0.076 ^a	0.073±0.199 ^a	0.066±0.084 ^a	0.014±0.005 ^a	0.181±0.099 ^a
25(OH)D ₃	(ng/mL)	0.081±0.037	0.072±0.047 ^a	0.085±0.038 ^a	0.084±0.034 ^a	0.068±0.037 ^a	0.073±0.041 ^a
25(OH)D ₂	(ng/mL)	0.003±0.002	0.007±0.003 ^a	0.003±0.002 ^b	0.003±0.002 ^b	0.003±0.003 ^b	0.003±0.001 ^b
α-Tocopherol	(μg/mL)	5.087±5.042	16.590±9.635 ^a	4.079±1.795 ^b	3.911±1.798 ^b	3.296±1.962 ^b	2.454±1.045 ^b
PK	(ng/mL)	3.771±2.166	5.122±2.561 ^a	3.938±2.450 ^a	3.528±1.454 ^a	2.294±1.220 ^a	3.409±1.462 ^a
MK-4	(ng/mL)	1.795±0.732	2.561±1.207 ^a	1.802±0.664 ^b	1.785±0.553 ^{ab}	1.195±0.343 ^{ab}	1.510±0.419 ^b
MK-7	(ng/mL)	1.540±2.298	3.044±2.901 ^a	1.675±2.732 ^a	0.798±0.746 ^a	1.363±1.292 ^a	0.917±0.916 ^a
Fat ²	(mg/mL)	28.89±11.65	24.92±11.55 ^a	32.64±11.52 ^a	30.24±7.91 ^a	21.39±14.12 ^a	20.72±10.08 ^a

¹ 同列において異なる上付き文字を付された平均値は、有意差を示す (Tukey-Kramer HSD 検定, $p < 0.05$).

² Röse-Gotlieb 法により測定した.

表 1-2. 母乳中脂溶性ビタミン濃度と他の関連因子および各脂溶性ビタミン濃度間の関係¹

	Retinol		β -carotene		D ₃		D ₂		25(OH)D ₃	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
年齢	-0.1528	0.1706	-0.0996	0.3735	0.2188	0.0483	0.1941	0.0806	0.2004	0.0710
出産後日数	-0.3472	0.0014	-0.2530	0.0218	-0.1187	0.2881	0.0745	0.5058	-0.1021	0.3615
Retinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -carotene	0.7588	<.0001	-	-	-	-	-	-	-	-
D ₃	0.0294	0.7931	0.0349	0.7554	-	-	-	-	-	-
D ₂	-0.0017	0.9879	0.0602	0.5908	0.7984	<.0001	-	-	-	-
25(OH)D ₃	0.0548	0.6248	0.2208	0.0462	0.1490	0.1815	-0.0967	0.3875	-	-
25(OH)D ₂	0.2794	0.0110	0.4132	0.0001	-0.0889	0.4269	-0.0824	0.4617	0.2748	0.0125
α -Tocopherol	0.7957	<.0001	0.7702	<.0001	0.0659	0.5562	0.0401	0.7205	0.1146	0.3054
PK	0.4081	0.0001	0.4711	<.0001	0.0273	0.8075	-0.0218	0.8458	0.3324	0.0023
MK-4	0.5541	<.0001	0.5142	<.0001	0.2725	0.0132	0.1882	0.0905	0.2022	0.0685
MK-7	0.3264	0.0028	0.4773	<.0001	-0.0463	0.6795	-0.0039	0.9725	0.1025	0.3596
Fat	0.1442	0.2481	0.0929	0.4583	0.0840	0.5027	-0.1460	0.2422	0.4596	0.0001

	25(OH)D ₂		α -Tocopherol		PK		MK-4		MK-7	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
年齢	-0.2127	0.0550	-0.1433	0.1990	0.0599	0.5927	-0.0196	0.8615	-0.0700	0.5320
出産後日数	-0.0462	0.6806	-0.2819	0.0103	-0.1803	0.1051	-0.2853	0.0094	-0.1110	0.3210
α -Tocopherol	0.3989	0.0002	-	-	-	-	-	-	-	-
PK	0.2838	0.0098	0.5050	<.0001	-	-	-	-	-	-
MK-4	0.2059	0.0634	0.6545	<.0001	0.5751	<.0001	-	-	-	-
MK-7	0.1338	0.2307	0.4036	0.0002	0.3722	0.0006	0.2460	0.0259	-	-
Fat	0.1565	0.2095	0.2638	0.0323	0.5514	<.0001	0.5095	<.0001	0.0870	0.4873

¹ 太字は有意($p < 0.05$)であることを示す.

表 1-3. 食品中ビタミン K 類縁体含量¹

食品	PK ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	MK-4 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	MK-7 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
穀類			
こめ, 水稻穀粒, 玄米	0.3 ± 0.0	N.D.	N.D.
こめ, 水稻穀粒, 精白米	0.1 ± 0.0	N.D.	N.D.
こめ, 水稻めし, 玄米	0.2 ± 0.0	N.D.	N.D.
こめ, 水稻めし, 精白米	0.01 ± 0.0	N.D.	N.D.
豆類			
木綿豆腐	12 ± 3	0.04 ± 0.1	N.D.
絹ごし豆腐	12 ± 3	0.01 ± 0.0	N.D.
油揚げ	62 ± 40	N.D.	N.D.
糸引き納豆	45 ± 20	2 ± 3	939 ± 753
挽き割り納豆	23 ± 2	N.D.	827 ± 194
黒豆納豆	50 ± 45	N.D.	796 ± 93
野菜類			
さやいんげん, 生	57 ± 14	N.D.	N.D.
さやえんどう, 生	49 ± 3	N.D.	N.D.
キャベツ, 生	127 ± 20	1 ± 1	N.D.
キャベツ, ゆで	180 ± 20	0.4 ± 0.0	N.D.
きゅうり, 生	64 ± 18	1 ± 1	N.D.
小松菜, 生	319 ± 64	N.D.	N.D.
小松菜, ゆで	425 ± 107	N.D.	N.D.
しそ, 生	1007 ± 123	N.D.	N.D.
しゅんぎく, 生	230 ± 39	N.D.	N.D.
しゅんぎく, ゆで	627 ± 86	3 ± 3	N.D.
ブロッコリー, 生	307 ± 121	N.D.	N.D.
ブロッコリー, ゆで	280 ± 100	N.D.	N.D.
ほうれん草, 生	498 ± 155	N.D.	N.D.
ほうれん草, ゆで	525 ± 72	N.D.	N.D.
ブラックマッペもやし, 生	20 ± 5	0.6 ± 0.1	N.D.
ブラックマッペもやし, ゆで	22 ± 6	0.4 ± 0.2	N.D.
レタス, 生	78 ± 17	N.D.	N.D.
サニーレタス, 生	166 ± 8	N.D.	N.D.
藻類			
やきのり, 乾燥	413 ± 78	N.D.	N.D.
ひじき, 乾燥	175 ± 38	N.D.	N.D.
カットわかめ, 乾燥	1293 ± 231	N.D.	N.D.
魚介類			
まあじ, 生	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1	N.D.
まさば, 生	1 ± 1	1 ± 0.2	N.D.
肉類			
牛かたロース (脂身つき), 生	0.6 ± 0.1	15 ± 7	N.D.
豚もも (脂身つき), 生	N.D.	6 ± 2	N.D.
鶏もも肉 (皮なし), 生	N.D.	27 ± 15	N.D.
卵類			
鶏卵, 全卵, 生	0.6 ± 0.3	7 ± 3	N.D.
鶏卵, 卵白, 生	N.D.	1 ± 1	N.D.
鶏卵, 卵黄, 生	7 ± 3	64 ± 31	N.D.
乳製品			
普通牛乳	1 ± 0.4	2 ± 0.3	N.D.
クリーム, 乳脂肪	1 ± 1	8 ± 3	N.D.
ヨーグルト, 全脂無糖	0.3 ± 0.2	1 ± 0.1	0.1 ± 0.2
プロセスチーズ	2 ± 1	5 ± 2	0.3 ± 0.1

