

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

4. 若年期および高齢期のビタミン K 栄養の評価ならびに若年期の骨密度に対する ビタミン D および Ca 栄養の相互による影響

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	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

ビタミン K (VK) の不足により、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が知られている。そのため、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することができる。昨年度は、若年期の骨における VK 栄養の評価のために新規栄養評価法：曲率解析法を開発し、血中 ucOC 濃度を指標に VK 摂取量のカットオフ値を推定した。この成果をもとに、今年度はこの曲率解析法を高齢者の骨に必要な VK 摂取量の評価に応用した。また、現在の食事摂取基準における VK の目安量は、若年米国人男性 10 人の血液凝固関連指標を用いた研究を根拠として策定されており、日本人の摂取基準策定においては科学的根拠に乏しい。そこで、血中 PIVKA-II 濃度を指標とした血液凝固に必要な VK 摂取量のカットオフ値を算出した。その結果、思春期男女の骨に必要な VK 摂取量は 155～188 $\mu\text{g/day}$ 、高齢者では 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 VK 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 VK 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 VK 摂取が必要であり、高齢者は若年者に比べてより多くの VK 摂取が必要と推察された。高齢者については、さらに血中 VK 濃度および血中 ucOC 濃度を用いて曲率解析を行い、VK 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 VK 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 VK 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。

一方, 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 (VD) 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, 若年女性の VD 不足を評価するカットオフ値の設定や VD の必要量を策定する為の十分な疫学調査研究がなされていない。また, Ca 摂取量も骨代謝に重要であるものの, 我が国で若年女性における両栄養素の栄養状態と骨密度の関係を同時に相互評価した研究はほとんどない。そこで, 若年女性の VD および Ca 栄養状態に関する調査ならびに骨密度に対する VD と Ca 栄養の相互による影響について分析した。その結果, 目安量 5.5 $\mu\text{g/day}$ を満たす割合は 82% と高いものの, 目安量以上を摂取する者においても血中 25-OH-D 濃度で不足と判定される対象者が約 62% 存在した。また, 血中 25-OH-D 濃度と血中 PTH 濃度の負相関関係から曲率解析法を用いてカットオフ値を評価した結果, 20 ng/mL が適当であると判断した。対象者を血中 25-OH-D 濃度 20ng/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 20ng/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) の増加が観察された。また, この群では血中 PTH 濃度が有意に低下し, これが Hip BMD を増加させた理由の一つと考えられた。これらの結果から, 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 以上の摂取が有効と判断された。

1. 若年期および高齢期のビタミン K 栄養の評価

A. 目的

ビタミン K (VK) は, VK 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. VK 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ロンビン (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 VK の不足マーカーとして利用できる.

現在, VK 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のに必要な VK 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 60~65 $\mu\text{g}/\text{日}$ 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, VK 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 VK 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 $\pm$ 3.2 歳) を対象者に検討された研究である¹⁾. 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 VK 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 VK 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 VK 目安量は VK の血液凝固作用を指標として策定されているが, VK 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²⁻⁴⁾. 血中の PIVKA-II と ucOC をそれぞれ血液凝固と骨の VK 不足マーカーとして比較した場合, 骨に必要な VK は血液凝固に比べて多いことが示唆されている^{5,6)}. このため, 昨年度は ucOC 濃度を指標とした VK 摂取量の必要量を評価する新規栄養評価法:曲率解析法を開発し, 思春期男女を対象に検討した. その結果, 155~188 $\mu\text{g}/\text{日}$ の VK 摂取量が必要であることを確認した. そこで, 今年度は同対象者を用いて血中 PIVKA-II 濃度を指標に日本人における血液凝固に必要な VK 摂取量を評価した. また, われわれは OC の Gla 化に必要な血中 VK 濃度が加齢と共に高くなることを報告した⁷⁾ が, これに伴って高齢者では若年者より多くの VK 摂取量を必要とする可能性が示唆される. そこで, 今回, 高齢者の VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の調査を行い, 曲率解析法により骨に必要な VK 摂取量を算出した.

一方, 骨における VK 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 VK 濃度 (n = 190), 体格等との関連を検討した.

