

21. Lamón-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1226-31.
22. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr* 1989;50:100-8.
23. Booth SL, Gundberg CM, McKeown NM, Morse MO, Wood RJ. Vitamin K depletion increases bone turnover. *J Bone Miner Res* 1999;14:S393 (abstr).
24. Knapen MH, Jie KS, Hamulyak K, Vermeer C. Vitamin K-induced changes in markers for osteoblast activity and urinary calcium loss. *Calcif Tissue Int* 1993;53:81-5.
25. Douglas AS, Robins SP, Hutchison JD, Poter RW, Stewart A, Reid DM. Carboxylation of osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women following vitamin K and D supplementation. *Bone* 1995;17:15-20.
26. Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern Med* 1989;111:1001-5.
27. Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone gla protein) in elderly women. *J Bone Miner Res* 1991;6:1211-6.
28. Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TN, Engelke JA, Chappell RJ, Suttie JW. A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1055-60.
29. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993;91:1769-74.
30. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study. *Bone* 1996;18:487-8.
31. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:719-24.
32. Takahashi M, Naitou K, Ohishi T, Kushida K, Miura M. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:219-24.
33. Szulc P, Arlot M, Chapuy MC, Duboeuf F, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 1994;9:1591-5.



尿中の遊離 γ -カルボキシグルタミン酸定量のための HPLC による改良法

栗原 晶子, 木戸 詔子

An Improved Method for the Determination of Free γ -Carboxyglutamic Acid in Urine by High Performance Liquid Chromatography

Akiko Kuwabara and Shoko Kido

A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of free γ -carboxyglutamic acid (Gla) in urine using precolumn fluorescent derivatization with OPA/ET reagent was previously developed. In the present study, we improved the method for quantitative analysis of urinary free Gla.

- 1) Fluorescent strength of OPA/ET reagent reached a maximum level after 3 days from the preparation of the reagent. Then the fluorescent strength was maintained at least after 3 weeks by the addition of ethanthiol every 3 days.
- 2) An urine sample was diluted by 20 to 60-folds and a 2.5 μ l aliquot of the diluted urine sample containing about 1 to 2 pmol of Gla was injected into the ChemcoPak Liquid Chromatography Columns packed with Nucleosil 5SB. The mobile phase consisted of 0.12M sodium citrate buffer (pH 5.28) and acetonitrile in the ratio 60:40. Under these conditions, Gla peak appeared in a retention time of about 7 to 10 minutes and was completely resolved from the other amino acids. Since the peak disappeared after the sample was subjected to decarboxylation treatment, the peak was confirmed to contain only Gla.
- 3) This method gave a linear standard curve in a range of 0.10-150 pmol and allowed quantitative analysis of Gla in an amount as low as 0.1 pmol. We used the standard curve in a range of 0.10-4.0 pmol for urinary Gla analysis. This is a sensitive and simple assay of free Gla in urine which was subjected to only dilution without further treatment.

(Received September 8, 2005)

1. はじめに

γ -カルボキシグルタミン酸 (3-アミノ-1, 1, 3-プロパントリカルボン酸, 略称 Gla) は下記に示すような生体の特定タンパク質の構成成分として存在し, タンパク質前駆体分子のグルタミン酸残基の γ 位が, ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより選択的修飾を受けてカルボキシル化される。1974年 Stenflo¹⁾によって, Gla は血液凝固因子の第II因子であるプロトロンビンの正常分子中に発見され, このこ

とからビタミンKが各臓器のミクロソーム分画に存在するカルボキシラーゼを活性化し, γ -カルボキシル化反応の補助因子として機能することが明らかにされた。さらに典型的な血液凝固因子であるVII, XおよびIX因子にも Gla が含まれていることが報告された²⁻⁴⁾。その後, 血漿タンパク質のプロテインMやプロテインZ, 抗凝固作用を有しているプロテインCやプロテインCの補助因子であるプロテインSなどにも Gla が含まれていることが認められた²⁻⁴⁾。また, Gla は血液凝固系とは全く関係のない骨基質タンパク質や腎臓結石, 腎臓組織のタンパク質などにも含まれていることが確認された^{3,4)}。体内で最も豊富に

Gla が存在するのは骨組織であり、骨の Gla タンパク質のオステオカルシン (別名 Bone Gla Protein: BGP) は骨の非コラーゲン性タンパク質の約 20% を占めている。また、骨基質には BGP 以外にも Gla を含むマトリックス Gla タンパク質が発見されているが、その機能については不明である^{5,6)}。BGP は骨芽細胞で特異的に生成され、破骨細胞の基質シグナルとしての役割をもつと考えられている⁷⁾。ヒト BGP 分子 (MW, 5,900) 中には 3 個の Gla が存在し、カルシウムイオン結合能をもっている。BGP のカルシウムイオン結合様式は Gla を含有しない細胞内カルシウムイオン結合タンパク質と異なり、Gla とカルシウムイオンが弱く結合するケージ構造を形成している⁸⁾。BGP は細胞外骨基質に存在し骨のミネラル層でヒドロキシアパタイトと強く結合しており、骨の中でも長管骨に Gla 含有量は最も多い。また、BGP の生合成がビタミン D によっても調節されるとの報告⁹⁾もあるが、BGP の骨代謝については不明な部分が多い。骨芽細胞で生成された BGP は、一旦血流中に分泌された後に、血中のカルシウムイオンを動員してヒドロキシアパタイトに吸着され骨に蓄積される。そして大部分の BGP は腎臓に取り込まれて代謝され、ほとんどが遊離アミノ酸にまで分解され、BGP 中の Gla は体内で脱炭酸されることなく尿中に排泄される¹⁰⁾。従って、尿中の Gla 排泄量は Gla を含む骨組織の代謝の指標となる可能性があるが、ほとんど研究されていない。

Gla の測定方法としては、アミノ酸分析計による方法¹¹⁾を始めとし、比色定量¹²⁾、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー¹³⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)¹⁴⁻¹⁶⁾、ガスクロマトグラフィー¹⁷⁾などを利用した多くの方法が報告されているものの、生体レベルの尿中 Gla の微量定量法についてのデータは少ない。今回 Kuwada らの方法¹⁵⁾に準じ、Gla の蛍光プレラベル法での HPLC による定量を試みた結果、種々の問題点があることが明らかとなった。そこで、Kuwada らの方法を改善し、より安定した高感度の定量条件を検討し、臨床検査の指標として用いることができるように改良したので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 試料の調製

Gla 標準液は DL- γ -カルボキシグルタミン酸モノアンモニウム塩 (Biosciences, Inc., La Jolla, Ca, USA) に蒸留水を加えて希釈し、16 pmol \sim 40 nmol/100 μ l の Gla 標準液を調製し冷凍保存した。また採取した尿

試料は凍結保存し、使用時に蒸留水で 20 \sim 60 倍に希釈して用いた。

2. 蛍光化試薬・OPA/ET の調製

Hill らの方法¹⁸⁾に準じ、o-フタルアルデヒド (ナカライテスク) 100 mg をメタノール (和光純薬工業) 5 ml に溶かし、エタンチオール (ナカライテスク) 50 μ l と 0.15 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.5, 0.2% Brij-35 を含む) 10 ml を加えて混合し、蛍光化試薬 (OPA/ET 試薬) を調製した。さらに窒素置換後、使用するまでに最低 72 時間遮光して室温で保管し、3 \sim 4 日毎にエタンチオール 10 μ l を加えて使用した。これらの試薬はすべて特級を用いた。また Gla の HPLC 分析の当日に、試料 100 μ l に OPA/ET 試薬 100 μ l を加え、ミキサーで混和し、室温で 2 分間静置し、0.1 M リン酸二水素カリウム 200 μ l (アセトニトリルと蒸留水 2:1 の混合液を溶媒としてリン酸二水素カリウムを溶解) を加えて蛍光化した。

3. Gla の脱カルボキシル化

Hauschka らの方法¹⁹⁾に準じ、Gla 標準液または希釈した尿を加水分解ビンにそれぞれ 200 μ l (320 pmol 相当量) とり、同量の 2N 塩酸 (ナカライテスク, アミノ酸自動分析計用特製試薬) を加え、真空下で 100 $^{\circ}$ C, 16 時間の酸分解を行った。その後、固体の水酸化ナトリウムを入れたデシケーター中で、試料管に移した酸分解試料を減圧乾固して塩酸を除去し、さらに蒸留水で試料管壁を洗い込み、同様に減圧乾固した。これを 400 μ l の蒸留水に溶かして凍結保存した。

