

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
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

- 1) 小嶋美穂子, 青木茂, 津田泰三, 原田浩之: トータルダイエツト分析によるビタミンの1日摂取量の推定. 日本栄養・食糧学会誌 43, 362-66 (1990).
- 2) 齋藤由紀, 牛尾房雄: トータルダイエツト調査による東京都民のピオチン、ビタミン B₆、ナイアシンの一日摂取量の推定. 栄養学雑誌 62 : 165-169 (2004).
- 3) 渡邊敏明, 谷口歩美: トータルダイエツト調査によるピオチン摂取量の推定についての検討. 日本臨床栄養学会雑誌 27(3) : 304-312 (2006).
- 4) Junshi Chen , Junquan Gao :The Chinese Total Diet Study in 1990. Part II . Nutrients. Journal of AOAC International 76, 1206-1213 (1993).
- 5) Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA : Dihydrovitamin K₁ :Primary food sources and estimated dietary intakes in the American diet. Lipids 31, 715-720 (1996).
- 6) Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA : Food sources and dietary intakes of vitamin K-1 (phylloquinone) in the American diet : Data from the FDA total diet study. J Am Diet Assoc 96, 149-154 (1996).
- 7) Ginevra Lombardi-Boccia, Altero Aguzzi, Marsilio Cappelloni, Giuseppe Di Lullo and Massimo Lucarini : Total-diet study : dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy British Journal of Nutrition 90, 1117-1121(2003).
- 8) D.B.Clarke, A.S.Lloyd : Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK Total Diet Study. Food Additives and Contaminants 21, 305-316 (2004).
- 9) 厚生労働省 : 平成 15 年度国民健康・栄養調査報告. 第一出版, 東京, 11-16, 77-89 (2006) .
- 10) 厚生労働省 : 日本人の食事摂取基準 (2005 年版). 第一出版, 東京 (2005) .
- 11) 柴田克己, 真田宏夫, 湯山駿介, 他 : ナイアシン代謝産物排泄量からみた高齢者におけるナイアシン栄養の評価. ビタミン 68, 365-72 (1994).
- 12) 平岡真実, 安田和人 : 女子大学生のビタミン B₁₂, 葉酸栄養状態について—血清ビタミン B₁₂, 葉酸濃度の分布範囲—. ビタミン 74, 271-80 (2000) .
- 13) Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, et al : Vitamin intake in Japanese woman college students. J Nutr Sci Vitaminol 49, 149-55 (2003).

Ⅲ. 分担研究者の報告書

7. カロテノイドの必要量

分担研究者 寺尾 純二 徳島大学大学院 教授
研究協力者 板東 紀子 徳島大学大学院 教務員

研究要旨

活性酸素 (ROS) による血漿 LDL の酸化変性は動脈硬化を惹起する初発反応として重要である。一方、HDL は組織コレステロールの逆転送作用や LDL に対する抗酸化作用を発揮することにより、抗動脈硬化機能を発揮すると考えられている。したがって、ROS による HDL の酸化変性も動脈硬化発症に関与する可能性がある。一方、ルテインは野菜果実に広く存在する含酸素カロテノイドの一種であり、いくつかの疫学研究において血漿ルテイン濃度と心疾患発生リスクには負の相関があることが示されている。しかし大規模介入試験では炭水素カロテノイドである β -カロテンの大量摂取により心疾患の発生リスクが増加したことも報告されている。そこで、本年度は HDL へのルテインの取り込み挙動を β -カロテンの場合と比較するとともに、LDL、HDL の酸化安定性に対する β -カロテンおよびルテインの影響を検討した。ヒト血漿にルテインあるいは β -カロテンを添加した後、超遠心分画法により LDL と HDL を調製した。これらのリポタンパクをアゾラジカル発生剤で強制酸化することにより酸化安定性を評価した。ヒトボランティアにルテインと β -カロテンを高含有するホウレン草ピューレを 1 週間摂取させた後の血漿から LDL と HDL を調製し、同様の実験を行った。その結果、ヒト血漿ルテインと β -カロテン両者を添加した場合、HDL にはルテインのみが取り込まれたが、HDL の酸化安定性にはルテインの取り込みは影響しなかった。一方、LDL では β -カロテンの取り込みにより酸化安定性の低下がみられた。しかしヒト摂取実験では β -カロテンの LDL への蓄積は酸化安定性に影響しなかった。HDL にはルテインが選択的に蓄積したが、この場合も酸化安定性には影響しなかった。以上の結果から、 β -カロテンおよびルテインを食事成分として大量摂取した場合には、血漿に移行したそれぞれのカロテノイドがプロオキダントとして害作用をもたらす可能性は低いと考えられた。

A. 目的

カロテノイドは自然界に広く存在し、これまでに約 500 種類が発見されている。また、緑黄色野菜などの植物性食品に多く含まれている。カロテノイドは、長鎖の共役二重結合を持つことから、一重項酸素分子消去作用や、ラジカル捕捉作用といった抗酸化作用を有すると考えられている。さらに、血漿リポタンパク質に蓄積されるためその酸化変性を抑えるといわれている。動物実験ではカロテン摂取により動脈硬化の進展を予防したという報告もある。カロテノイドを構造から分類すると、酸素を含まない炭化水素カロテノイド (β -カロテンなどのカロテン類やリコペン類) と含酸素カロテノイド (ルテインなどのキサントフィル類) に分けられる。 β -カロテン、ルテインはそれぞれの代表的なカロテノイドであるが、構造上の違いからリポタンパク質中の分布に相違がみられる。一般的に、極性の低い β -カロテンは LDL に、極性の高いルテインは、HDL に蓄積されやすいといわれている。