B. 方法

<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：VK 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、VK 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、VK 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 VK 栄養に関連する薬剤を服用するものは除外した。

<測定項目>

VK 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)⁸⁾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)⁹⁾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、電気的变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¹⁰⁾。

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、電気的变化で発光する 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¹¹⁾。

血中 VK 濃度：LC-APCI/MS/MS 法¹²⁾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。

<統計解析>

曲率解析法によるカットオフ値の算出¹³⁾：VK 摂取量と 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。VK 摂取量と血中 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、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度を 100 分率で分け、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、VK 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 VK 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：若年期の対象者の VK 摂取量、血中 PIVKA-II 濃度および血中 ucOC 濃度を示す(表 1)。VK 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 VK 摂取量との関係を表 2 に示す。VK 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 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、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係を示す (表 3)。VK 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。VK 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 VK 摂取量のカットオフ値を算出した (図 1, 表 4)。その結果、VK 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 VK 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 2, 表 5)。さらに、高齢期女性の血中 ucOC 濃度と VK 摂取量について同様の検討を加えた (図 3, 表 6)。高齢期女性の VK 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 VK 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 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 8)。次に、血中 VK (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 VK 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 9)。この結果を考慮して、血清 ucOC 濃度 4.5 ng/mL を VK 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が確認された ($p = 0.0188$)。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)。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 VK 摂取量は、197～271 μg/day であり、日本人の食事摂取基準 (2010 年版) の 60～75 μg/day を満たしていた。VK 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 VK 不足指標としてカットオフ値を検討した結果、52～62 μg/day が得られ、日本人の食事摂取基準 (2010 年版) の VK 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 μg/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¹⁾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 μg/day であり、青年期女性では 221 μg/day とやや高い結果となった。さらに、高齢女性では 270 μg/day とさらに高い摂取量が得られ加齢と共に骨における VK 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 VK 摂取量を 250～300 μg/day とし、また血中 ucOC 濃度を指標とした VK 制限食による VK 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¹⁴⁾。Booth らは、Framingham Osteoporosis Study のコホート研究において平均 254 μg/day の VK 摂取群の骨折リスクは、平均 56 μg/day の VK 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¹⁵⁾、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 VK 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、VK 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。VK 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、これらを包括する 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 VK 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、VK 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 VK 摂取量が必要であることが示唆された。

2. 若年期の骨密度に対するビタミン D および Ca 栄養の相互による影響

A. 目的

近年、血中 25-OH-D 濃度が低下し、それに伴い血中副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度が軽度上昇した VD 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。とくに女性は閉経以降急激に骨密度が低下し骨粗鬆症のリスクが高くなるため、若年期における最大骨量を維持することが重要である。しかし、我が国では、若年女性の VD 不足を評価するカットオフ値の設定や VD の必要量を策定する為の十分な科学的根拠が乏しい。また、Ca 摂取量も骨代謝や血中 PTH 濃度に影響するものの、我が国で若年女性における両栄養素の栄養状態と骨密度の関係を同時に相互評価した研究はほとんどない。そこで、若年女性の VD および Ca 栄養状態に関する調査ならびに骨密度に対する VD と Ca 栄養の相互による影響について分析した。

B. 方法

<対象者>

19～29 歳 (平均 21.2 歳) の健常女性合計 296 人。

<測定項目>

身体関連項目：年齢、身長、体重。栄養摂取量：DHQ 法により VD、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⁹⁾。血中骨代謝関連項目：血中 25-OH-D、PTH、Ca 濃度ならびに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：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。

<統計解析>

各パラメーターの相関は、Pearson's 積率相関係数を用いて評価した。血中 PTH 濃度を指標とした血中 25-OH-D 濃度のカットオフ値は、前項目と同様に曲率解析法¹³⁾により算出した。骨密度に対する VD 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 と Hip BMD 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。

C. 結果

表 10 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。VD 摂取量の平均値は 12.4 μ g/day であった (図 5)。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 VD 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 18.4ng/mL であり (図 6)、一般的な VD 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 VD 摂取である対象者のうち、血中 25-OH-D 濃度が <20 ng/mL の VD 不足者は 75%であったが、 5.5 $\mu\text{g/day}$ 以上の VD を摂取する対象者においても <20 ng/mL の VD 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、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 7 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 8)、VD 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 VD 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 9)、 <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

近年、世界的にも VD 不足が高頻度にみられることが報告されている。日本における $18 \sim 29$ 歳の 2 つの調査でも ($n = 77$ および $n = 38$)、血中 25-OH-D 濃度の平均値はそれぞれ 14.2 ng/mL および 13.6 ng/mL であり、VD 不足者が過半数存在している^{16,17)}。今回の対象者も、VD 摂取量が食事摂取基準目安量 $5.5\mu\text{g/day}$ 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 VD 不足者であった。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 $5.5\mu\text{g/day}$ の VD 摂取は VD 栄養の充足に不十分である可能性が示唆された。