4. HPLC の条件

Kuwada らの方法¹⁵⁾に準じ、日立製作所 L-6300 形インテリジェントポンプ、日立製作所 F-1050 形分光蛍光光度計、日立製作所 D-2500 形クロマトデータ処理装置、日立製作所 AS-4000 形インテリジェントオートサンブラ、充填剤 Nucleosil 5SB (5 μ m 粒子) を詰めた ChemcoPak Liquid Chromatography Columns (4.6 \times 50 mm, ケムコ), Type IH にプレカラムフィルター (2 μ m pore) を入れて使用した。カラムオーブンは 47 $^{\circ}$ C に設定した。移動相には 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (和光純薬工業, アミノ酸自動分析用 3.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 5.28 を蒸留水で希釈) と HPLC 用アセトニトリル (和光純薬工業) を 60:40 で使用した。流速は 1.0 ml/min とし、Gla の蛍光検出は励起波長 240 nm, 蛍光波長 418 nm で測定し、ATT 6 で溶出パターンを示した。HPLC に注入する試料と移動相に用いた溶媒はすべて 0.45 μ m ミリポア, Type W または 47 mm プレイン

フィルター (日本ミリポア工業) を通してから用いた。Gla 標準液と尿希釈試料の注入量はすべて 2.5 μ l とした。

III. 結果と考察

遊離の Gla の定量法で HPLC 以外の方法は、いずれもイオン交換体を通して Gla を精製したり、濃縮するなどの煩雑な操作を伴う上に、内部標準品による補正が必要である。HPLC での Gla の検出法にはポストラベル法とプレラベル法があるが、後者の方は感度が高い上に装置上簡便な方法である。そこで Kuwada らによる尿中の遊離 Gla の定量法¹⁵⁾ に準じて HPLC を使用し、蛍光プレラベル法で測定してみたところ、蛍光試薬の安定性などに問題があることが判明したのでこの問題を解決し、より精度が高くしかも簡易な蛍光プレラベル化 Gla の HPLC による定量法を検討することにした。

1. OPA/ET 試薬の安定性

プレテストとして Kuwada らの方法¹⁵⁾ に準じ、蛍光化した Gla 標準液 (Gla 0.80~500 pmol/5 μ l 試料) を HPLC に注入し、Gla 量に対し蛍光強度をプロットして標準曲線を作成した。Kuwada らの報告では両対数プロットによる標準曲線であったが、図 1-A に示すように、対数を用いずに 0.80~200 pmol の範囲で Gla 量に比例して標準曲線を作成することができた。しかし、この標準曲線は図 1-A に示すように OPA/ET 試薬の調製後の日数によって蛍光強度 (ピーク面積/Gla, pmol) に 2 倍以上の差が見られた。Kuwada らは、OPA/ET 試薬は調製から 16 時間後に蛍光強度が調製時の 21~32% に減少し、その後安定した活性が得られると報告している^{15,16)}。また、アルカリ処理をして尿中の Gla タンパク質や Gla ペプチドを分解して、全て遊離の Gla として定量した方法では、13 時間後に約 20% の減少を伴っている¹⁶⁾。そこでまず、蛍光試薬の安定性を検討するために、Gla 標準液を 3~4 日毎に OPA/ET 試薬で蛍光化し HPLC による標準曲線を作成した。OPA/ET 試薬調製から 16 時間までは蛍光強度が不安定とされているので、調製日と 1 日後から 21 日後まで Gla の蛍光強度を調べた。図 1-B は図 1-A に示す各標準曲線から求めた蛍光強度を相対的に示した結果であり、2 日後までは蛍光強度は急に上昇し 3 日後に最大値を示し、その後はほぼ一定の蛍光強度を示した。試薬調製後 3 日毎にエタンチオールを加えることで蛍光強度が回復し、1 ヶ月後でも同じ蛍光強度を示した。この実験は 3 回繰り返し、OPA/ET 試薬の安定

性を確認した。従って OPA/ET 試薬 15 ml 調製後、3 日毎にエタンチオール 10 μ l を加えて以後の測定に使用した。

2. 尿中の遊離 Gla 検出のための HPLC 条件

Kuwada らの方法¹⁵⁾ の HPLC による Gla の分析は、尿試料を 5.0 μ l 注入し、移動相は 0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 50:50、流速 2 ml/min で行っている。しかし、この条件では Gla が 3~4 分で溶出し、またベースラインが下がりきらず分離が悪かったため以下に示すように、Gla 定量のための条件を検討した。

Kuwada らの方法では¹⁴⁻¹⁶⁾ 尿試料は 5~10 倍希釈して使用していたが、この希釈倍率で HPLC を行うと尿中の Gla 以外のアミノ酸が過剰で Gla ピークの分離が悪かった。プレテストとして約 10 検体の尿試料を分析した結果、尿中のアミノ酸量は検体によって約 3 倍濃度が異なることが分かった。そこで検体により 20~60 倍希釈し、注入量を 2.5 μ l にして流速を 1 ml/min にしたところ、Gla ピークが拡散せずシャープなピークになり、ベースラインもやや下がった。つまり、Kuwada らの方法の約 1/10 の尿試料で、尿中の微量 Gla の分析が幾分改善できた。この条件下で得られた溶出パターンを図 2-A に示した。Gla は 5.96 分に溶出し、Gla の前後に溶出するピークとの分離が悪く、またベースラインが完全に下がりきらなかったため、次に移動相の条件を検討した。

移動相のクエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリル、50:50 の割合では Gla の分離が悪いため、45:55 にしたところ、Gla の溶出時間はあまり変化せず、Gla 以降に溶出するピーク (このピークはアルカリ分解で消失することから、尿中に溶出したタンパク質やペプチドが蛍光化されたものである¹⁶⁾) の時間が早くなり Gla との分離が悪くなったので 60:40 にしたところ、Gla 以降に溶出するピークが遅くなり、Gla との分離が改善された。しかし、Gla の前のピークとの分離は変わらず、ベースラインも下がりきらなかった。そこで、クエン酸ナトリウム緩衝液の濃度を 0.2 M から 0.12 M にした結果、図 2-B に示すように Gla は 7 分台に溶出して他のピークと完全に分離し、ベースラインも下がった。従って、HPLC の溶出条件は 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 60:40 で、流速 1 ml/min とした。本実験の結果から Gla の溶出は 7 分より早くなると分離が悪く、また 10 分より遅くなると拡散するため、7~10 分までに溶出する条件下で分析することが望