カロテノイドは生体内の低酸素分圧 (15torr) では抗酸化活性を示すが、高酸素分圧 (760torr) では逆に酸化を誘導するプロオキシダントとして作用することが報告されている。B-カロテンは培養細胞において酸化促進作用を発揮することも示されている。ヒトにおいて少量のカロテノイド摂取ではアンチオキシダントとして働くが、大量のカロテノイドを摂取した場合にはプロオキシダントとして作用する可能性も示唆されている。ただし、食品成分としてカロ

テノイドを多量摂取した場合、吸収されたカロテノイドが血液中で酸化促進的に働くのか、あるいは抗酸化的に働くのかについては明らかではない。さらに LDL の酸化されやすさに対するカロテノイド摂取の影響についての報告は多数あるが、HDL については全く不明である。そこで本年度は血漿カロテノイドの機能発現のための必要量と安全摂取量を明らかにすることを目的として、通常以上の多量なカロテノイドの摂取が HDL の酸化安定性に与える影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト血漿に対する β -カロテンおよびルテイン添加実験 (*in vitro* 実験)

ヒト新鮮血から得た血漿に 5 μ M の β -カロテンおよびルテインを添加し、37°C で 1 時間インキュベーション後密度勾配遠心法にて LDL と HDL 画分を調製した。リポタンパクに蓄積したカロテノイドを逆相 HPLC にて定量した。リポタンパクの酸化安定性を評価するために LDL あるいは HDL の PBS 溶液 (0.2 mg protein/ml) にアゾラジカル発生剤(AAPH; 0.2 mM)を添加して、37°C でインキュベーションした。6 時間反応後の反応液をとり、脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) 測定 (ロダン鉄法) を行った。LOOH 測定には測定キットを用いた。

ヒトによる高カロテノイド含有食品摂取実験 (*ex vivo* 実験)

健康人被験者 (24 才男性) は摂取 1 週間前からサプリメント類を摂取禁止し、緑黄色野菜の摂取も極力さけた。実験開始から 1

日 160 ml 缶入りニンジンジュース 3 缶（トータルで β -カロテン 31.2 mg 摂取）あるいは 1 日ほうれん草ピューレ 450 g（トータルで β -カロテン 22.3 mg、ルテイン 35.0 mg）を 1 週間連続摂取させた。採血後、上記と同じ方法で血漿 LDL、HDL 画分を得て、カロテノイド蓄積量を測定するとともに、アゾラジカル発生剤を用いた酸化反応を行った。

C. 結果と考察

ヒト血漿に対する β -カロテンおよびルテイン添加実験 (*in vitro* 実験)

用いたヒト血漿リポタンパクにおいて LDL ではルテインに比べ β -カロテンが多く存在し、HDL では同程度存在した。一方、血漿に添加した場合、ルテインは LDL、HDL ともに蓄積したのに対し、 β -カロテンは LDL のみに蓄積した (Fig.1)。したがって、ルテインの方が両リポタンパクともに蓄積されやすいことが明らかである。アゾラジカル発生剤を用いた LDL、HDL の酸化安定性に対するそれぞれのカロテノイド添加の影響を Fig. 2 に示した。 β -カロテンが蓄積しやすい LDL では酸化促進作用がみられたが、ルテインでは LDL、HDL ともに促進作用はみとめられなかった。血漿への β -カロテンの添加濃度である 5 μ M はヒトへの高カロテン摂取介入試験で報告されている濃度範囲である。したがって、 β -カロテンは大量摂取により LDL に対してプロオキシダントとして作用する可能性が示された。一方、ルテインは同様に摂取してもプロオキシダント作用は起こりにくいかもしれない。

ヒトによる高カロテノイド含有食品摂取実験 (*ex vivo* 実験)

ニンジンジュースを摂取した場合、 β -カロテンは LDL の方が HD よりも蓄積しやすいことが確認された (Fig. 3)。なお、LDL への蓄積量は *in vitro* 実験の場合とほぼ同じであった。一方、酸化安定性を示す LOOH 生成量には LDL、HDL ともに相違はみられなかった。したがって、今回設定した量のニンジンジュース摂取では上記の *in vitro* 実験で示された LDL のプロオキシダント作用はおこらないと思われた。これは *in vitro* と *ex vivo* では LDL 粒子における β -カロテンの局在分布が異なるためであると考えられる。また、ニンジンジュース摂取では他の機能性成分による作用が β -カロテンのプロオキシダント作用をうち消した可能性もある。ほうれん草ピューレ摂取では、LDL、HDL ともにルテイン含量は増加したが、 β -カロテン含量は変化しなかった。この原因は不明であるが、ルテインの共存が β -カロテンの吸収蓄積を抑制した可能性も考えられる。LDL、HDL ともにルテイン含量の増加は酸化安定性に影響しなかった。したがって、ルテインの大量摂取は血漿リポタンパクの酸化安定性に影響しないと考えられた。今回の実験における β -カロテン、ルテイン摂取量はヒト介入試験で発ガン促進作用がみられた摂取量に近いレベルである。さらに多くの実験を積み重ねる必要はあるものの、今回の結果から食事成分としてのカロテノイドを大量摂取しても血漿にプロオキシダント作用が起こる可能性は低いと思われた。

D. 研究発表

1. 発表論文 (学会発表)