VD 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 VD 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、VD 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¹⁸⁾ 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 VD 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 VD 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。

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. 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, 935-942.
- b. 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, 733-737.
- c. 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, 682-688.
- d. 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, 2366-2370.
- e. 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, 453-458.
- f. 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, 651-658.
- g. 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.
- h. 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: 232-8.
- i. 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, 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
- b. 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
- c. 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
- d. 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
- e. 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
- f. 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

- g. 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
- h. 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
- i. 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マテリアルグランド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. 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, 75-480
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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, 626-630
7. 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, 380-386
8. 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
9. 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, 639-648
 10. 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, *臨床と研究*, (1996) 73, 224-232
 11. 西村 順, 荒井紀光, 藤松順一, *医学と薬学* (2007) 57, 523-35
 12. 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, 757-763
 13. 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
 14. 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
 15. 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, 1201-1208
 16. 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
 17. 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
 18. 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

表 1. 若年期男女の VK 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
男子 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
女子 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 2. 若年期男女の VK 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 3. 若年期男女の VK 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. 血中 PIVKA-II 濃度を指標に算出した VK 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
	高3	80	199	± 146	637	22.0	± 5.9	39.6	8.5	54
女子	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 5. 血中 ucOC 濃度を指標に算出した VK 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 6. 血中 ucOC 濃度を指標に算出した VK 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 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 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 9. 曲率解析法により推定された骨における VK 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