次頁に続く

食品	PK ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	MK-4 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	MK-7 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
油脂類			
オリーブ油	63 ± 11	0.4 ± 0.1	N.D.
大豆油	234 ± 48	N.D.	N.D.
調合油	164 ± 97	N.D.	1 ± 1
菜種油	92 ± 25	N.D.	3 ± 2
牛脂	1 ± 0.3	4 ± 1	N.D.
有塩バター	2 ± 1	21 ± 7	N.D.
マーガリン	67 ± 68	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.1
嗜好飲料類			
抹茶	3049 ± 195	N.D.	N.D.
せん茶，茶葉	1876 ± 118	N.D.	N.D.
せん茶，浸出液	0.1 ± 0.1	N.D.	N.D.
紅茶，茶葉	1036 ± 91	N.D.	N.D.
紅茶，浸出液	0.1 ± 0.0	N.D.	N.D.
調味料・香辛料			
マヨネーズ（全卵型）	197 ± 17	17 ± 14	N.D.
マヨネーズ（卵黄型）	189 ± 19	38 ± 32	N.D.
カレー粉	93 ± 23	1 ± 2	6 ± 3

¹ 数値は平均±標準誤差，n = 3. N.D. : 検出限界以下.

表 3-1. 対象者背景

N	324
Age (y)	15.1 $\pm$ 2.0
Body height (cm)	160.5 $\pm$ 9.2
Body weight (kg)	53.1 $\pm$ 10.9
BMI	20.5 $\pm$ 2.9
25(OH)D (ng/mL)	26.1 $\pm$ 7.1
Intact PTH (pg/mL)	40.7 $\pm$ 16.9
Vitamin D intake (μ g/d)	10.4 $\pm$ 2.7
Ca intake (mg/d)	586.1 $\pm$ 272.1

表 3-2. 血中 PTH 濃度に影響する因子の単回帰分析

Parameters	Estimates	p	r ²
PTH vs			
25(OH)D (ng/mL)	-0.637	<0.001	0.072
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0.265	<0.001	0.132
Ca intake (mg/d)	-0.013	<0.001	0.046
Vitamin D intake (μ g/d)	-0.381	0.268	0.004
Log PTH vs			
Log 25(OH)D (ng/mL)	-0.351	<0.001	0.062
Log 1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0.362	<0.001	0.135
Log Ca intake	-0.169	<0.001	0.044
Log Vitamin D intake (μ g/d)	-0.072	0.364	0.003

表 3-3. 血中 PTH 濃度に影響する因子のステップワイズ重回帰分析

Patameters	Estimates	p	r ²
PTH (pg/mL) vs			
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0.268	<0.001	0.132
Ca intake (mg/d)	-0.013	<0.001	0.061
25(OH)D (ng/mL)	-0.490	<0.001	0.041
Log PTH (pg/mL) vs			
Log 1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	0.369	<0.001	0.135
Log Ca intake (mg/d)	-0.173	<0.001	0.062
Log 25(OH)D (ng/mL)	-0.249	<0.001	0.030

表 3-3. 若年期女性の体格と栄養摂取量

(n=296)			
パラメーター	平均±標準偏差	最小値-最大値	日本人の平均値(身体計測値)あるいは食事摂取基準値 ¹⁶⁾ (栄養素)
年齢	21.2 ± 2.3	19.0 - 29.0	
身長 (cm)	158.8 ± 4.9	144.6 - 173.7	158.9*
体重 (kg)	53.8 ± 7.4	37.6 - 81.5	51.1*
BMI (kg/m ²)	21.3 ± 2.7	15.2 - 31.2	20.7*
エネルギー (kcal/day)	1868.3 ± 571.4	685.9 - 4176.1	1950
蛋白質 (g/day)	62.4 ± 22.8	19.1 - 180.8	50
脂質 (g/day)	61.0 ± 26.1	9.7 - 174.7	—
炭水化物 (g/day)	252.7 ± 73.4	110.5 - 689.1	—
ビタミンD (μg/day)	12.4 ± 8.1	0.5 - 57.3	5.5(目安量) 50(上限量)
リン (mg/day)	964.6 ± 365.9	275.7 - 2862.9	900(目安量) 3000(上限量)
Ca (mg/day)	524.1 ± 248.5	95.1 - 1865.3	650(推奨量) 2300(上限量)
マグネシウム (mg/day)	242.2 ± 95.0	70.0 - 759.8	270(推奨量)

* 平成18年国民健康・栄養調査¹⁴⁾における21歳女性の平均値

Body mass index :BMI

表 4-1. 若年期男女のビタミン K 摂取量, 血中 PIVKA-II 濃度および血中 ucOC 濃度

パラメータ	中1 (12~13歳)	高3 (17~18歳)	青年期 (19~29歳)	p
n	166【80】	185【80】		
男子 ビタミンK摂取量 (μg/day)	213 ± 122 [70]	197 ± 129 [75-80]		0.238
男子 血中PIVKA-II濃度 (mAU/mL)	28.7 ± 6.4	27.8 ± 8.5 ***		0.463
血中ucOC濃度 (ng/mL)	40.4 ± 22.4 ***	12.2 ± 7.0 ***		<0.001
n	176【80】	217【80】	455【80】	
女子 ビタミンK摂取量 (μg/day)	229 ± 145 [65]	210 ± 128 [60]	271 ± 178 [60]	<0.001
女子 血中PIVKA-II濃度 (mAU/mL)	28.4 ± 13.3	22.0 ± 5.9	26.2 ± 9.8	<0.001
血中ucOC濃度 (ng/mL)	27.5 ± 17.0	6.5 ± 3.5	4.5 ± 2.5	<0.001