中嶋いく子、関戸啓子、寺尾純二 「HDLの酸化安定性と抗酸化機能に及ぼすβ-カロテンおよびルテインの影響」 平成17年度日本栄養食糧学会中国四国支部大会 (徳島)

E. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 引用文献

なし

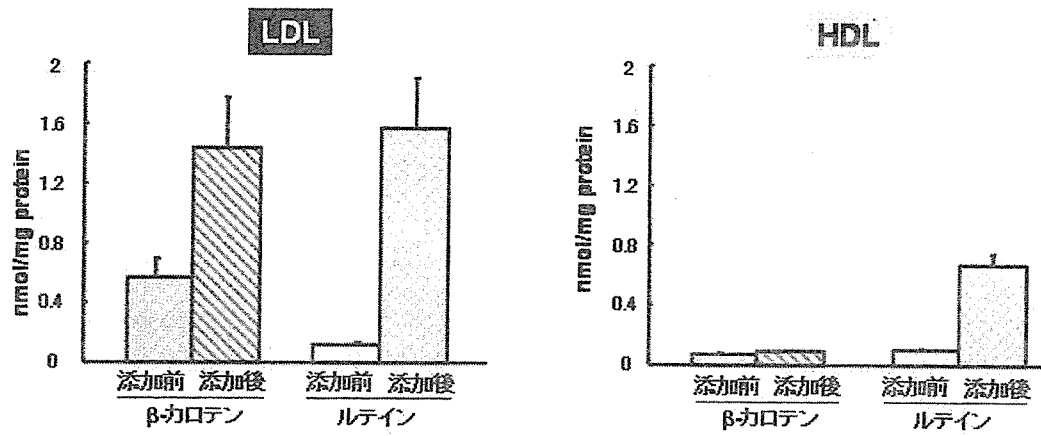


Fig. 1. β-カロテンおよびルテインの血漿への同時添加によるリポタンパクへの分布蓄積

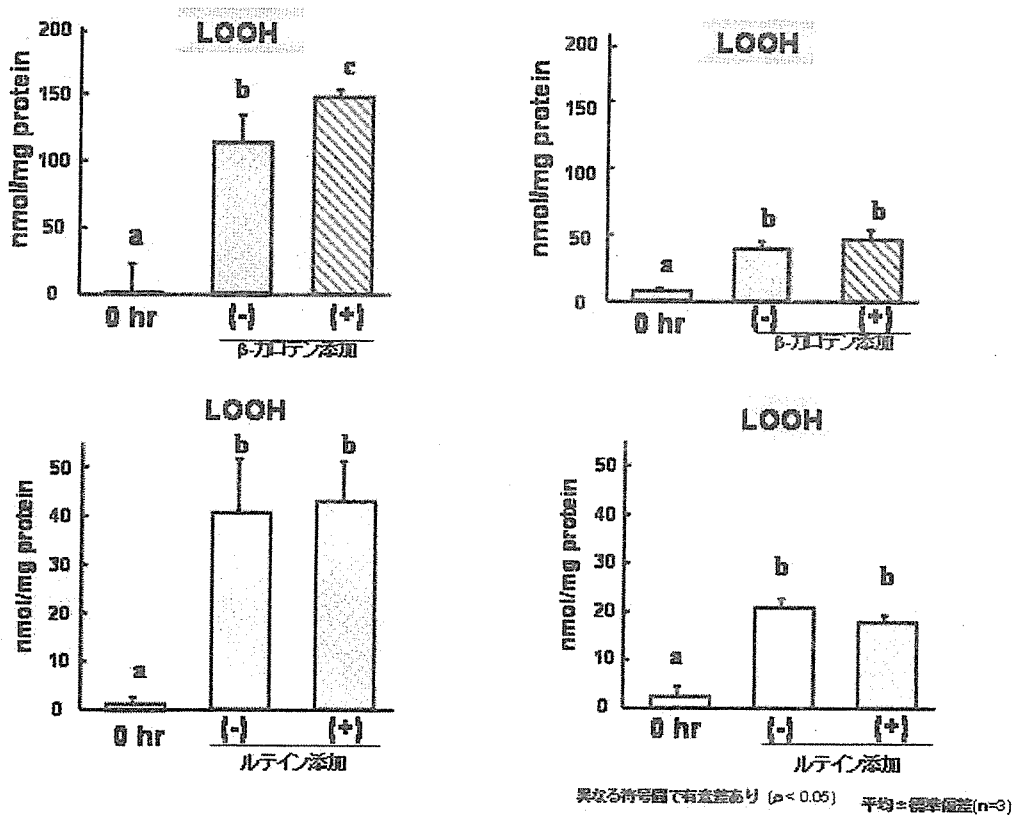


Fig.2. LDL と HDL の酸化安定性に対する添加 β-カロテンおよびルテインの影響

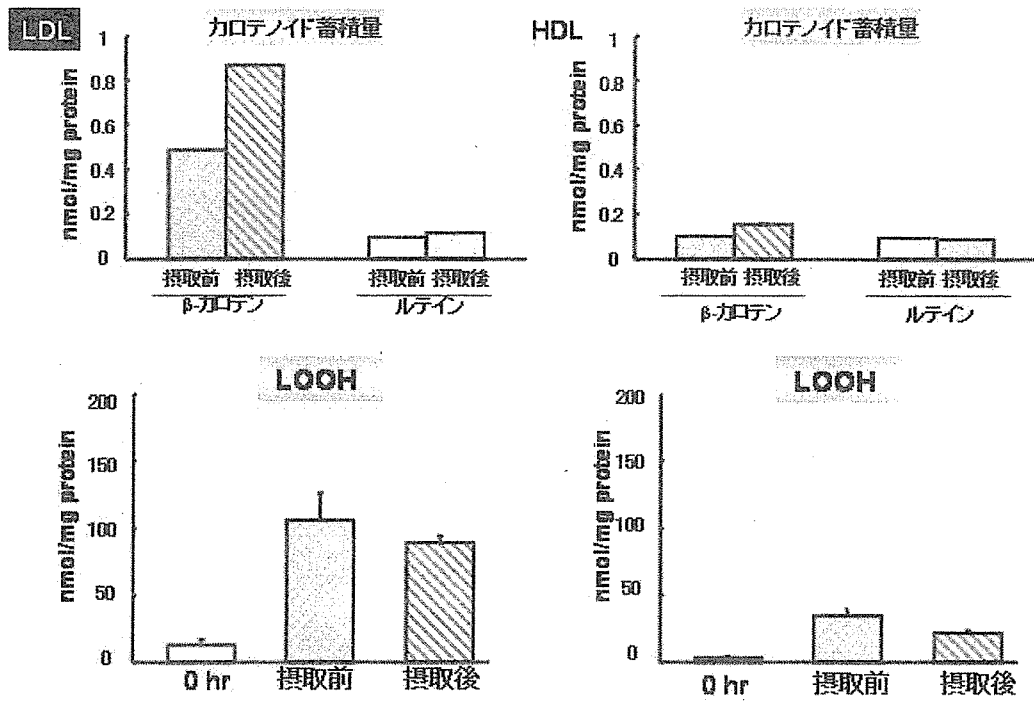


Fig.3. LDL および HDL の酸化安定性に対するニンジンジュース摂取の影響

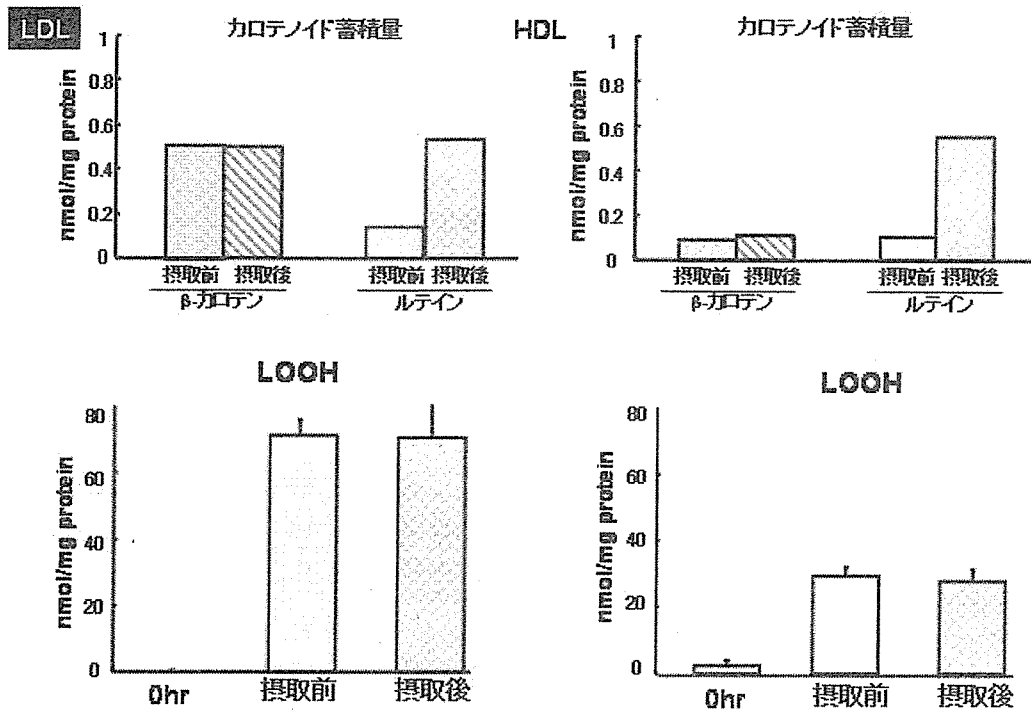


Fig. 4. LDL および HDL の酸化安定性に対するホウレン草ピューレ摂取の影響

Ⅲ. 分担研究者の報告書

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

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

研究要旨

日本人の脂溶性ビタミンの栄養状態と食事摂取量との関係を示す栄養調査研究は少なく、食事摂取基準の策定には欧米のデータが中心に用いられている。平成 16, 17 年度には、日本人の栄養調査データの集積を目的として、LC-APCI /MS /MS および蛍光検出 HPLC 法による正確かつ高精度な血中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量法を開発した¹⁻³。