表 10. 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

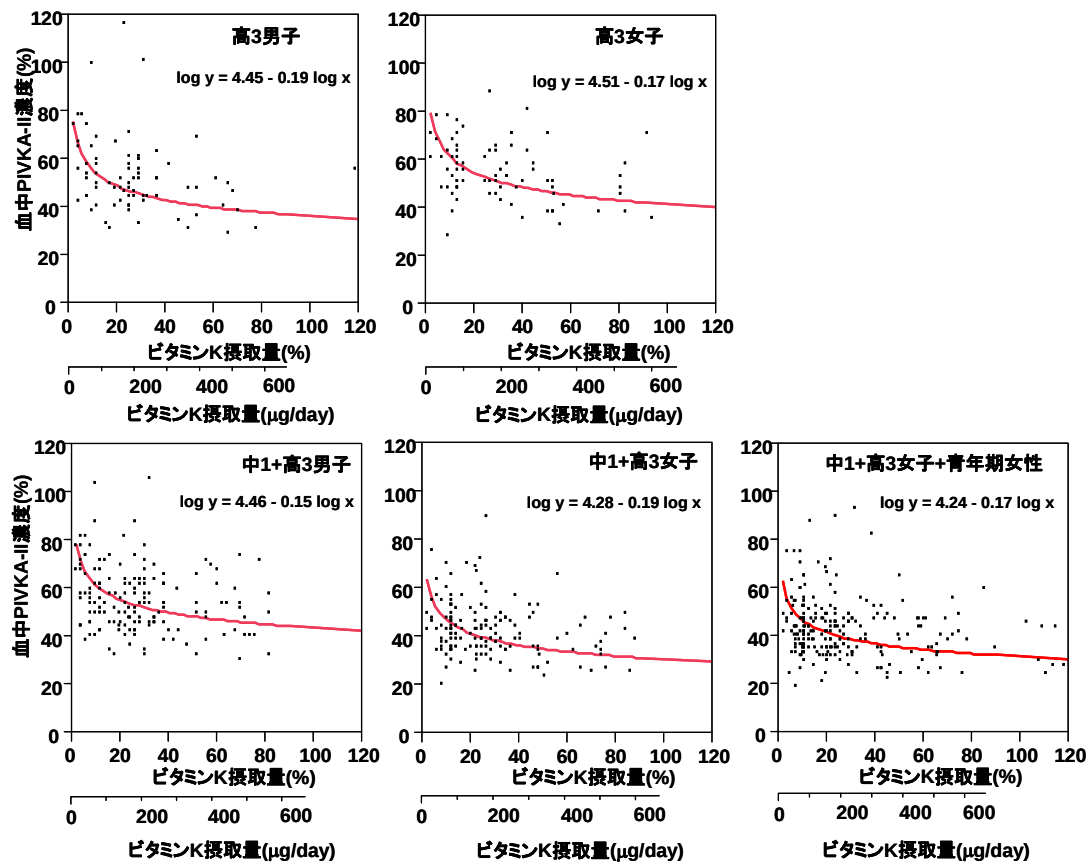


図1. 若年期男女のVK摂取量と血中PIVKA-II濃度の関係

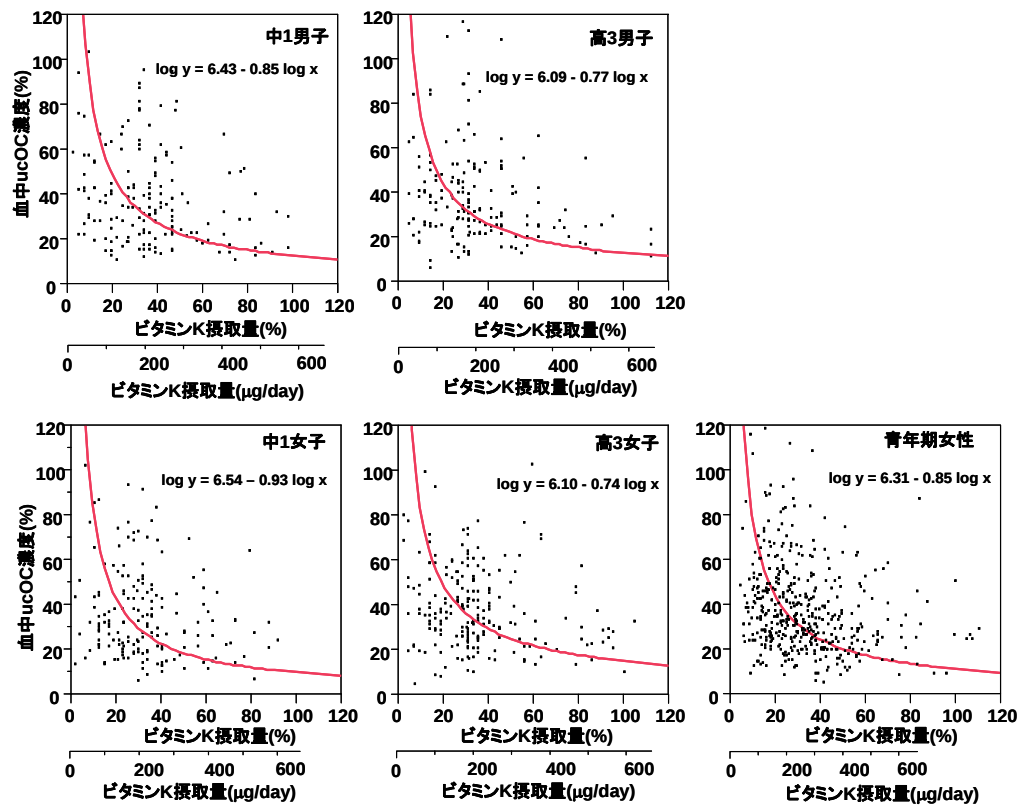


図2. 若年期男女の VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係

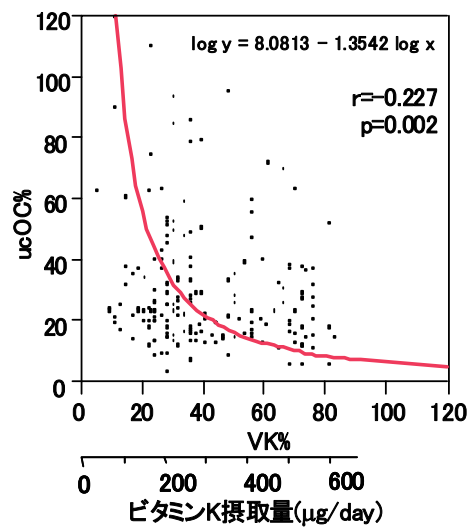