(mean ± SD)
【 】内は血中PIVKA-II濃度測定者数
[]内は2010年版食事摂取基準におけるビタミンK目安量
Student's t-test ***p<0.001(男女比較)

表 4-2. 若年期男女のビタミン K 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度の関係

		n	r	p	回帰式
男子	中1	80	-0.157	0.165	-
	高3	78	-0.313	0.005	$\log y = 3.79 - 0.10 \log x$
	中1+高3	158	-0.240	0.002	$\log y = 3.67 - 0.07 \log x$
女子	中1	80	-0.157	0.164	-
	高3	80	-0.273	0.014	$\log y = 3.47 - 0.08 \log x$
	青年期	80	-0.155	0.169	-
	中1+高3	160	-0.164	0.038	$\log y = 3.50 - 0.07 \log x$
	中1+高3+ 青年期	240	-0.158	0.014	$\log y = 3.49 - 0.06 \log x$

x : ビタミンK摂取量 (μg/day)
y : 血中PIVKA-II濃度 (mAU/mL)

表 4-3. 若年期男女のビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係

		n	r	p	回帰式
男子	中1	166	-0.248	0.001	$\log y = 4.57 - 0.20 \log x$
	高3	175	-0.196	0.009	$\log y = 3.21 - 0.16 \log x$
女子	中1	175	-0.159	0.036	$\log y = 3.87 - 0.14 \log x$
	高3	215	-0.198	0.004	$\log y = 2.53 - 0.15 \log x$
	青年期	455	-0.159	0.005	$\log y = 2.73 - 0.25 \log x$

x : ビタミンK摂取量 (μg/day)
y : 血中ucOC濃度 (ng/mL)

表 4-4. 血中 PIVKA-II 濃度を指標に算出したビタミン K 摂取量のカットオフ値

		ビタミンK摂取量 (μg/day)				血中PIVKA-II濃度 (mAU/mL)			ビタミンK摂取量 カットオフ値	
		n	mean	± SD	上限値	mean	± SD	上限値	%	μg/day
男子	高3	78	213	± 173	733	27.6	± 8.3	52.5	8.5	62
	中1+高3	158	211	± 161	694	28.2	± 7.4	50.4	7.5	52
女子	高3	80	199	± 146	637	22.0	± 5.9	39.6	8.5	54
	中1+高3	160	209	± 162	694	25.2	± 10.7	57.5	7.5	52
	中1+高3+ 青年期	240	222	± 187	783	25.5	± 10.4	56.8	6.8	53

表 4-5. 血中 ucOC 濃度を指標に算出したビタミン K 摂取量のカットオフ値

		ビタミンK摂取量 (μg/day)				血中ucOC濃度 (ng/mL)			ビタミンK摂取量 カットオフ値	
		n	mean	± SD	上限値	mean	± SD	上限値	%	μg/day
男子	中1	166	213	± 122	579	40.4	± 22.4	107.7	29.1	169
	高3	175	206	± 125	580	12.4	± 7.0	33.5	26.3	153
女子	中1	175	230	± 144	663	27.6	± 17.0	78.7	28.4	188
	高3	215	212	± 127	594	6.6	± 3.5	17.1	27.3	162
	青年期	455	271	± 178	804	4.5	± 2.5	12.1	27.4	221

表 4-6. 血中 ucOC 濃度を指標に算出したビタミン K 摂取量のカットオフ値

ビタミンK摂取量			血中ucOC濃度		ビタミンK摂取量 カットオフ値	
mean ± SD	上限値		mean ± SD	上限値	%	μ g/day
305 ± 147	747		5.0 ± 3.8	16.3	36.0	269

表 4-7. 臨床骨折患者と非骨折者の背景

	Clinical Fr	No Fr	p value
N	75	361	
Age (yrs)	68.6 ± 9.6	63.5 ± 9.1	<0.001
BMI	22.8 ± 2.8	23.0 ± 3.0	0.607
L ₂₋₄ BMD (g/cm ²)	0.937 ± 0.184	1.002 ± 0.181	0.005
L ₂₋₄ BMD Z-score	0.261 ± 1.395	0.427 ± 1.441	0.367
ucOC (ng/mL)	5.9 ± 4.1	4.6 ± 3.2	0.003
PK (ng/mL)	1.1 ± 0.8 (n=36)	1.7 ± 1.3 (n=154)	0.010
MK-7 (ng/mL)	5.5 ± 9.6 (n=36)	7.4 ± 11.4 (n=154)	0.359

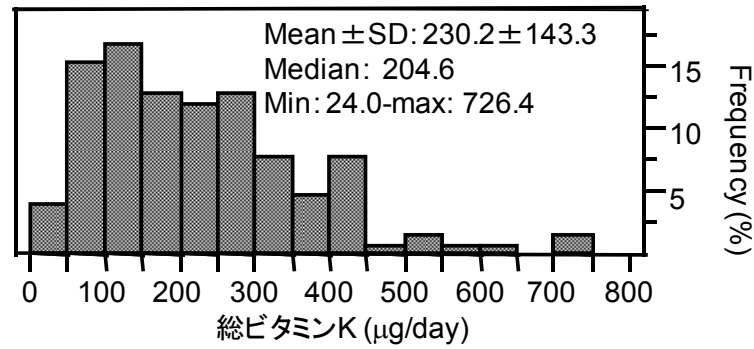
表 4-8. 臨床骨折に対する独立影響因子の検討（重回帰分析）

	E	R ²	p value
Age (yrs)	0.0468	0.046	0.003
ucOC (ng/mL)	0.0735	0.010	0.034
L ₂₋₄ BMD (g/cm ²)	-1.2137	0.007	0.118