今年度は、母乳中濃度が低いビタミン D 類の濃度をより正確に測定するため、ビタミン D 測定法の高感度化をおこなうとともに、確立した方法を用いて日本人授乳婦を対象とした栄養調査を実施した。本研究に同意した授乳婦 78 名につき調査を行った結果、哺乳量 780 mL/day として求めたビタミン A, E, D, K の推定 1 日摂取量は、368 µg (RE), 4.1 mg, 0.46 µg, 4.8 µg となり、ビタミン A, E, K は現行の食事摂取基準を満たし、ビタミン D は 2005 年版日本人の食事摂取基準（目安量 2.5 µg）よりも低値であった。また、思春期男女を対象にビタミン D およびビタミン K の栄養調査を行い、各々副甲状腺ホルモン (PTH) と非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) をビタミン D および K 栄養の潜在的不足マーカーとしてカットオフ値を評価した。ビタミン D の栄養調査では、血中 25 (OH)D 濃度を 20 ng/mL 以上に維持することが望ましいという結論を得た。ビタミン K の栄養調査では、骨の健康を考慮に入れた場合には現在の目安量よりも 1.5 倍程度の摂取量が必要である可能性が示唆された。さらに、「ビタミン摂取量が血液中と尿中のビタミン含量に及ぼす影響～生活習慣一次予防のための生体飽和量を求める研究～」の一環として、脂溶性ビタミンでは摂取量の増加と血中濃度上昇との関係の評価するとともに、ビタミン D については PTH 濃度を、ビタミン K については ucOC 濃度を不足のマーカーとして両ビタミンが充足する摂取量を評価した。