図 3. 高齢期女性の VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係

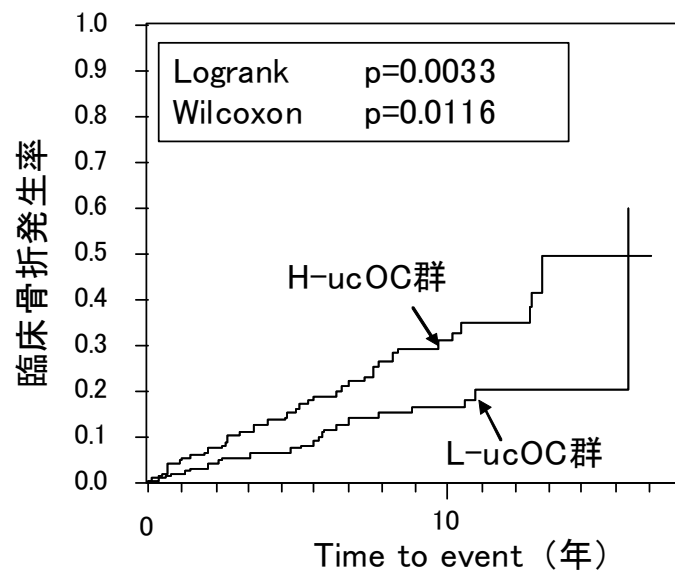


図 4. Kaplan-Meier 生存時間分析による臨床骨折発生の比較

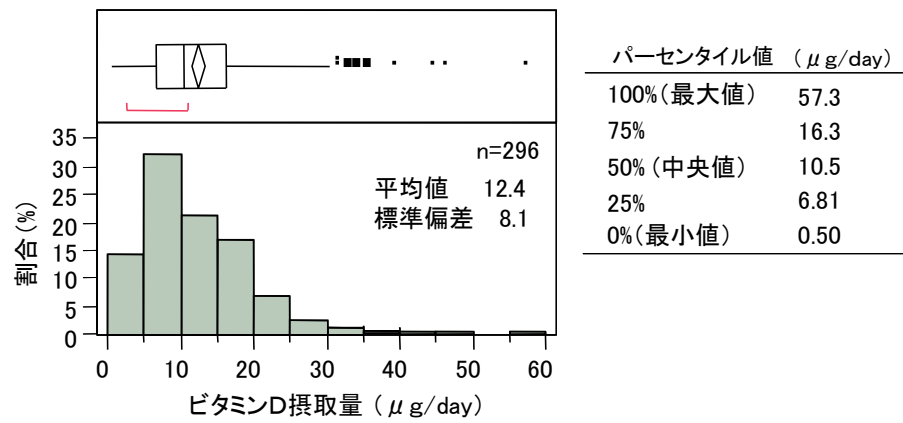


図 5. 若年期女性のビタミンD摂取量の分布

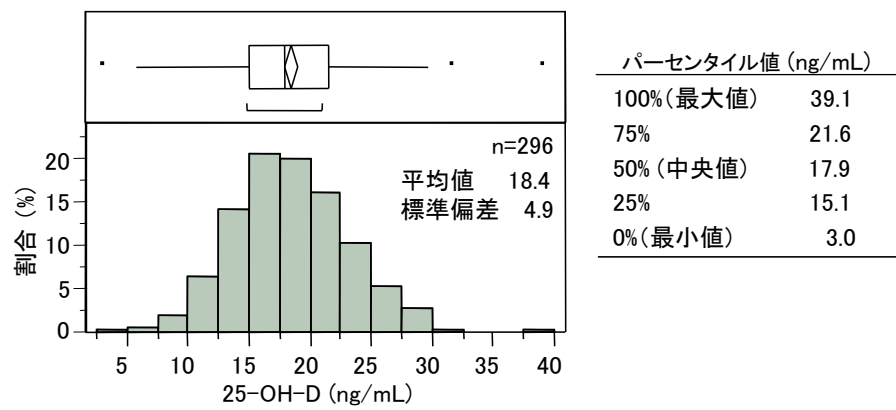


図 6. 若年期女性の血中 25-OH-D 濃度の分布