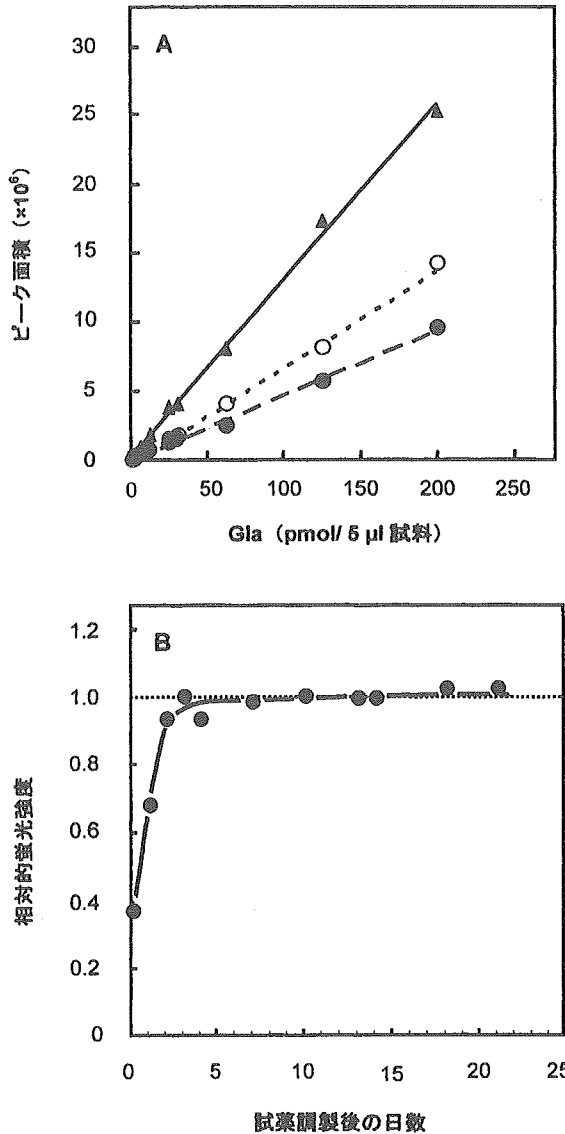


図1 蛍光試薬の経時的安定性
 測定日毎に Gla 標準液 100 μl (Gla 64 pmol ~ 16 nmol を含有) に OPA/ET 試薬 100 μl と緩衝液 200 μl を加えて蛍光化した。この溶液 5 μl を HPLC に注入し、A のグラフに示すように 0.80 ~ 200 pmol の Gla に対する蛍光強度をピーク面積で示し、9 点プロットの標準曲線を作成した。●は試薬調製当日、○は1日後、▲は3日後に測定した結果を示した。この結果に示すように、測定日によって蛍光強度 (ピーク面積 / Gla pmole) が大きく変化した。B は蛍光試薬の安定性を調べるために、OPA/ET 試薬調製日から 1 ~ 4 日毎に 21 日までの Gla の蛍光強度を測定したグラフである。縦軸は A のグラフに示すような各測定日の標準曲線から求めた蛍光強度の値を、蛍光強度の最大値を示す 3 日目の値を 1 として相対的に示した。OPA/ET 試薬は調製後 4 日目以降、3 ~ 4 日毎の測定日に検体を分取した後にエタンチオール 10 μl を加えて用いた。この実験は 3 回の平均値を示した。

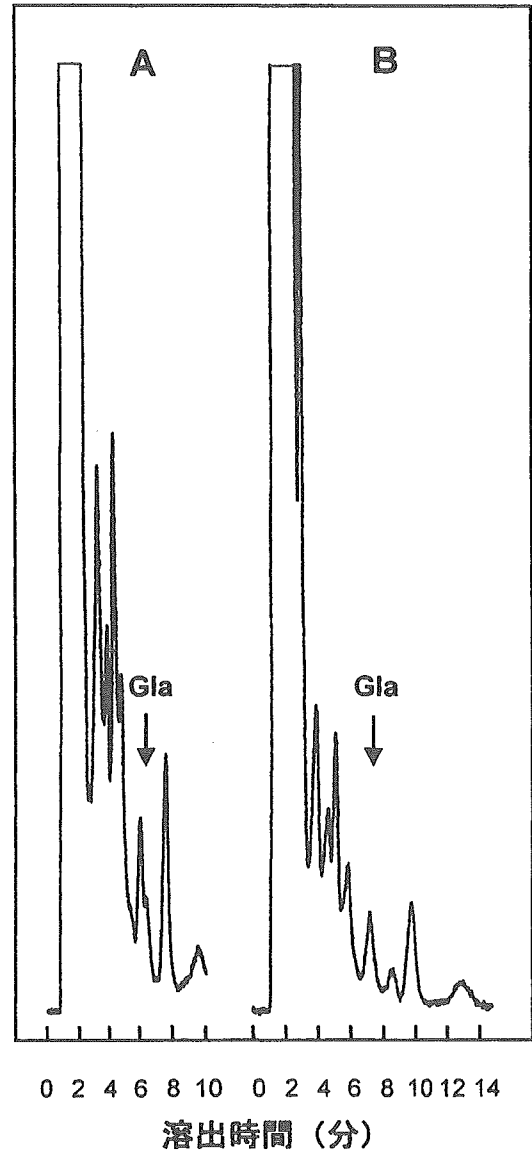


図2 尿試料中の遊離 Gla の HPLC 溶出パターン
 A は蛍光化した 20 倍希釈の尿試料を 2.5 μl 注入し、0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 50 : 50、流速 1 ml/min で溶出したパターンを示した。10 分以降に溶出していたペプチドやタンパク質のピークは拡散していたためカットしている。B は A と同じ尿試料を 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 60 : 40、流速 1 ml/min、で溶出したパターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

ましいことが分かった。

以後、この条件で実験を行ったが、カラムが非常に小さく試料や溶媒に影響されやすいため溶出時間が変化した。従って、尿中の Gla を定量する場合には毎回 Gla 標準液を用いて Gla の溶出時間を確認する必要がある。また、尿試料を連続して流すと、Gla

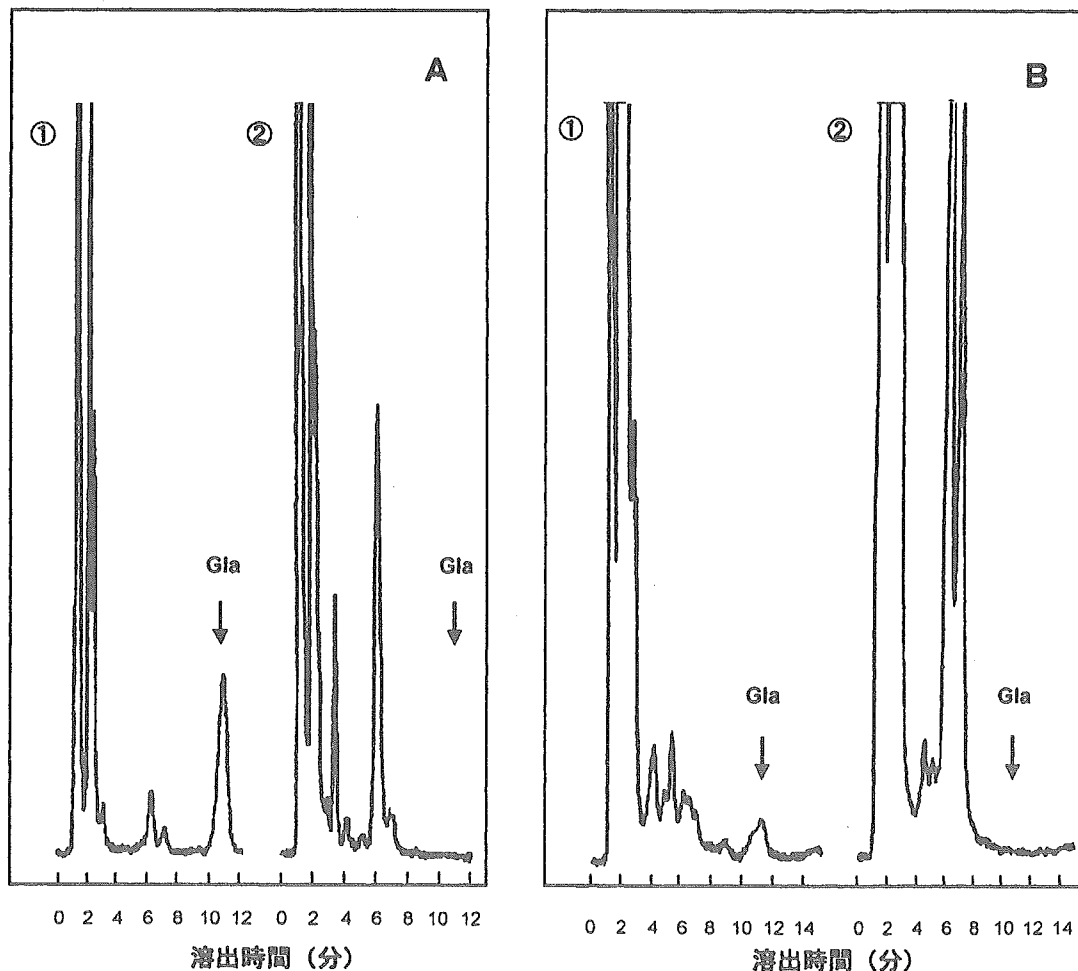


図 3 脱カルボキシル化による Gla の HPLC 溶出パターン
 A は 2 pmol の Gla 標準液, B は 20 倍希釈の尿試料をそれぞれ蛍光化し, 各試料を 2.5 μ l ずつ注入し, 図 2-B の条件で溶出した。A と B 共に①が塩酸未処理の溶出パターン, ②が塩酸処理による脱カルボキシル化の溶出パターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

の溶出時間が徐々に早くなり, 分離が悪くなるのでカラムの再生操作として, 尿試料 15 検体毎に 40~80%アセトニトリルを 15 分のグラシエントシステムで溶出後, 80%アセトニトリルで 15 分パージを行った。この操作でも再生されない場合は, 多量の蒸留水→0.1M エチレンジアミン四酢酸・ナトリウム塩 (二ナトリウムと四ナトリウムを 1:1 で使用)→蒸留水→メタノール→蒸留水→0.5M クエン酸ナトリウム緩衝液で各々 30 分パージを行った。