1. 血漿中および母乳中ビタミンD測定法の高感度化

【目的】

ビタミンD類の母乳中含量は低く、日本食品標準成分表(5訂増補)⁴では0.3 µg/100 g(代謝物も含むビタミンD換算値)とされている。我々は、より正確に血漿中および母乳中ビタミンD類濃度を把握するため、共役ジエン構造を標的としたラベリング試薬である4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-diene (DMEQ-TAD)^{5,6}によりビタミンD類を誘導体化し、LC-APCI/MS/MSの測定感度を高めることを試みた。

【方法】

(1) 血漿中ビタミンD類の抽出・測定
ヒト血漿200 µLをポリプロピレン製チューブにとり、ビタミンD内部標準物質エタノール溶液⁷⁾ 50 µLおよびアセトニトリル1.0 mLを加えて転倒混和後、10分間室温で放置した。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpmで10分間遠心分離し、アセトニトリル層を試験管に分取した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣を酢酸エチル1.2 mLに溶解し、蒸留水0.6 mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌した。3,000 rpmで10分間遠心分離し、酢酸エチル層を褐色試験管に分取した。残った水層に酢酸エチル0.6 mLを加えて再度抽出し、得られた酢酸エチル層を先の褐色試験管にあわせた。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで乾固した後、0.4% DMEQ-TAD酢酸エチル溶液75 µLを加え、30分間室温

にて放置した。再度、0.4% DMEQ-TAD酢酸エチル溶液75 µLを加えて、室温で60分間放置した後、エタノール0.75 mLを加えて過剰な試薬を分解した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をアセトニトリル80 µLに溶解し、30 µLを以下の条件のLC-APCI/MS/MSに適用した。なお、測定対象はvitamin D₃ (D₃)、vitamin D₂ (D₂)、25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃]、25-hydroxyvitamin D₂ [25(OH)D₂]及び24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25(OH)₂D₃]とした。

<HPLC条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)

オートインジェクター

: SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 mm i.d.×250 mm、5 µm、

資生堂社製)

移動相 : (A) アセトニトリル

(B) 水

0-5 min (A) : (B) =30 : 70

5-35 min (A)

30→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 (アプライドバイオサイエンス社製)

MS検出条件 :

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)

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。

血漿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 (10 ng)

V: 血漿量 (0.2 mL)

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

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

解凍後、超音波処理により均質化した母乳10.0 mLを褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質としてd₆-all-trans- retinol エタ

ノール溶液ⁱⁱ⁾ 50 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ⁱⁱⁱ⁾ 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°Cで60分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、1%塩化ナトリウム溶液 38 mL、ヘキサン: 酢酸エチル (9:1, v/v) 30 mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン: 酢酸エチル (9:1, v/v) 30 mL を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をヘキサン: 酢酸エチル (9:1, v/v) 2.5 mL に溶解し、このうち1.0 mL をビタミンA、E類測定用、1.5 mL をビタミンD類測定用とした。ビタミンD類測定用の溶液は、ロータリーエバポレーターで乾固した後、以下の条件のHPLCにて精製した。

<精製用 HPLC 条件>

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

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

ii) *d*₆-all-*trans*-retinol エタノール溶液：用時、*d*₆-all-*trans*-retinol acetate をアルカリけん化して調製した。ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1) 抽出液より得られた残渣を 2-プロパノールに溶解し、325 nm の吸光度 (A_{325 nm}) を測定した。以下の式に基づき *d*₆-all-*trans*-retinol 濃度を計算し、1 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。

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

iii) その他の内部標準物質エタノール溶液：*d*₆-β-carotene、*d*₇-D₃、*d*₆-25(OH)D₃、*d*₆-α-tocopherol、[¹⁸O₂]-phyloquinone (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。

【結果・考察】

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

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

血漿試料と同様に、母乳試料についても真度・精度を検討した。プール母乳 10 mL に D₃、D₂、25(OH)D₃ 10 ng 及び 25(OH)D₂ 10 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-2 に示すように 90-105% の良好な回収率が得られた。また、日内再現性の変動係数は 4-12% と概ね良好な結果が得られた。

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

2. 日本人授乳婦を対象とした脂溶性ビタミンの栄養調査

【目的】

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

【方法】

(1) 対象者

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

年齢 : 30.9 ± 4.5 歳 (18-39 歳)
出産後日数 : 37.0 ± 32.5 日 (3-179 日)
[1.2 ± 1.1 ヶ月 (0.1-5.9 ヶ月)]
在胎週数 : 39.3 ± 1.3 週 (36-42 週)
出産形態 : 経膣分娩 66 名
帝王切開 12 名
また、参考値として出産後6-11ヶ月の日本人授乳婦5名を対象に、母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定した。
年齢 : 28.6 ± 4.3 歳 (21-31 歳)
出産後日数 : 234.6 ± 31.4 日 (182-265 日)
[7.8 ± 1.0 ヶ月 (6.1-8.8 ヶ月)]