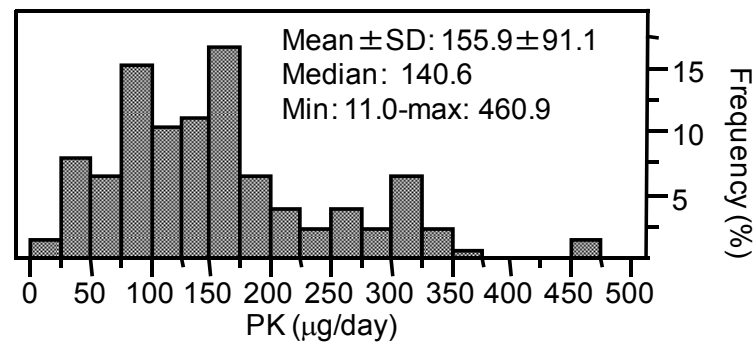
表 4-9. 曲率解析法により推定された骨におけるビタミン K 不足を表す
ucOC 濃度カットオフ値

解析パラメーター	血中ucOC濃度 カットオフ推定値
ucOC濃度, PK濃度	4.4 ng/mL
ucOC濃度, MK-7濃度	4.1 ng/mL
ucOC濃度, PK + MK-7濃度	4.1 ng/mL

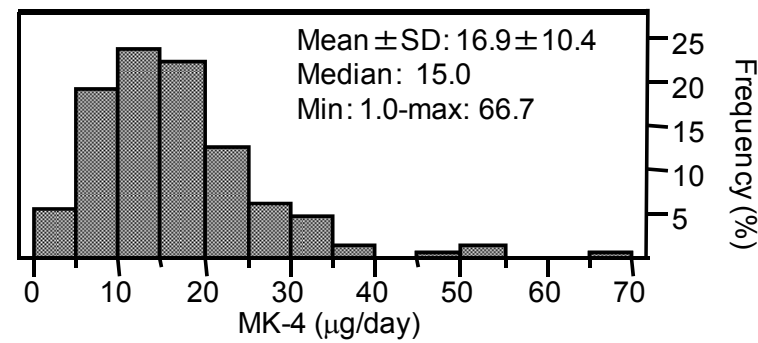
(A) 総ビタミンK



(B) PK



(C) MK-4



(D) MK-7

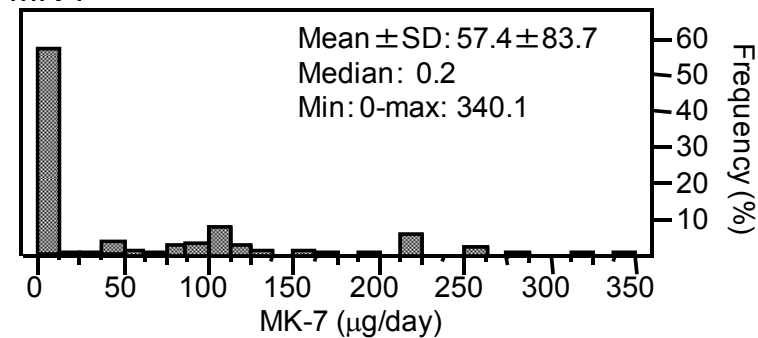
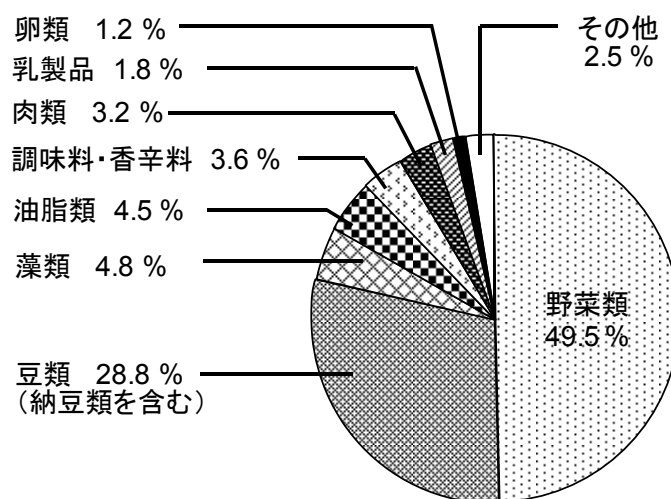
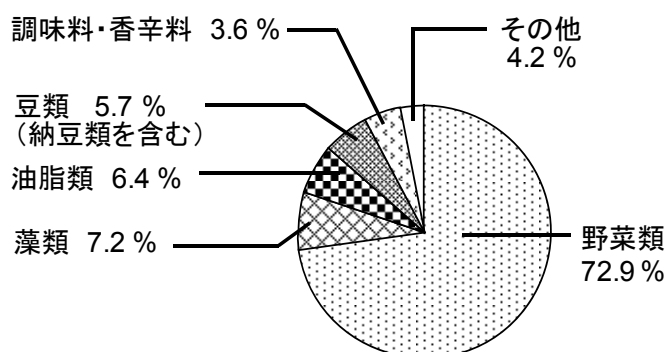