3. 脱カルボキシル化による Gla の溶出パターン

尿試料中の Gla のピークに Gla 以外の蛍光化物質が含まれていないことを確かめる必要がある。Gla 標準液と 60 倍希釈尿を塩酸処理によってそれぞれ脱カルボキシル化し, 未処理の試料と Gla 溶出パターンを比較した。Gla 標準液と尿試料 (図 3-A と図 3-B) について, 未処理の溶出パターン①と脱カルボ

キシル化の溶出パターン②をそれぞれ示した。溶出パターン①の矢印の位置に Gla のピークが検出された。しかし, 溶出パターン②の脱カルボキシル化した試料では Gla 標準液と尿試料ともに, 矢印の位置の Gla のピークが完全に消失し, 6 分台に脱カルボキシル化したと思われるピークが溶出した。この結果から尿試料中の Gla に相当するピーク中には Gla 以外の物質が存在していないことを確認した。

4. Gla 標準溶液による標準曲線の作成

上記 2 で決定した HPLC による Gla の定量条件で, 図 4-A のように標準曲線を作成したところ 0.10 pmol より濃度が低いと定量性に乏しく, また 150 pmol を超えると標準曲線から徐々に乖離し低値を示した。この条件で 30 検体の尿中 Gla を測定したところ, 0.10 pmol より低くなると検出が難しく, 4.0 pmol 以上になると分離が悪くなることから尿試料中の Gla

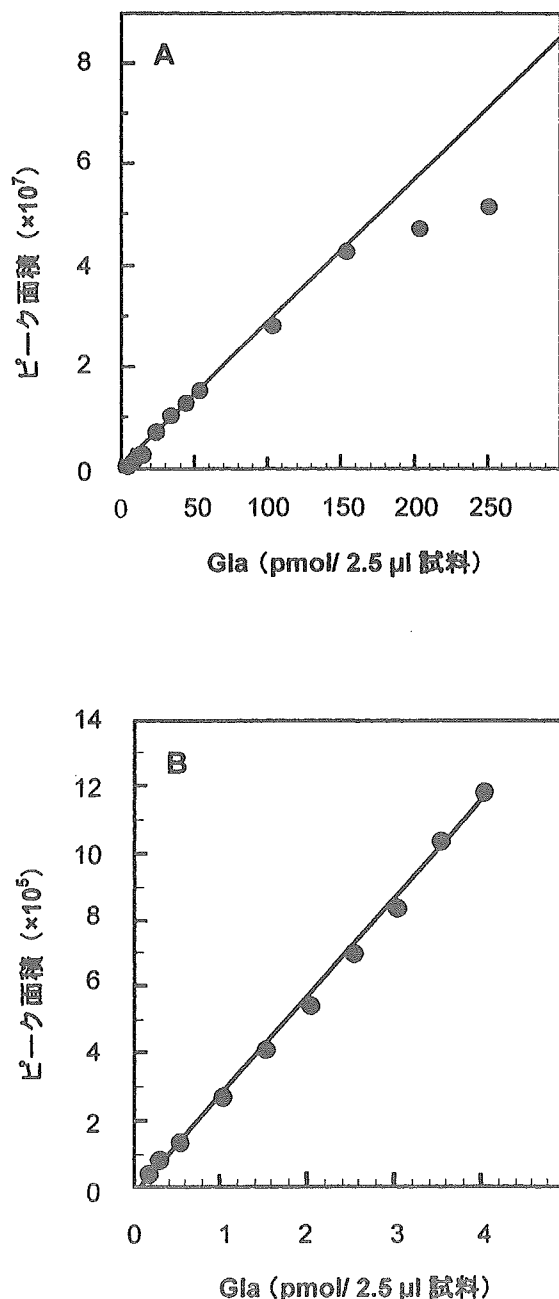


図4 蛍光プレラベル Gla の HPLC による標準曲線の作成
 決定した HPLC の測定条件下で、Gla 量 0.25~250pmol (A) および 0.12~4.0pmol (B) の範囲の標準曲線を得るように測定した。

は 1~2pmol 前後で定量することが好ましいことが分かった。そこで、尿中の Gla 定量のための標準曲線は図 4-B に示すように、0.10~4.0pmol を使用することにした。Kuwada らによる方法¹⁵⁾では Gla の検出限界が 0.3pmol~1nmol とされており、標準曲線は 0.3pmol~100pmol の両対数目盛で作成されていたが、低濃度でのプロット数が少なく、なおかつ

Gla 濃度とピーク面積共に対数でプロットしたグラフによる標準曲線であった。本研究ではこの濃度の範囲であれば Kuwada らのようにピーク面積と Gla 濃度を対数処理せずに直線で示すことができ、図 4-B の標準曲線を用いて尿中の Gla を低濃度で精度よく定量できることになった。

IV. ま と め

尿試料の調製が希釈操作のみで、装置上簡便で分析時間が短く、精度が高いとされている尿中の遊離 Gla の定量法として開発された HPLC での蛍光プレラベル法¹⁵⁾に従って定量してみたところ、蛍光試薬の安定性が悪く、一定した値が得られなかった。そこで、尿中の遊離 Gla 定量のための HPLC 法を下記に示すように改良した。

1. Gla を OPA/ET 試薬でラベル化し、その蛍光強度の安定性を検討したところ、試薬調製後 1~3 日後までは蛍光強度は上がり続け、調製時の約 2 倍に達したが、その後はエタンチオールを 3 日毎に加えることで蛍光強度は少なくとも 3 週間後まで安定していた。
2. HPLC の条件は、20~60 倍希釈尿試料の 2.5 μl 中に 1~2pmol の Gla 量が含まれるように調製し、Nucleosil 5SB を充填剤とした ChemcoPak Liquid Chromatography Columns (4.6×50mm) Type IH を用い、0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.28) とアセトニトリルが 60:40、流速 1ml/min として蛍光検出による定量を行った。その結果 Gla は 7~10 分までに溶出すると完全に単離された。この Gla ピークは脱カルボキシル化すると完全に消失したことから、Gla 以外の成分が含まれていないことを確認した。
3. 今回決定した条件で標準曲線を作成した結果、0.10~150pmol の範囲で、Gla 量に対するピーク面積を対数処理することなく、Gla 量に比例した検量線を得ることができた。0.10~4.0pmol の標準曲線を用いて、尿は希釈操作のみで、蛍光プレラベル化した遊離 Gla を 15 分サイクルの HPLC により精度よく定量できた。

(平成 17. 9. 8. 受付)

V. 文 献

- 1) J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan and P. Roepstorff: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 71, 2730 (1974)
- 2) 木村修一: 栄養学レビュー, 27, 24 (1999)
- 3) 岩永貞昭, 斎藤英彦, 松田道生監修: ビタミン

- K—医学・生物学領域における新展開—, メディカルジャーナル社, 82 (1994)
- 4) 細谷憲政監修: ヒューマン・ニュートリション—基礎・食事・臨床—, 医歯薬出版, 245 (2004)
 - 5) P.A. Price, M.R. Urist and Y. Otawara: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117, 765 (1983)
 - 6) P.A. Price and M.K. Williamson: *J. Biol. Chem.*, 260, 14971 (1985)
 - 7) J. Glowacki, C. Rey and M.J. Glimcher: *J. Cell. Biochem.*, 45, 292 (1991)
 - 8) Y. Otawara, N. Hosoya, S. Moriuchi, H. Kasai and T. Okuyama: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 209 (1980)
 - 9) P.A. Price and S.A. Baukol: *J. Biol. Chem.*, 255, 11660 (1980)
 - 10) D.V. Shah, J.K. Tews, A.E. Harper and J.W. Suttie: *Biochim. Biophys. Acta.*, 539, 209 (1978)
 - 11) 白根由美子, 中村章一郎, 平石攻治, 黒川一男: 臨床科学, 12, 297 (1983)
 - 12) L. Pecci and D. Cavallini: *Anal. Biochem.*, 118, 70 (1981)
 - 13) C.M. Gundberg, J.B. Lian and P.M. Gallop: *Anal. Biochem.*, 92, 219 (1979)
 - 14) M. Kuwada and K. Katayama: *Anal. Biochem.*, 117, 259 (1981)
 - 15) M. Kuwada and K. Katayama: *Anal. Biochem.*, 131, 173 (1983)
 - 16) M. Kuwada and K. Katayama: *J. Chromatogr.*, 308, 398 (1984)
 - 17) S. Matsuura, S. Yamamoto and M. Makita: *Anal. Biochem.*, 114, 371(1981)
 - 18) D.W. Hill, F.H. Walters, T.D. Wilson and J.D. Stuart: *Anal. Chem.*, 51, 1338 (1978)
 - 19) P.V. Hauschka, J.B. Lian and P.M. Gallop: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 72, 3925 (1975)