在胎週数 : 38.2 ± 1.0 週 (37-39 週)

出産形態 : 経膣分娩 4 名

帝王切開 1 名

(2) 母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量

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

前述の母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定と同様の操作によりおこなった。ビタミンD類については前述の条件で、ビタミンA、E類については以下の条件のLC-APCI/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

(4.6 mm i.d. × 250 mm、5 μm、
資生堂社製)

移動相 : (A) メタノール : 水 (90:10, v/v)

(B) アセトニトリル

0-10 min (A) 100 %

10-40 min

(B) 0→90%のグラジエント

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

流速 : 1.0 mL/min

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 検出条件 :

Precursor ion/product ion (m/z)

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

β -carotene (m/z : 537.6/177.1)
 α -tocopherol (m/z : 430.4/165.1)
 d_6 -all-trans-retinol (m/z : 275.2/192.4)
 d_6 - β -carotene (m/z : 543.6/180.1)
 d_6 - α -tocopherol (m/z : 436.5/171.1)

b. 母乳中ビタミンKの抽出・測定 (リパーゼ消化法)

母乳 3.0 mL を褐色のスクリュウcock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°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 を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

<HPLC 条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)

オートインジェクター

: SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 mm i.d.×250 mm、5 μ m、

資生堂社製)

移動相 : (A) メタノール : 水 (90:10, v/v)

(B) アセトニトリル

0-10 min (A) 100 %

10-40 min (B)

0→90%のグラジエント

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

流速 : 1.0 mL/min

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 検出条件 :

Precursor ion/product ion (m/z)

PK (m/z : 451.5/187.1)

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

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

[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には測定対象脂溶性ビタミン (5、20、100、500、2,500、12,500、62,500 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

V: 母乳量

c. 乳児の推定脂溶性ビタミン摂取量の算出

得られた母乳中脂溶性ビタミン濃度より、推定摂取量を以下の式にて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{推定摂取量} \\ & = \text{母乳中脂溶性ビタミン濃度} \times \text{平均哺乳} \\ & \text{量 (780 mL)}^7 \end{aligned}$$

ビタミンA 推定摂取量は、レチノール当量 (RE) とした。

$$\begin{aligned} & \text{レチノール当量 (RE)} \\ & = 1 \mu\text{g all-trans-retinol} \\ & \quad 12 \mu\text{g } \beta\text{-carotene} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} & \text{ビタミンD 推定摂取量} \\ & = D_3 + D_2 + 5 \times [25(\text{OH})D_3 + 25(\text{OH})D_2] \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} & \text{ビタミンK 推定摂取量} \\ & = PK + MK-4 + MK-7 \times 444.7/649 \\ & \quad 444.7 : \text{MK-4 の分子量} \\ & \quad 649 : \text{MK-7 の分子量} \end{aligned}$$

d. 血漿中脂溶性ビタミンの抽出・測定

ビタミンD 類については前述の方法で、その他の脂溶性ビタミンについては以下の方法で抽出・測定した。

ヒト血漿 0.5 mL を褐色のスクリュウコック付遠沈管にとり、内部標準物質として *d*₆-all-trans-retinol エタノール溶液 25 μL 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質エタノール溶液 25 μL、蒸留水 0.5 mL、ヘキサン：酢酸エチル (9:1, v/v) 3.0 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で5分間遠心分離した。有機層 2.5 mL を褐色試験管にとり、ロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をエタノール 200 μL に溶解し、50 μL を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用し、各脂溶性ビタミンを測定した。

e. 食事調査

授乳婦を対象とした食事調査は自記式食事歴法質問票により実施した。

f. 統計解析

SAS 社製 JMP 5.0.1J を用いた。

【結果】

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

現行目安量 2.5 $\mu\text{g/day}$ を大きく下回っていた。従って、専ら母乳のみで哺育される乳児において、現行のビタミン D 食事摂取基準値を満たすことは困難であると考えられる。また、出産後 0-5 ヶ月に比べ 6-11 ヶ月の母乳中脂溶性ビタミン濃度は、 D_2 、 $25(\text{OH})\text{D}_2$ を除き低値であった。

次に、出産後 0-5 ヶ月の授乳婦を対象として、各脂溶性ビタミンの母乳中濃度と関連因子との関係について検討した (表 2-2)。その結果、年齢と母乳中 $25(\text{OH})\text{D}_2$ 濃度間および出産後日数と母乳中 *all-trans-retinol*、 β -carotene、 α -tocopherol、PK、MK-4 濃度間に、有意な負の相関が認められた。また、母乳中脂質濃度と $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 α -tocopherol、PK、MK-4 濃度間に、有意な正の相関が認められた。各化合物のうち、母乳中濃度が血漿中濃度と有意な正の相関関係を示したのは、 β -carotene、 D_3 、 D_2 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $25(\text{OH})\text{D}_2$ および MK-7 であった。母乳中 MK-4 濃度についてはビタミン K 食事摂取量との間に有意な正の相関が観察された。また、出産形態の差異による母乳中脂溶性ビタミン濃度の差異はみられなかった。