図 2-1. 女子大生におけるビタミンK類縁体摂取量の分布

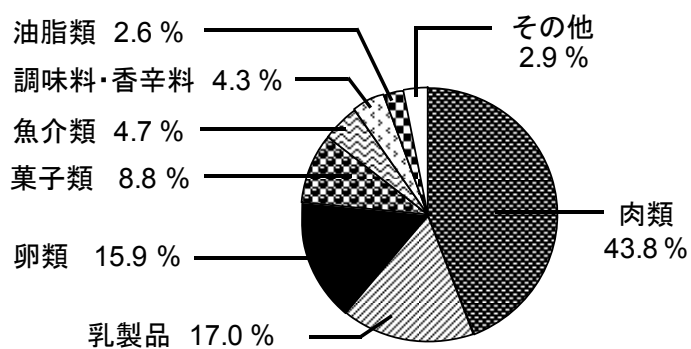
(A) 総ビタミンK



(B) PK



(C) MK-4



(D) MK-7

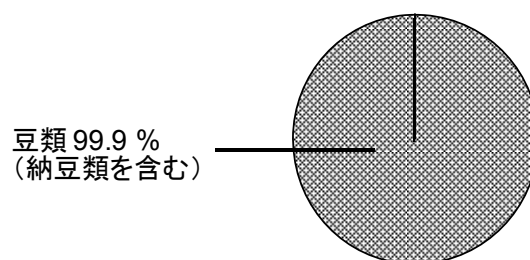


図 2-2. 各食品群のビタミン K 摂取量に占める割合

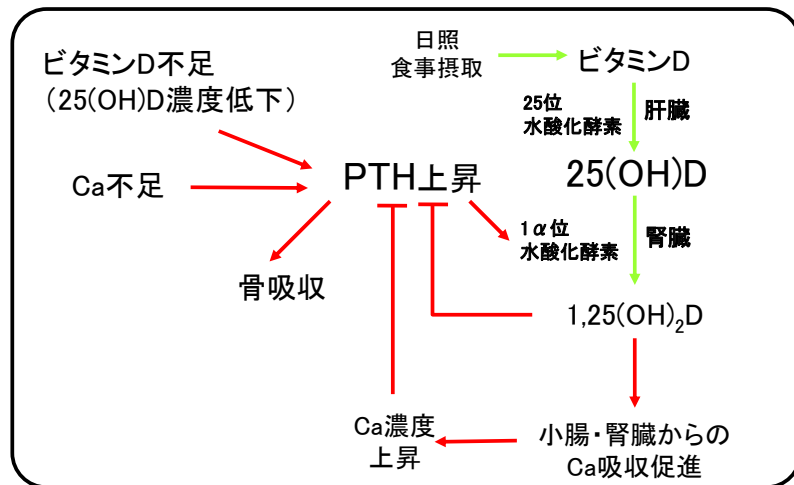


図 3-1. ビタミン D 代謝と関連因子

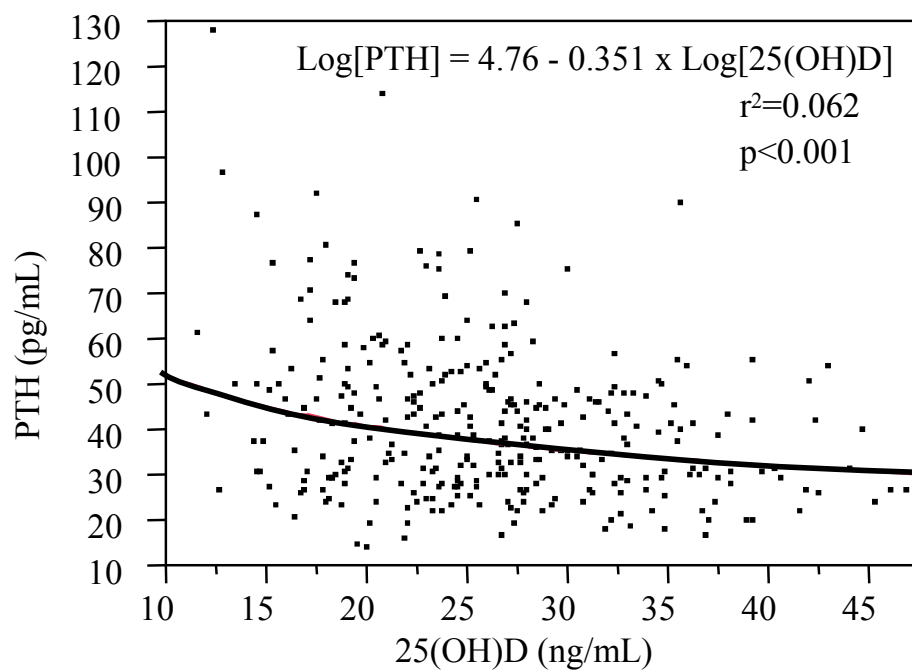


図 3-2. 血中 25(OH)D 濃度と血中 PTH 濃度の関係

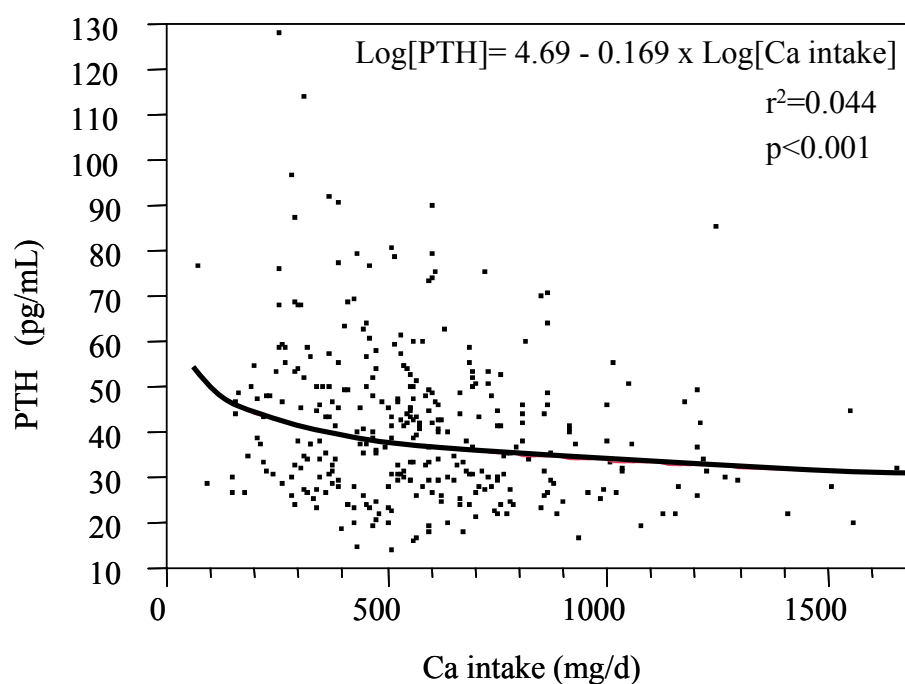