食事療法

甲子園大学栄養学部 田中 清
(現:京都女子大学家政学部食物栄養学科)

はじめに

骨粗鬆症の治療薬には、カルシウム、ビタミンD、ビタミンK、ビスフォスフォネート、カルシトニン、女性ホルモン、SERM、フラボノイドなど多くのものがあるが、このうちカルシウム、ビタミンD、ビタミンKは栄養素である。従って、ビスフォスフォネート欠乏症は存在しないが、これらの欠乏症はありうる。カルシウムについてはすでに多くの論文があるので、今回はビタミンD、ビタミンKについて重点的に述べる。

ビタミンD

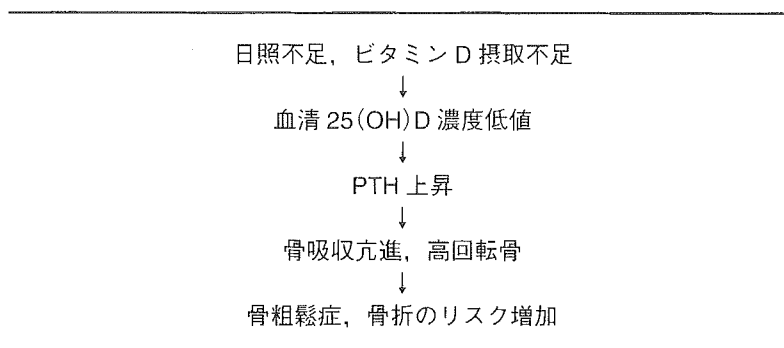
1. ビタミンD欠乏症をめぐる歴史的背景

産業革命頃クル病・骨軟化症が多発し、それが日光浴や肝油の投与にて治癒したことは有名であるが、その後栄養状態の改善とともに古典的クル病・骨軟化症は激減し、ビタミンD欠乏症はあまり注目されなくなった。しかし1970年代に、血清25(OH)D濃度測定が可能となり、1980年代に入ると高齢者の血液中ビタミンD濃度について報告されるようになり、最近では、クル病・骨軟化症を起こすほどのビタミンD欠乏でなくても、骨粗鬆症・骨折の原因になることが明らかになってきた。

2. ビタミンDの不足が骨に及ぼす影響

日照不足、食事からの摂取不足のいずれの原因にせよ、ビタミンDが不足すると〔血清25(OH)D濃度低値〕、PTH上昇・骨吸収亢進から高回転骨状態となって、骨粗鬆症・骨折のリスク増加をきたす(表1)。

表1 ビタミンD欠乏症による二次性副甲状腺機能亢進症



3. Hypovitaminosis D

英語では hypovitaminosis D は, vitamin D deficiency と insufficiency に区別される。Deficiency はより重症のもので, 顕著な二次性副甲状腺機能亢進症や骨軟化症・筋力低下まできたす。Insufficiency はより軽症のもので, 軽度の二次性副甲状腺機能亢進症・骨密度減少をきたす。日本ではこのような考え方はまだ十分には普及していないが, deficiency に欠乏, insufficiency に不足という訳語をあてる。

4. 成人および高齢者におけるビタミンD所要量

第6次改定日本人の栄養所要量において, ビタミンD摂取基準は「20-46歳の人で, 68 IU/日のビタミンD摂取を数年間続けると骨軟化症が認められるようになり, 100 IU/日では発生はみられなかったとの報告があるので, 100 IU/日とした」と記載されている¹⁾。所要量は一般に, その集団の98%の人が欠乏に陥らない量と定められているが, 何をもって欠乏というかによって所要量の値は大きく変わる。第6次改定日本人の栄養所要量に引用されているのは1969年すなわち, 血液中ビタミンD濃度が測定できるようになる前, insufficiency という概念のない時代の文献であり, この所要量は古典的骨軟化症を防止することを念頭においた数字だが, 骨軟化症さえみられなければよいのであろうか。

5. ビタミンD不足者の頻度

図1は, アメリカにおいて長期入院患者を対象に血液中ビタミンD濃度を測定した結果である²⁾。血清25(OH)Dが15 ng/ml以下という欠乏者の割合が50%を越えており, 8 ng/ml以下という重症の欠乏者すら多かった。すなわち高齢者や入院患者では, 従来考えられてきた以上にビタミンDが充足していない人の割合は多いことを示唆している。

図1 入院患者におけるビタミンD欠乏症の頻度²⁾

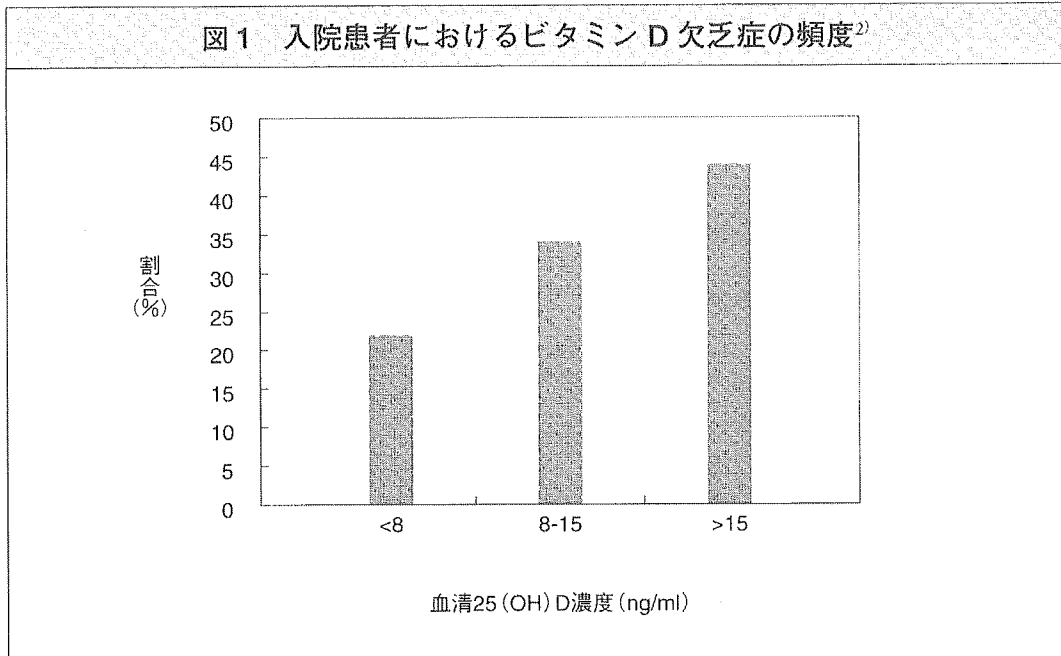
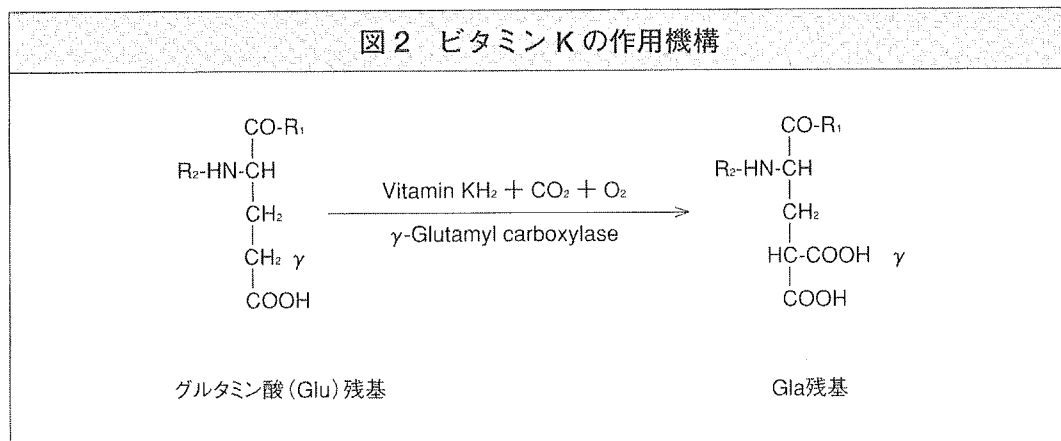