さらに、母乳中および血漿中ビタミン D 濃度、ビタミン D 摂取量の季節間変動について検討した (表 2-3)。我々が以前に報告している血漿中 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度の季節変動⁸ より、1~3 月を冬季、7~9 月を夏季として 2 群間の比較をおこなったところ、母乳中 D_2 濃度は冬季に有意に高く、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度は夏季に有意に高かった。また、血漿中濃度は $25(\text{OH})\text{D}_2$ 濃度は冬季に、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は夏季に有意に高かった。食事摂取量

については 2 群間に差異はみられなかった。

【考察】

今回、新たに開発した高感度測定法により、日本人授乳婦の脂溶性ビタミン濃度を測定した。その結果、0-5 ヶ月の授乳婦より採取した母乳中 *all-trans-retinol* の平均濃度は $0.47 \mu\text{g/mL}$ であった。既報では、日本人の母乳中 *retinol* 濃度は、出産後 98 ± 7 日で $0.35 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ と報告されている⁹。また、出産後 21~89 日で $0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で $0.16 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ という報告もある¹⁰。今回得た結果は、これらの報告よりやや高値であった。母乳中 β -carotene 濃度については、初乳で高く (出産後 0 日目で $0.38 \mu\text{g/mL}$)、出産後約 3 ヶ月で $0.033 \mu\text{g/mL}$ まで低下すると報告されている⁹。また、出産後 21~89 日で $0.024 \pm 0.019 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で $0.025 \pm 0.015 \mu\text{g/mL}$ という報告もある¹⁰。今回の測定では平均 $0.064 \pm 0.063 \mu\text{g/mL}$ となり、また、出産後日数との間に有意な負の相関が観察された。これらの結果より算出したビタミン A の推定摂取量は平均 $368 \mu\text{g RE/day}$ となり、現行目安量の $250 \mu\text{g RE/day}$ と概ね同程度であった。

一方、ビタミン D 類については D_3 、 D_2 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 及び $25(\text{OH})\text{D}_2$ 濃度を測定した結果、それぞれの平均濃度は 0.092 ng/mL 、 0.072 ng/mL 、 0.082 ng/mL 及び 0.0032 ng/mL であった。5 訂増補日本食品成分表⁴では、ビタミン D 活性代謝物を含むビタミン D の濃度は 3 ng/mL とされている。今回得られた測定値をビタミン D 換算値とすると、母

乳中ビタミンD濃度は約0.59 ng/mLとなり、日本食品成分表値の1/5程度の低値であった。また、D₃については、出産後21~89日で0.12 ± 0.12 ng/mL、出産後90~180日で0.05 ± 0.04 ng/mLという報告もあり¹⁰、今回得られた測定値と概ね一致している。今回の研究では、1,25(OH)₂Dは測定対象としなかったが、Reeveら¹¹、Hollisら¹²は母乳中1,25(OH)₂D及び24,25(OH)₂D濃度は極めて低く、総ビタミンD活性への有意な寄与はないとしている。また、米国DRIにおいても、乳児のビタミンDの目安量はDおよび25(OH)Dの母乳中濃度より算定されており、1,25(OH)₂D濃度については加味されていない。これらのことから、今回の結果より算出した乳児のビタミンD推定摂取量0.46 µg/dayは妥当であり、現行目安量(2.5 µg/day)は専ら母乳で哺育された乳児には摂取困難な値であると考えられる。さらに、今回の研究結果より、母乳中ビタミンD濃度は個体差が大きく、授乳婦の血漿中ビタミンD濃度と有意な正の相関が認められた。また、母乳中および授乳婦血漿中のD₃系化合物濃度は夏季に高く、D₂系化合物濃度ビタミンD濃度は冬季に高かった。これらの季節変動は、日照および食事の影響を受けたものと考えられる。

ビタミンEについては母乳中α-tocopherol平均濃度は5.2 µg/mLであった。既報では、日本人の母乳中α-tocopherol濃度は出産後21~89日で2.8 ± 2.0 µg/mL、出産後90~180日で3.3 ± 1.3 µg/mLと報告されており¹⁰、今回の結果はこの報告に比べてやや高値であった。今回算出した乳児の推定摂取量4.1

mg/dayも現行目安量の3.0 µg/dayに比べてやや高値となった。一方、母乳中ビタミンE濃度は初乳、移行乳、成熟乳となるにつれて低下し、初乳(6.8~23 µg/mL)に対し、成熟乳(1.8~9 µg/mL)ではおよそ1/3~1/5であると報告されている¹³。今回の研究結果でも、母乳中α-tocopherol濃度は出産後日数と有意な負の相関を示した。

ビタミンKについては、日本人の血漿中に比較的多く存在するPK、MK-4及びMK-7濃度を測定した。その結果、母乳中PK、MK-4、MK-7の平均濃度は3.8 ng/mL、1.8 ng/mL、1.6 ng/mLとなり、PK濃度が最も高かった。Kojimaら¹⁴は、母乳中PKおよびMK-4濃度を出産後21~89日で3.6 ± 1.5 ng/mLおよび1.8 ± 0.6 ng/mL、出産後90~179日で2.1 ± 0.6 ng/mLおよび1.4 ± 0.64 ng/mLと報告しており、今回の測定結果とほぼ同じ濃度となっている。また、今回の測定結果より算出した乳児の推定ビタミンK摂取量は5.2 µg/dayとなり、現行目安量の4.0 µg/dayと同程度の値であった。

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

【H18年度の研究発表】

(1) 投稿論文

- a. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Okano T.
“Determination of fat-soluble vitamins in

human plasma, breast milk and food samples – Application in nutrition survey for establishment of “Dietary Reference Intakes for Japanese”” *J Health Sci.* 2007, 53, in press.