図 3-3. Ca 摂取量と血中 PTH 濃度の関係

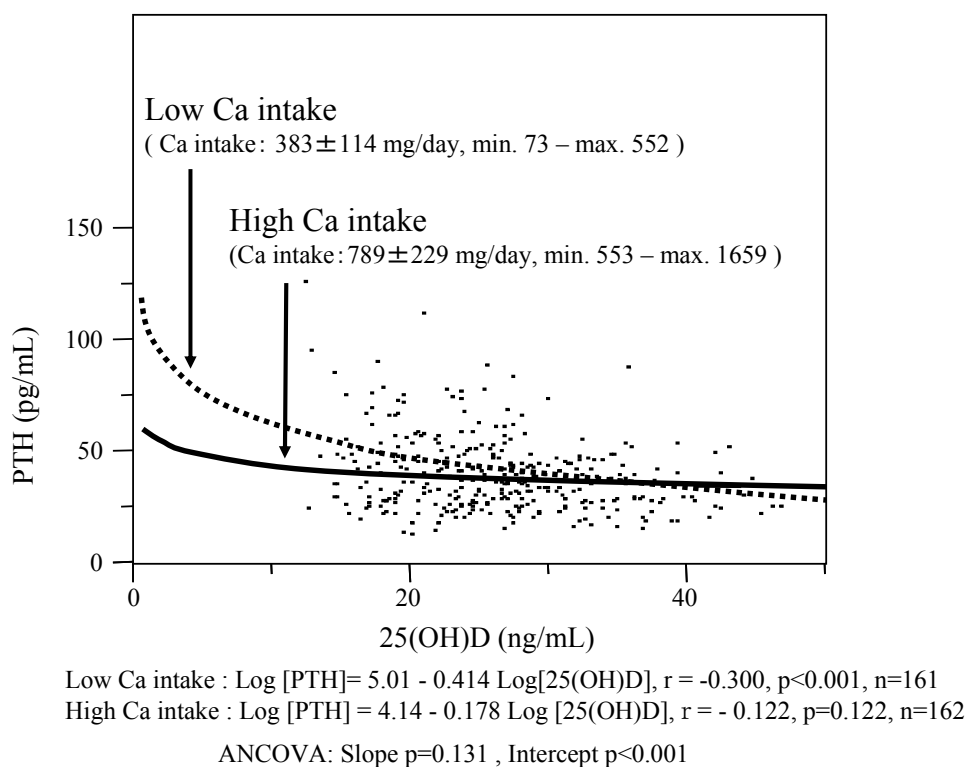


図 3-4. Ca 摂取量の中央値 (553 mg/day) で分類した 2 群の
25(OH)D 濃度と PTH 濃度の関係

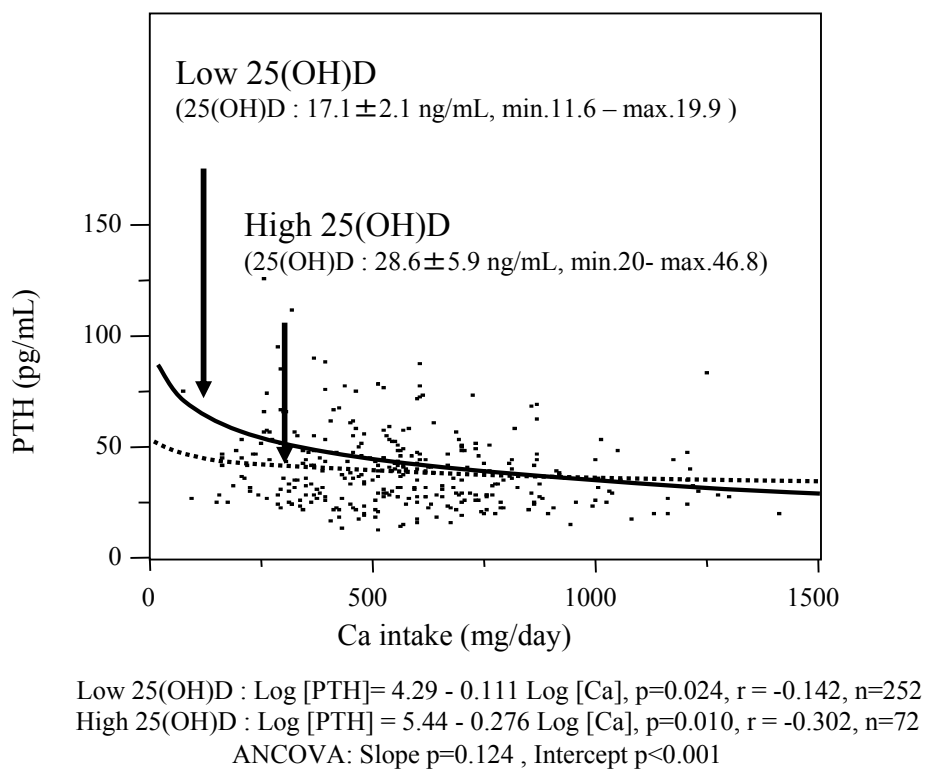


図 3-5. 25(OH)D 濃度 20 ng/mL で分類した 2 群の Ca 摂取量と PTH 濃度の関係

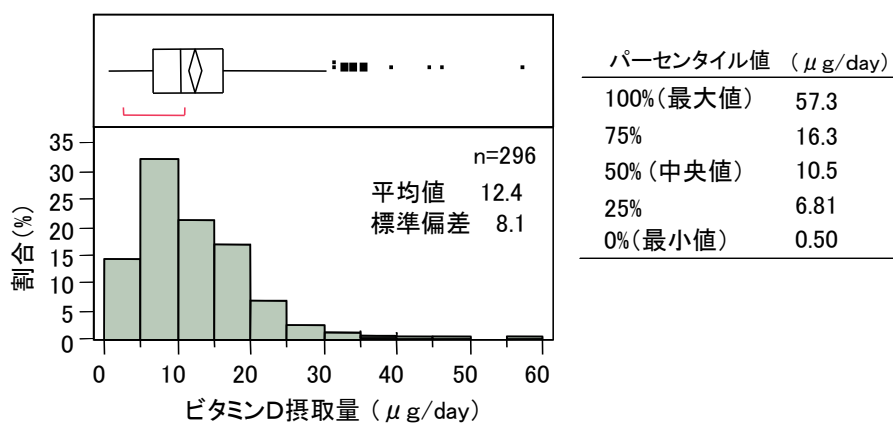


図 3-6. 若年期女性のビタミン D 摂取量の分布

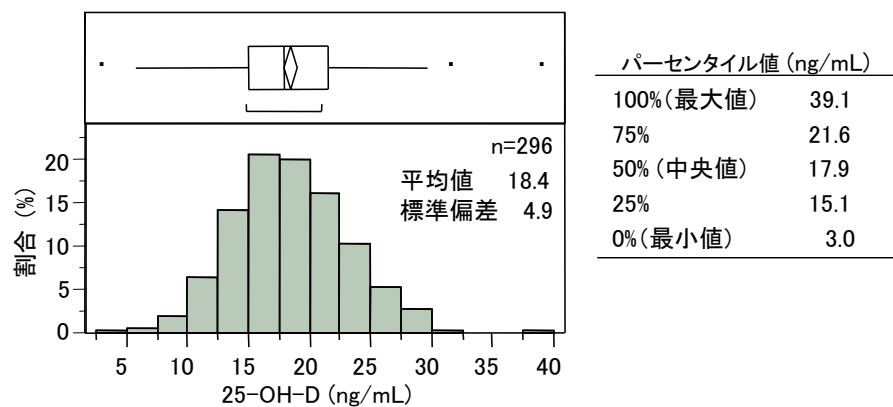
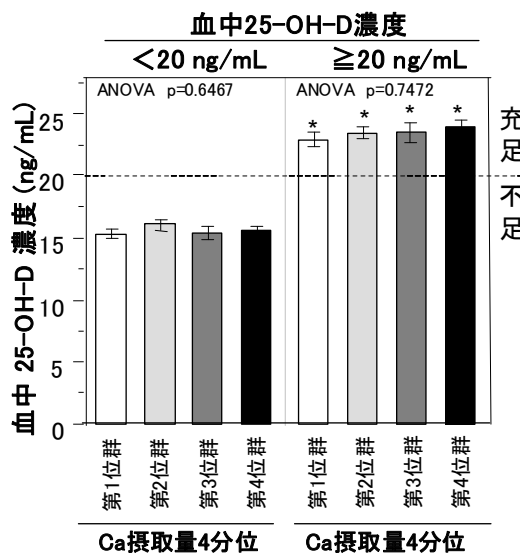