図2 ビタミンKの作用機構



ビタミンK

ビタミンKは、血液凝固因子の活性化に必要なビタミンとして見出された。実際ビタミンKのKは、凝固を意味するKoagulationの略である。その作用機構は、図2に示すように、タンパクのグルタミン酸残基にカルボキシル基を導入する酵素 γ -carboxylaseの補酵素として働くことであり、Gla残基の2つのカルボキシル基が Ca^{++} をキレートすることにより、凝固因子が凝固能を獲得する。ごく最近まで、ビタミンKの役割は、凝固因子の活性化のみと理解されてきたが、近年それ以外、特に骨・血管での作用が注目されつつある。

表2 各組織におけるビタミン K 依存性タンパクと K 欠乏症の指標

組織	K 依存性タンパク	各組織の K 欠乏症
肝臓	凝固因子	血液凝固異常 PIVKA-II
骨	Osteocalcin (BGP) MGP (matrix Gla protein)	Undercarboxylated osteocalcin
血管	MGP	

ビタミン K の役割
 肝臓 : 血液凝固因子の活性化
 肝臓以外: 骨 …… 骨形成の調節
 血管 … 石灰化の調節

1. ビタミン K 依存性タンパク

ビタミン K 依存性に Gla 化されるのは凝固因子に限らない(表2)。骨の基質タンパク中最も多いのはコラーゲンであるが、他にも多種類の非コラーゲンタンパクが存在し、固有の機能を有している。オステオカルシン(osteocalcin, 別名 bone Gla protein: BGP)は骨基質タンパクであり、ビタミン K 依存性に Gla 化を受ける。Gla 化を受けていないオステオカルシン(undercarboxylated osteocalcin: ucOC)の血中濃度は、骨におけるビタミン K 作用不足の鋭敏な指標となる。

2. ビタミン K 摂取と骨折

図3は、ビタミン K 摂取量と大腿骨頸部骨折の関係を示し、明らかにビタミン K 摂取量の増加は骨折の減少と関連している³⁾。また図4は、血液中 ucOC 濃度と大腿骨頸部骨折の関連を示したデータである⁴⁾。大腿骨頸部骨折の発生は、骨密度(BMD)低値により 2.4 倍、ucOC 高値により 1.9 倍、BMD 低値と ucOC の両者を持っていた場合、5.5 倍にも増加していた。このことは ucOC 高値、すなわち骨におけるビタミン K の作用不足は、BMD 低値とは独立した骨折の危険因子であることを示している。

3. 肝臓と骨・血管に対するビタミン K 作用の相違

消化管から吸収されたビタミン K は、まず肝臓において血液凝固因子の Gla 化に使われ、その後、骨・血管で作用する。すなわち肝臓を通過しえたもののみが骨に働くわけで、肝臓では充足しても骨では不足がありうる。この現象を first

図3 ビタミンK摂取量と大腿骨頸部骨折リスク³⁾

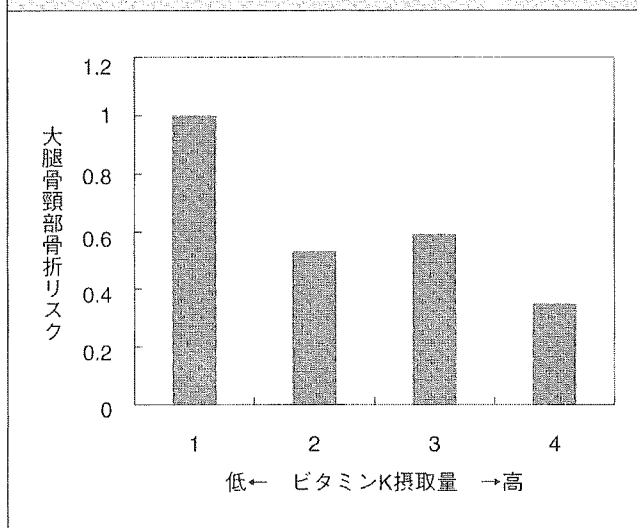
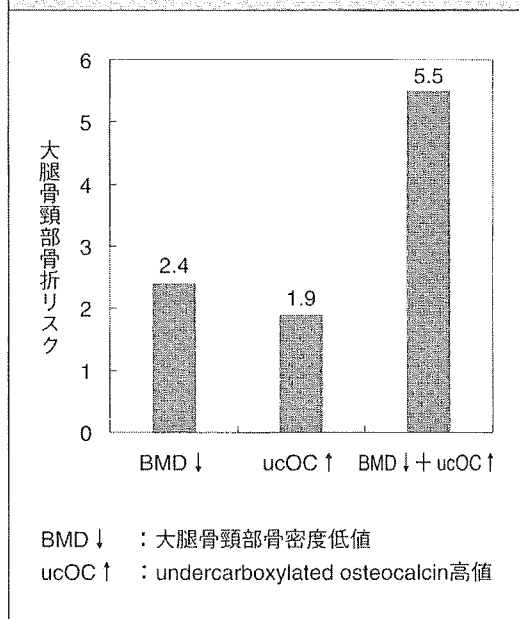
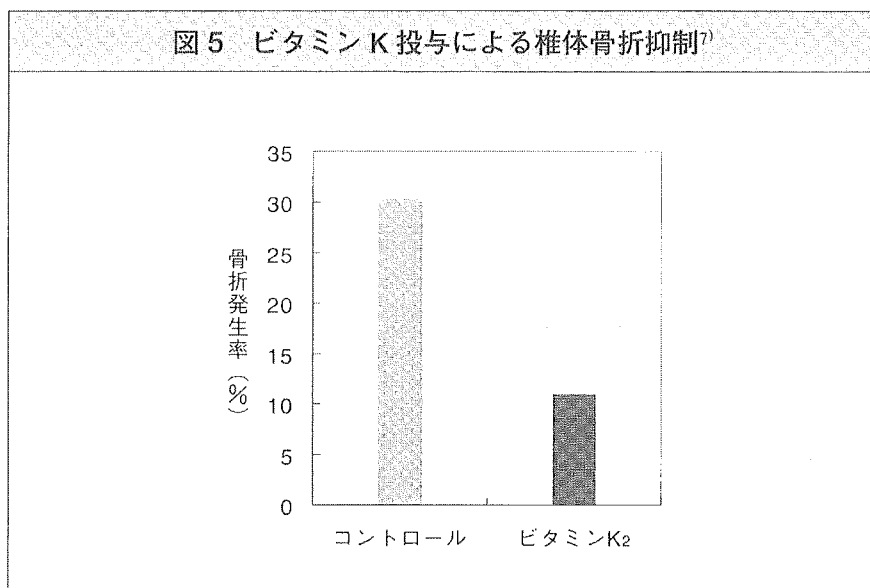


図4 大腿骨頸部骨折のリスク⁴⁾



pass effect と呼ぶ。ワーファリンと少量のビタミン K を同時に投与されたラットは、出血傾向は示さなかったが、動脈壁は石灰化した。すなわちこのラットにとって、肝臓ではビタミン K が充足しているが、血管では不足しているわけで、肝臓とそれ以外の臓器ではビタミン K の必要量が異なることは明らかである。

この点は骨粗鬆症の治療(薬物療法)に関するガイドラインにおいても考慮されており、「本剤の投与量は通常 1 日 45 mg である。この投与量は、通常ビタミン K 欠乏症の血液凝固機能を回復させる投与量の数倍の量である。これは、血液凝固が肝臓で発揮されるのに対し、骨粗鬆症では肝臓を通過しえた薬剤のみが骨に働く first pass effect があるためと考えられている」と記載されている⁵⁾。しかし残念ながら、第 6 次改定日本人の栄養所要量においては、この点は配慮されておらず、「ビタミン K - 基本的な考え方」として、「ビタミン K は、プロトロンビンやその他の血液凝固因子を活性化することにより、血液の凝固を促進する。また、骨に存在するタンパク質オステオカルシンを活性化し、骨の形成を促すことも知られている。しかし、ビタミン K 欠乏症が明確に認められているのは、血液凝固に関してのみである」と記載されている¹⁾。



骨粗鬆症治療におけるビタミンD・ビタミンKの意義

2つの点から考察したい。まず近年ビスフォスフォネート系薬剤を中心に、大規模臨床試験の結果、これら治療が骨折を抑制することが示されているが、注意すべきは多くの場合、試験はビタミンD・カルシウム欠乏症を補正した上で行われていることである。例えばセドロネートに関するVERT Studyでは、全例にCa 1,000 mgを投与するとともに、血清25(OH)D濃度低値の場合、最大1日500 IUのビタミンDを投与している⁶⁾。一方、日常臨床ではビスフォスフォネートが単独投与される例も少なくない。ビタミン欠乏症があった場合でも臨床試験の場合と同等に効くのかどうか、今後の研究が望まれる。