(2) 学会発表

- a. 鎌尾まや、津川尚子、須原義智、岡野登志夫「日本人の食事摂取基準策定を目的とした日本人授乳婦の脂溶性ビタミン栄養調査」フォーラム 2006 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 18 年 10 月 31 日、東京

【参考文献】

1. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T, Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Chem.* 2005, 77, 3001-7.
2. 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.
3. Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Okano T, Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards, *J Chromatogr B.* 2005, 816, 41-8.
4. 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 報告「5訂増補 日本食品標準成分表」国立印刷局、2005
5. Shimizu M, Kamachi S, Nishii Y, Yamada S, Synthesis of a reagent for fluorescence-labeling of vitamin D and its use in assaying vitamin D metabolites, *Anal Biochem.* 1991, 194, 77-81.
6. Higashi T, Awada D, Shimada K, Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent, *Biol Pharm Bull.* 2001, 24, 738-43.
7. 鈴木久美子、佐々木晶子、新澤佳代、戸谷誠之「離乳前乳児の哺乳量に関する研究」栄養学雑誌 2004, 62, 369-72.
8. Kobayashi T, Okano T, Shida S, Okada K, Suginozawa T, Nakao H, Kuroda E, Kodama S, Matsuo T, Variation of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ levels in human plasma obtained from 758 Japanese healthy subjects, *J Nutr Sci Vitaminol.* 1983, 29, 271-81.
9. Canfield LM, Clandinin MT, Davies DP, Fernandez MC, Jackson J, Hawkes J, Goldman WJ, Pramuk K, Reyes H, Sablan B, Sonobe T, Bo X, Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers, *Eur J Nutr.* 2003, 42, 133-41.
10. 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.
11. Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF, Vitamin D of human milk: identification of biologically active forms, *Am J Clin Nutr*. 1982, 36, 122-6.
 12. Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW, Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk, *J Nutr*. 1981, 111, 240-8.
 13. Jansson L, Akesson B, Holmberg L, Vitamin E and fatty acid composition of human milk, *Am J Clin Nutr*. 1981, 34, 8-13.
 14. 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. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の評価-思春期におけるビタミンD栄養-

【目的】

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

クターの一つとされ、ビタミンD欠乏とは区別して評価する必要がある。

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

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

【方法】

<対象者>

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

<測定項目>

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

<統計解析>

統計解析ソフトSAS社製JMP5.0.1Jを用

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

【結果および考察】

表3-1に対象者の背景を示す。いずれの学年においても、女子学生の血中25(OH)D濃度は、男子学生に比べて有意に低かった。血中PTH濃度に男女差は認められなかったが、男女ともに学年が上がるにつれて有意に低下した。ビタミンD摂取量に、男女学年間の差は認められなかった。ビタミンD摂取量は、男女いずれの学年も約10 µg/dayであり、2005年版日本人の食事摂取基準によるビタミンDの目安量(12~14歳の4 µg/day、15~17歳の5 µg/day)を上回っており、また平成15年日本人の国民健康・栄養調査報告に示される同年代のビタミンD摂取量と比較しても上回っていることから、今回の対象者のビタミンD摂取量は良好であると判断される。次に、ビタミンD不足のマーカーとなる血中PTH濃度に影響する因子を、ステップワイズ重回帰分析により解析した(表3-2)。血中25(OH)D濃度、ビタミンD摂取量、Ca摂取量を、予測因子とした場合、男子ではいずれの学年においても25(OH)D濃度が負相関関係を示す独立影響因子であったが、女子では高校3年においてのみ25(OH)D濃度が有意な独立影響因子となった。そこで、次に15, 20あるいは

25 ng/mLの血中25(OH)D濃度を境界値として対象者を高25(OH)D群と低25(OH)D群の2群に分類し、2群間の血中PTH濃度を比較した。男子学生の結果を、表3-3に示す。中学1年生、高校1年生では15 ng/mLを境とした場合にp値が最も低く、高校3年生では25 ng/mLを境とした場合に最も低いp値を示した。しかし、学年を通して有意差が見られる境界値は、20 ng/mLであった。一方、女子では重回帰分析の結果で示されたように、高校3年生においてのみ有意な負の相関関係がみられ、表3-4に示すように、高校3年生の20 ng/mL, 25 ng/mLを境界とした場合に有意差が見られた。p値は、20 ng/mLを境界とした場合のほうが低かった。これらのことを総合的に評価すると、中学1年生から高校3年生までの思春期男女におけるビタミンD不足のカットオフ値は、25(OH)D濃度の20 ng/mLが適当であると判断される。思春期におけるビタミンD不足のカットオフ値に関する報告は少なく、フィンランドの女兒(10~12歳)を対象とした研究で、血中25(OH)D濃度と骨密度が正相関すること、9~15歳の女兒で血中25(OH)D濃度と3年間の骨密度変化量が正相関を示したとの報告^{1,2}があるが、カットオフ値を提示する論文はほとんど見られない。今回の検討で、日本人の思春期におけるカットオフ値を提示できたことは、意義が高いと考えられる。次の段階として、血中25(OH)D濃度を20 ng/mL以上に維持するためのビタミンD摂取量を策定する必要があるが、今回の対象者においてビタミンD摂取量と血中25(OH)D濃度に相関がみら