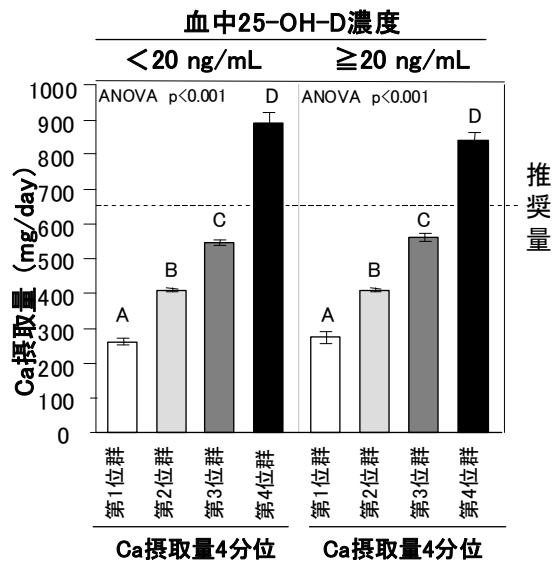
図 3-7. 若年期女性の血中 25(OH)D 濃度の分布

<血中25- OH- D濃度>



* 各Ca摂取量4分位群における、<20 ng/mL群と≥20 ng/mL群間の有意差 (Student's t-test: p<0.001)

<Ca摂取量>



A~D: 同じ文字でつながっていない水準間に有意差あり (Tukey-Kramer HSD-test: p<0.001)

図 3-8. 血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量で分類した 8 群の血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量