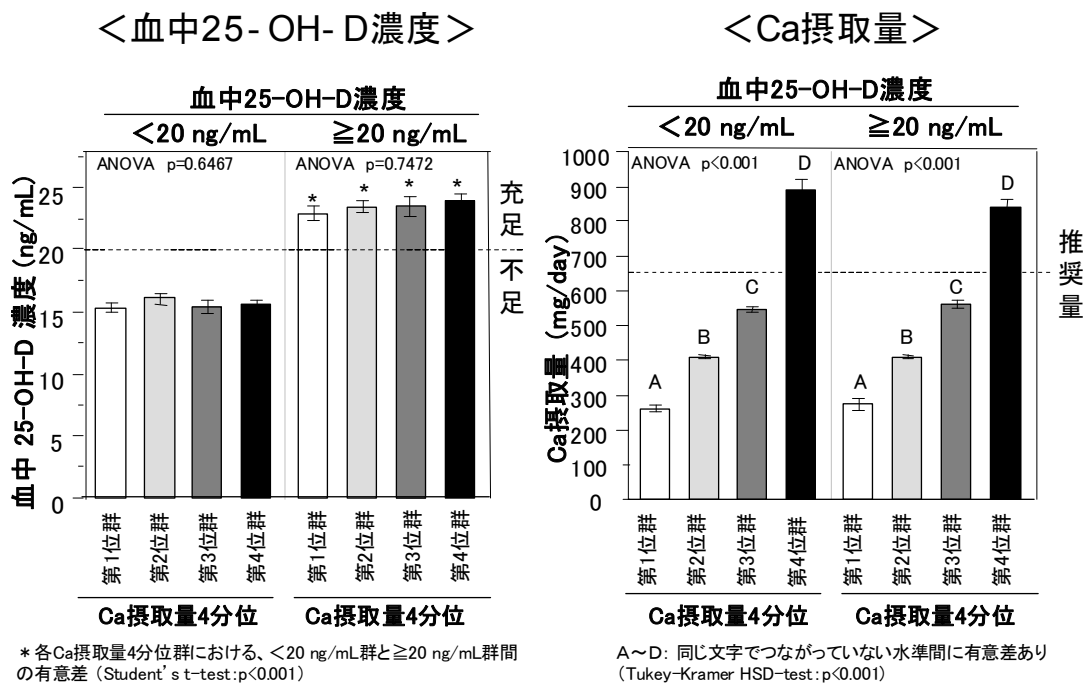


図 7. 血中 25-OH-D 濃度と Ca 摂取量で分類した 8 群の血中 25-OH-D 濃度と Ca 摂取量

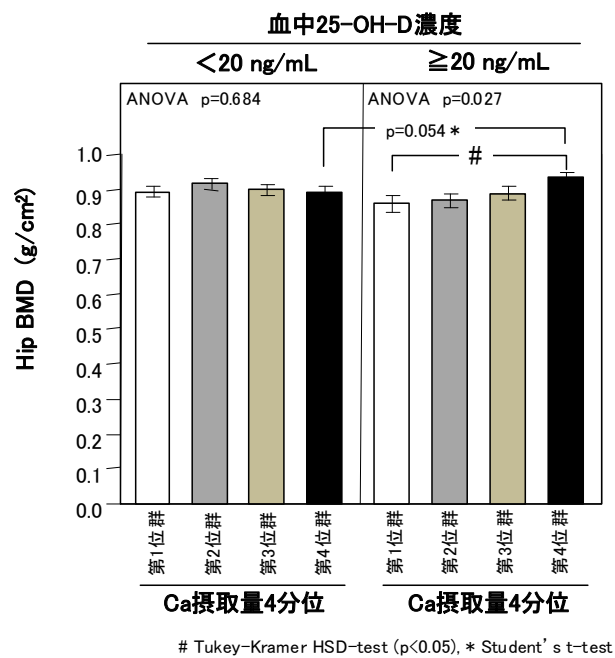


図 8. 血中 25-OH-D 濃度と Ca 摂取量で分類した群における Hip BMD

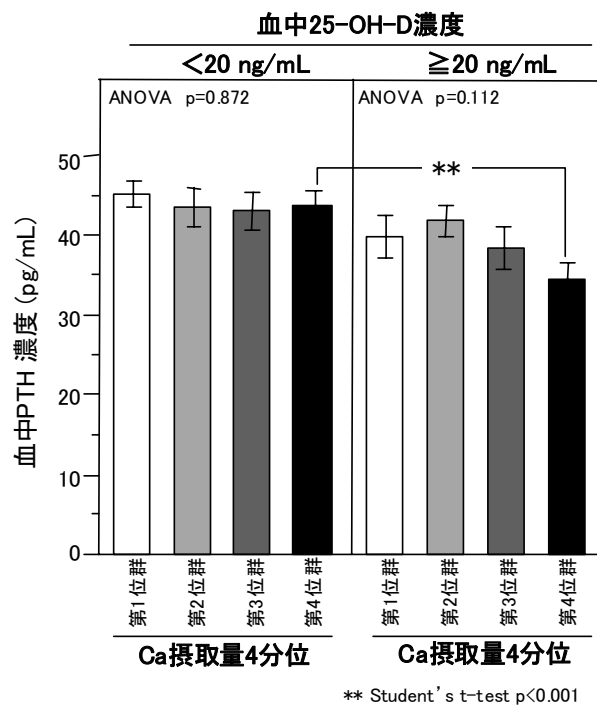


図 9. 血中 25-OH-D 濃度と Ca 摂取量で分類した群における血中 PTH 濃度