2点目として、ビタミンD、ビタミンKともそれ程骨密度を増やす薬剤ではないが、このことをどう考えるべきであろうか。最近の定義において、「骨粗鬆症とは、骨量の低下と、骨の微細構造の劣化を特徴とする疾患であり、そのために骨折の危険が増した状態である」あるいは「骨粗鬆症は骨強度が低下して、骨折の危険が増した状態である。骨強度は骨密度と骨質によって主に規定される」と述べられている。明らかに、骨粗鬆症治療は骨量重視から骨強度重視の時代になってきており、治療の目標は骨折の抑制である。実際、ヒッププロテクターは、骨量は増やさないが、骨折は減らす。ビタミンK投与は骨折を抑制することが報告されている(図5)⁷⁾。

まとめ

ビタミンDとビタミンKは骨にとって必須の栄養素である。現行の栄養所要量は、ビタミンDについては重症の骨軟化症を起こさない量として設定されているが、最近それより軽度の欠乏 (vitamin D insufficiency) でも二次性副甲状腺機能亢進症を介して、骨粗鬆症・骨折の原因となることが明らかとなった。また現在、ビタミンKの所要量は、凝固異常を起こさない量として設定されているが、ビタミンKは骨に必須の栄養素であることが明らかになりつつあり、しかも骨に対しては、肝臓での凝固因子活性化より、はるかに多量のビタミンKを要することから、肝臓以外の作用をも考慮した、所要量の策定が必要である。おそらくこれらビタミンの充足されていることは、骨にとって極めて重要であり、今後のエビデンスの集積が待たれる。

【文献】

1. 健康・栄養情報研究会：日本人の栄養所要量-食事摂取基準 1999, 第一出版, 東京.
2. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL and Finkelstein JS: Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 338: 777-783, 1998.
3. Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas J, Schaefer EJ, Dawson-Hughes B and Kiel DP: Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 71: 1201-1208, 2000.
4. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K and Delmas PD: Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 719-724, 1997.
5. 骨粗鬆症の治療(薬物療法)に関するガイドライン. *Osteoporosis Japan* 6: 203-253, 1998.
6. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group: Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial. *JAMA* 282: 1344-1352, 1999.
7. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C and Miura M: Vitamin K 2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15: 515-521, 2000.

内科医に必要な栄養管理の知識

疾病における栄養管理

骨粗鬆症

田中 清*

Key Words

骨粗鬆症
カルシウム
ビタミンD
ビタミンK

* 京都女子大学家政学部食物栄養学科

はじめに

わが国では、骨粗鬆症は整形外科の疾患と考えられがちであるが、もっと内科医が関わるべき疾患である。本稿では最初に内科医からみた骨粗鬆症の位置づけを述べ、それに次いで骨粗鬆症の栄養的側面を記す。

成人病・生活習慣病としての骨粗鬆症

骨粗鬆症は“骨量の低下と、骨の微細構造の劣化を特徴とし、骨折の危険が増した状態”と定義される。“危険が増した状態”であり、“骨折したもの”ではない。すなわち、リスクの高い例に対して、骨折を防ぐために治療するのであり、無症状の高血圧・高脂血症・糖尿病を治療するのと同じ考え方である。すなわち、骨粗鬆症は、成人病・生活習慣病である。実際骨折しない限り骨粗鬆症は基本的に無症状の病気である。

骨粗鬆症の診断

骨密度 (Bone Mineral Density; BMD) の測定は専用の装置を用いて行われる。骨密度は

20 歳代にピークとなり、閉経前から減少する。ピーク時の値 (Young Adult Mean; YAM) を 100%とした時の値を T 値という。T 値が 70%未満のものを骨粗鬆症、70 ~ 80%のものを骨量減少とする。さて同年齢平均を 100%とした際の値を Z 値というが、骨粗鬆症の診断は T 値によるのであり、Z 値ではない。するとある程度高齢者になると、骨粗鬆症の頻度が非常に高いことになるが、それでよいのであろうか。

閉経と骨粗鬆症

骨は骨吸収と骨形成を繰り返している (骨のリモデリング)。通常は骨吸収 = 骨形成であり骨量は増減しないが、骨吸収 > 骨形成となると骨粗鬆症になる。骨粗鬆症の原因として最も重要なのは閉経である。女性ホルモンは、骨吸収を抑制しており、閉経後骨吸収が異常亢進する。二次的に骨形成も亢進するが、全体としては骨吸収亢進が勝り、閉経期骨粗鬆症となる。骨形成・骨吸収とも亢進しているので、高回転型と呼ばれる。最近、骨粗鬆症患者数増加の理由の一つが、女性の平均寿命が 80 歳を超えても、閉経は 50 歳前後で起

ることであり、だから骨粗鬆症が増加しているとも考えられる。骨粗鬆症は多分に退行性疾患であり、高齢者での頻度が高いことは当然とも言える。

骨粗鬆症治療の必要性

骨粗鬆症を治療するのは、骨折発生率が増えるためである（椎体圧迫骨折・大腿骨頸部骨折・橈骨遠位端骨折）。特に大きな問題となるのは大腿骨頸部骨折で、高齢者を長期臥床させると合併症を起こすので、できる限り早期に手術する。しかし、大腿骨頸部骨折は受傷後1年以内の死亡率が高い上に、かなりの例が介護を要するようになっている。

椎体圧迫骨折は患者数が極めて多いにも拘わらず、軽く見られがちである。しかし、圧迫骨折数が増加すると、患者 QOL は確実に低下する。QOL は患者立脚の健康評価である。すなわち、第三者の目には圧迫骨折は大したことがないように見えても、本人にとってはかなりの苦痛になっているのである。

生体におけるカルシウムの役割

海水はカルシウムを豊富に含むので、海に住む生物にはカルシウム欠乏の心配はないが、陸上生物はカルシウム不足になりやすい。こ

のため、魚ではカルシウム低下ホルモン（カルシトニン）の効力は強いが、カルシウム上昇ホルモンである副甲状腺ホルモン（PTH）・ビタミンD系は未発達である。一方、陸上生物ではPTH・ビタミンD系はよく発達しているが、カルシトニンは退化傾向である。甲殻類の甲羅は外骨格として体を守る役割しか持たないが、陸上生物の骨は支持組織とカルシウム貯蔵庫という2つの役割を果たしている²⁾。

細胞外カルシウム濃度は細胞内カルシウム濃度の1,000倍以上という極端な濃度勾配を示し、この濃度勾配、すなわち血清カルシウム濃度の維持は生命に不可欠である。血清カルシウムが低下傾向になると、PTH分泌が亢進し（二次性副甲状腺機能亢進症）骨吸収が起こり、血清カルシウムは正常化する。カルシウム調節ホルモン系が正常である限り、カルシウム摂取不足であっても、低カルシウム血症にはならないが、骨のカルシウムは確実に低下する。

ビタミンD

ビタミンDの古典的欠乏症は、石灰化障害を示すクル病・骨軟化症である。しかし、最近血液中ビタミンD濃度が測定できるように

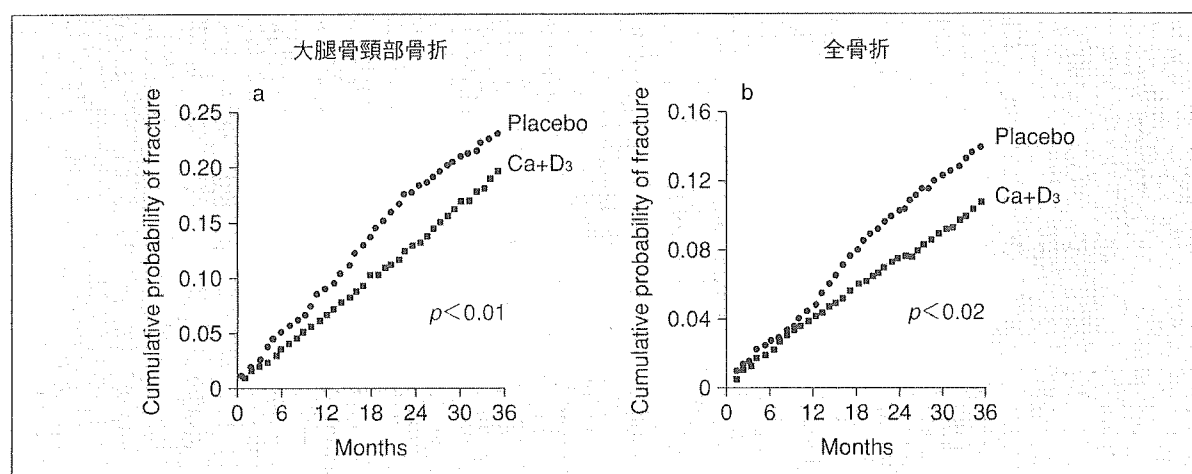


図1 ビタミンD投与による骨折予防効果 [文献3) より引用]