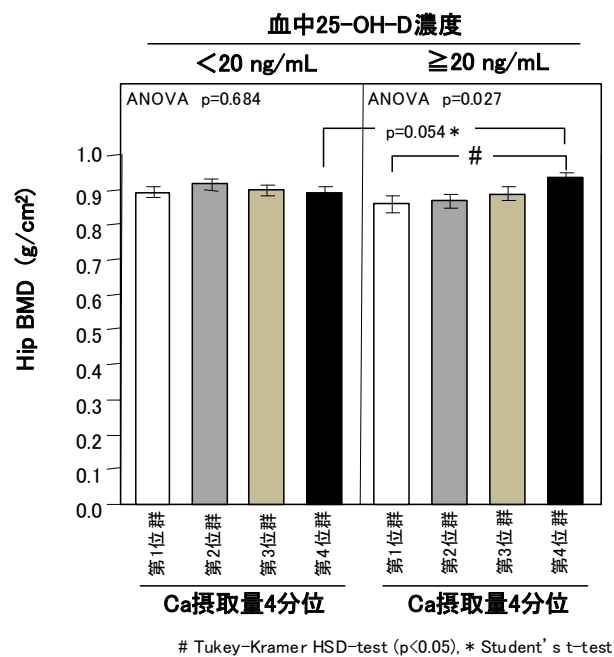


図 3-9. 血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量で分類した群における Hip BMD

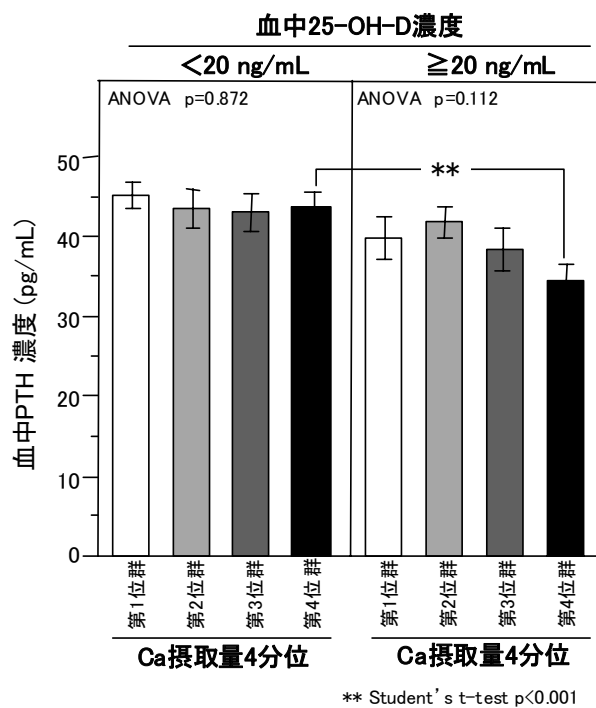


図 3-10. 血中 25(OH)D 濃度と Ca 摂取量で分類した群における血中 PTH 濃度

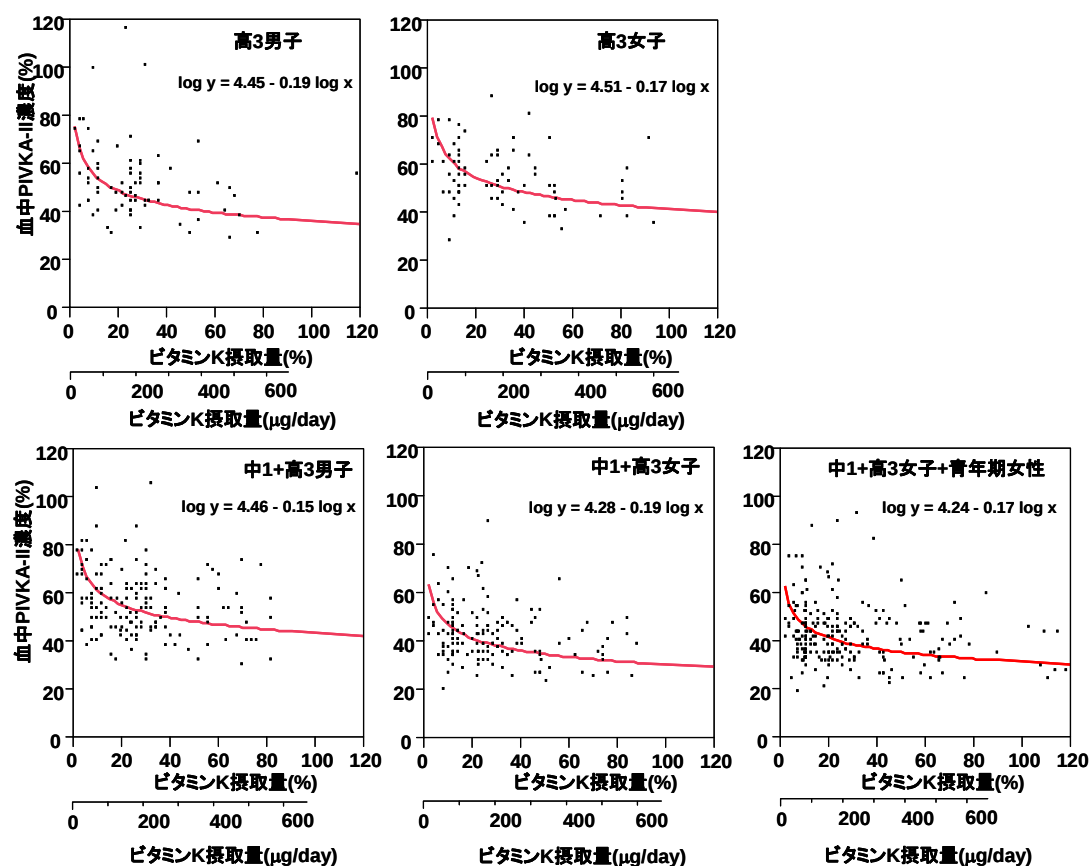


図 4-1. 若年期男女のビタミン K 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度の関係

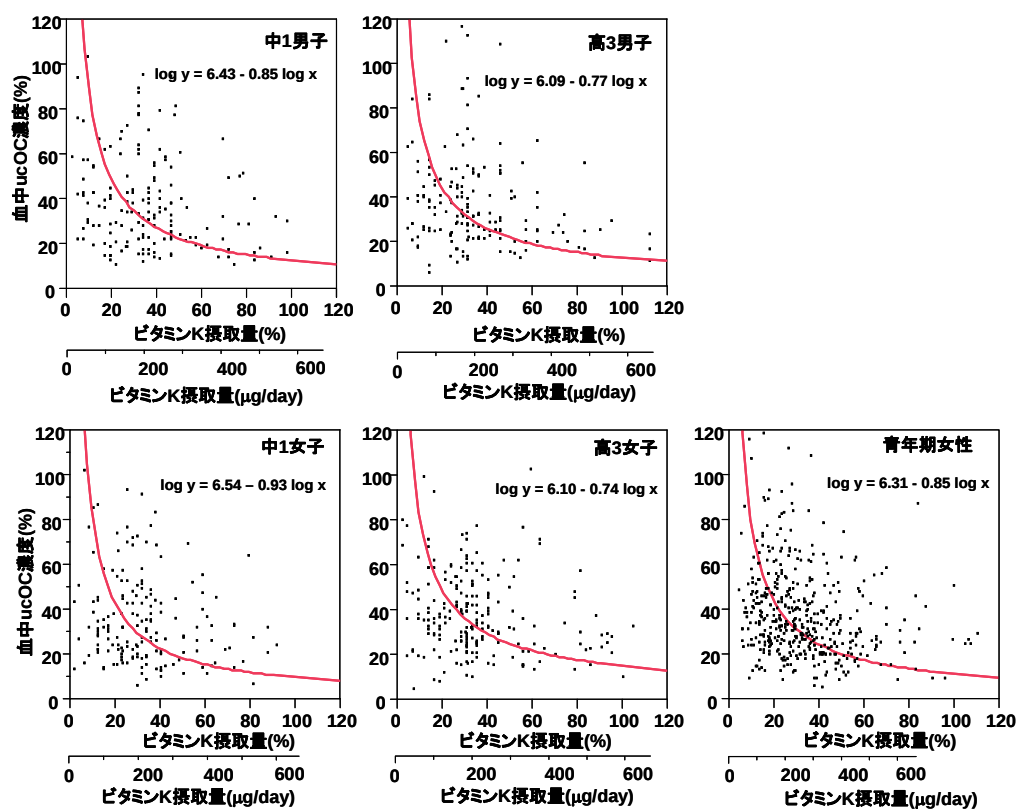


図 4-2. 若年期男女のビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係

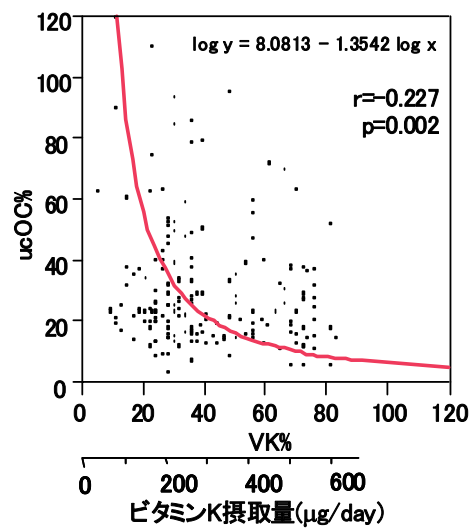


図 4-3. 高齢期女性のビタミン K 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係

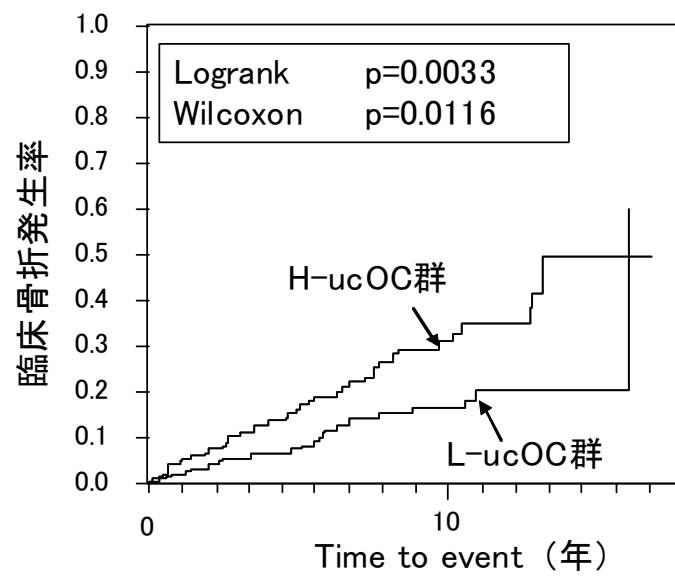


図 4-4. Kaplan-Meier 生存時間分析による臨床骨折発生の比較