なると、重症の deficiency (欠乏) を来たすほどではなく、より軽症の insufficiency (不足) であっても、二次性副甲状腺機能亢進症・骨粗鬆症の原因となることが明らかとなり、その頻度は非常に高い。ビタミンD欠乏者に補充を行うと、特に非椎体骨折が減少する³⁾ (図1)。カルシウムが乳製品・魚に多く含まれることは有名だが、ビタミンDは圧倒的に魚に多い。高齢者におけるビタミンD栄養の重要な規定因子は、日照量と魚の摂取量である。

ビタミンK

最近までビタミンKの唯一の作用は、血液凝固因子の活性化と考えられていたが、近年骨の基質タンパクであるオステオカルシンの γ -carboxylation にも不可欠であり、carboxylation を受けていない undercarboxylated osteocalcin (ucOC) の血中濃度高値は大腿骨頸部骨折の危険因子であると報告されている⁴⁾ (図2)。日本ではビタミンK₂製剤が臨床で用いられており、その骨折抑制効果は来年発表される見込みである。

他の微量栄養素

ビタミンAの過剰摂取が骨折の危険因子であると報告された⁵⁾。また、血中ホモシステ

イン濃度高値は動脈硬化の危険因子として有名だが、最近血中ホモシステイン濃度の高い群では骨折発生のリスクが高いことが報告された⁶⁾。ホモシステインはB群ビタミン(B₆・B₁₂・葉酸)欠乏にて増加するので、この現象がホモシステインの直接的作用か、これらビタミン欠乏の効果を表すものかについては、今後の検討課題である。さらに、strontium ranelate が骨折を著明に抑制することが示された⁷⁾。これが微量元素としての効果を示すのかどうかは不明であるが、ヨーロッパでは治療薬として市販され、日本でも臨床試験中である。

骨粗鬆症治療における栄養の意義

最近世界的に注目されているのは、強力な骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート製剤であり、骨折発生を著明に減少させる。また最近子宮・乳腺には作用しない SERM (Selective Estrogen Receptor Modifier) と呼ばれる女性ホルモン誘導体も最近臨床で使用されている。言うまでもなく、カルシウム・ビタミンは栄養素である。従ってビスフォスフォネート欠乏症はなくても、カルシウム・ビタミン欠乏症は存在する(ビタミンD誘導体の、ビタミンの補充以外の作用にはここでは触れない)。大規模臨床試験のほとんどは、カルシウム・ビタミンDを補充後行われている点に注意する必要がある。すなわち、これらが充足していることはこれら成績の前提になっている。

ビタミンD栄養状態の最もよい指標は血清 25(OH)D測定、骨におけるビタミンK欠乏の鋭敏な指標は血清 ucOC だが、いずれも保険採用されていない。従って、現状では高齢者に対してはビタミン欠乏症の頻度がかかり高いことを念頭において、他の治療の基礎薬として積極的に併用するという対応になる。

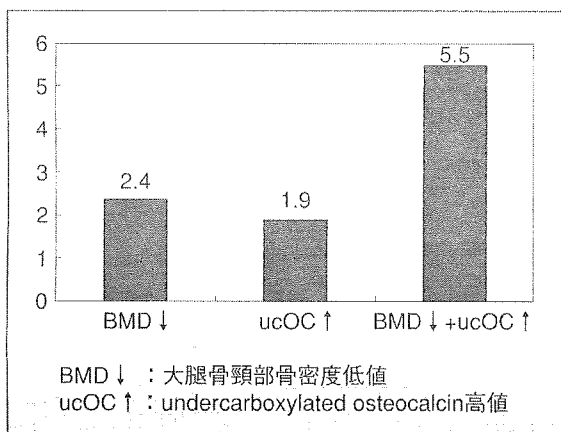


図2 大腿骨頸部骨折のリスク (文献4) より引用

カルシウム・ビタミンD 過剰投与

基本的にこれらは安全な薬剤だが、特に高齢者で腎機能が低下している例では、過剰投与に対する注意が必要である。カルシウム剤併用下に、 1α (OH) D₃ 製剤を $1\mu\text{g}$ 以上漫然と投与している場合などでは、血清クレアチニン濃度上昇をきたす例があり、血清・尿中カルシウム濃度のチェックが必要である。血清カルシウム濃度が上昇するとPTH分泌が抑制され、尿細管でのカルシウム再吸収が低下するので、尿中カルシウム排泄増加は、ビタミンD過剰投与の敏感な指標である。

おわりに

最初に述べたように、わが国では骨粗鬆症に対する内科医の関与は少ない。しかし、骨粗鬆症は退行性疾患の要素を多分に持つ成人病・生活習慣病である。また他の慢性疾患を合併する例も非常に多い。ビタミン欠乏症をはじめ、低栄養は明らかに骨折の重要な危険因子である。栄養をはじめとする全身管理に

において内科医の果たす役割は大きい。整形外科医・産婦人科医など、他の診療科と協力することは当然であるが、今後内科医のより積極的な関与が望まれる。

文 献

- 1) Yoh K et al.: J Bone Miner Metab 23 (2):167-173, 2005
- 2) 早川太郎・他: 第3版, 口腔生化学, 医歯薬出版, 2000
- 3) Meunier PJ et al.: Osteoporos Int 4 (Suppl 1):71-76, 1994
- 4) Vergnaud P et al.: J Clin Endocrinol Metab 82:719-724, 1997
- 5) Michaelsson K et al.: N Engl J Med 348:287-294, 2003
- 6) van Meurs JBJ et al.: New Engl J Med 350:2033-2041, 2004
- 7) Meunier PJ et al.: N Engl J Med 350 (5):459-468, 2004

著者連絡先

(〒605-8501)
京都市東山区今熊野北日吉町 35
京都女子大学家政学部食物栄養学科
田中 清
[E-mail: tanakak@kyoto-wu.ac.jp]

栄養についての評価

田中 清^{*1)} 中西 祐子^{*2)} 木戸 詔子^{*3)}

骨に必要な栄養素の中で、カルシウムは高い peak bone mass の達成に有効であるが、カルシウムと骨折の関連は議論の余地がある。ビタミンDは軽度の不足であっても、骨粗鬆症・骨折の原因となり、高齢者では頻度が高い。また低タンパクは骨に対する悪影響に限らず、転倒のリスクを増加させる。その他の栄養素に関しても骨粗鬆症との関連を示唆する報告がなされており、骨と栄養については、今後より広い視野での考察が求められる。なお栄養の特殊性として、国別の相違が極めて大きいので、WHO（世界保健機関）のレポートを参考にしつつも、他の分野にも増して日本における調査研究が必須である。

The role of nutrition in the treatment of osteoporosis

Kyoto Women's University, Department of Food and Nutrition

Kiyoshi Tanaka, Yuko Nakanishi, Shoko Kido

Calcium intake was reported to be associated with peak bone mass. Vitamin D insufficiency, which is less severe than deficiency, is prevalent in the elderly and known to cause osteoporosis. Protein malnutrition increases the fracture risk due to decreased bone mineral density and muscle weakness. Other nutrients have also been reported to be associated with osteoporosis. Thus nutritional aspect of osteoporosis should be interpreted from the broader perspectives. Since nutritional status greatly varies from one nation to another, we must add our original evidence in Japan to the report from WHO.

はじめに

骨粗鬆症の治療の中で、栄養に関する内容は国ごとの違いが非常に大きい。本稿においては、WHO（世界保健機関）テクニカルレポート（以下WHOと略す）の内容を主に紹介するが、必要に応

じてわが国の状況を述べる。また末尾に、WHOに触れられていない、骨と栄養に関する最近の話題を若干あげる。なお日本では、栄養素の摂取基準は5年ごとに全面改定され、第6次改訂日本人の栄養所要量が使われてきたが、平成17(2005)年

*京都女子大学家政学部食物栄養学科 ¹⁾教授(たなか・きよし) ²⁾(なかにし・ゆうこ) ³⁾教授(きど・しょうこ)