

(ATCC27773)を利用し、また多検体の処理が可能な96 wellマイクロプレートを利用した方法が優れた方法と考えられる。一方、ビタミンCについては、今回の研究で検討したECD-HPLC法が、検出感度が高く、また測定操作も簡単で、食品だけでなく血漿やリンパ球中の濃度の測定にも適していると考えられる。特に生体のビタミンCレベルを評価するとき、リンパ球中の濃度が組織濃度を反映すると考えられることから、僅かしか得られないリンパ球中のビタミンC測定にはECD-HPLC法が優れていると考えられる。ただし、この方法はアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸の形態までは測定できるが、それ以上に酸化された場合には測定できない。そのため測定試料の前処理、分析までの試料の保存に注意しなければ、正確な分析はできないという難点もある。ECD-HPLC法を利用したリンパ球中のビタミンC濃度を糖尿病患者を対象として測定し、酸化ストレスが負荷されている患者では、血漿のビタミンCレベルは低下しないが、リンパ球ビタミンCレベルは低下し、その低下は合併症があるほど著しいことを示すことができた。

体内の葉酸レベルを反映する指標として、血漿、赤血球がよく利用されている。血漿は、摂取した葉酸の短時間の変動をよく反映するが、赤血球はその循環血液中の寿命が長いことから、短期間（少なくとも検討した1週間適度）の葉酸負荷の影響を評価することは難しいと考えられる。類似した現象はビタミンCについても言える。すなわち摂取した食品中からの吸収は、血漿で

感度よく測定できる。言い換えれば、血漿のビタミンCや葉酸濃度は、採血前に摂取したものの影響を受けやすく、定常的レベルは反映しにくいとも解釈できる。

食品中の葉酸の生体利用性は、低いといわれているがその生体利用性を評価する適切な方法は見当たらない。そこでラットに低葉酸食を4週間負荷し、その後に検討する葉酸含有食品を負荷して、血漿、肝臓、骨髄の葉酸レベルの増加、ならびに血漿のホモシステイン濃度の低下を指標とした食事葉酸の有用性の評価方法を設定した。この方法を利用して実際に日本人の葉酸のよい供給源といわれている緑茶葉酸の生体利用性を評価したところ、利用性が低いことが明らかとなった。今回設定した方法を利用すれば、多種類の食品中の葉酸の生体利用性をスクリーニングすることが可能と考えられる。

葉酸はメチル基供与を介して染色体の安定化に寄与していると考えられている。そして食事摂取基準の策定においても、葉酸レベルとリンパ球染色体の安定化の関連が一部で注目されている。今回のマウスを利用した研究において、低葉酸状態ではX線照射による骨髄染色体損傷が起きやすかった。しかし、基本食の20倍の葉酸を投与しても、さらなる染色体損傷の防御効果は認められなかった。被検者に葉酸を過剰投与しても、マウスの実験と同様にリンパ球染色体損傷に対する葉酸の影響は検出できなかった。これらの結果を総合すると、葉酸は血球や組織中が飽和していればそれで十分であり、過剰に摂取する意味はないもの

と考えられる。組織内の葉酸の飽和については、血球中の葉酸濃度の測定と血漿ホモシステイン濃度から推測することができると思われる。また、マウスの実験から、葉酸は酸化ストレスに対して不安定であり、酸化ストレスが負荷される条件ではその要求量も高くなることが示唆された。

E. 結論

ビタミンCと葉酸を取り上げ、分析方法、摂取量を反映する生体指標、有用性評価において注目すべき事項を検討し、ビタミンCの分析法としては電気化学検出（ECD）-HPLC法が食品中だけでなく微量の生体試料（リンパ球等）の分析にも適用できる信頼できる方法であること、また葉酸の分析法として*L. casei* (ATCC27773)を用いた簡便な微生物学的測定法が優れていることを示した。また、リンパ球ビタミンC濃度が、その必要性を評価する指標になりうることを糖尿病患者の検討から示した。動物実験と被検者実験において染色体の安定性に着目した葉酸の有用性に関する検討を行い、組織中の葉酸が飽和した状況でさらに葉酸を摂取しても有効な影響は認められないことを示した。ラットにおいて食品中の葉酸の生体利用率の評価系を設定し、日本人の葉酸の供給源と考えられる緑茶中の葉酸の生体利用率が低いことを明らかにした。また動物実験において、酸化ストレスが葉酸の必要量を考慮する要因になりうることを示した。

F. 健康危機情報

特記する情報なし

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Yamada, H., K. Yamada, M. Waki, and K. Umegaki, Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetic patients with and without diabetes complications. *Diabetes Care*, 2004. 27(10): p. 2491-2.

2) Endoh K., Murakami M., Araki R., Maruyama C., and Umegaki K., Low folate status increases chromosomal damage by X-ray irradiation, *Int. J.Radiat.Biol.*, 2006, 82, 223-30.

3) Endoh K., Murakami M., and Umegaki K., Vulnerability of folate in serum and bone marrow to total body irradiation in mice, *Int. J.Radiat.Biol.*, 2007, 83, 65-71.

2. 学会発表

1) 山岸あづみ, 瀧本秀美, 杉山朋美, 呉堅, 山田和彦, 梅垣敬三: ヒトにおけるビタミンCの生体利用性に関する基礎的研究, 第58回日本栄養・食糧学会(仙台)平成16年5月22日.

2) 山田薫, 脇昌子, 秋山礼子, 山田浩, 梅垣敬三: 糖尿病患者における緑茶飲用, 血漿および白血球ビタミンCと糖尿病性合併症との関連に関する検討. 日本内科学会第101回年会(東京)平成16年4月8~10日.

3) 遠藤香, 村上昌弘, 杉澤彩子, 木村典代, 山田和彦, 梅垣敬三: ラットにおける

体内葉酸レベルの評価方法に関する検討,
第 52 回日本栄養改善学会学術総会(徳島),
平成 17 年 9 月 29 日.

4) X 線照射マウスの骨髄染色体損傷に対する葉酸の防御作用: 遠藤香, 村上昌弘, 木村典代, 山岸あづみ, 山田和彦, 梅垣敬三, 平成 16 年第 51 回日本栄養改善学会学術総会, 金沢, 2004 年 10 月

5) 骨髄染色体損傷に対する葉酸の防御作用 ～X 線照射マウスにおける検討～: 遠藤香, 村上昌弘, 杉山朋美, 山岸あづみ, 木村典代, 山田和彦, 梅垣敬三, 平成 17 年第 59 回日本栄養・食糧学会大会, 東京, 2005 年 5 月

6) X 線全身照射マウスの体内葉酸濃度と抗酸化ビタミンの変動に関する検討: 遠藤香, 村上昌弘, 梅垣敬三, 平成 18 年第 58 回日ビタミン大会, 東京, 2006 年 5 月

H. 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

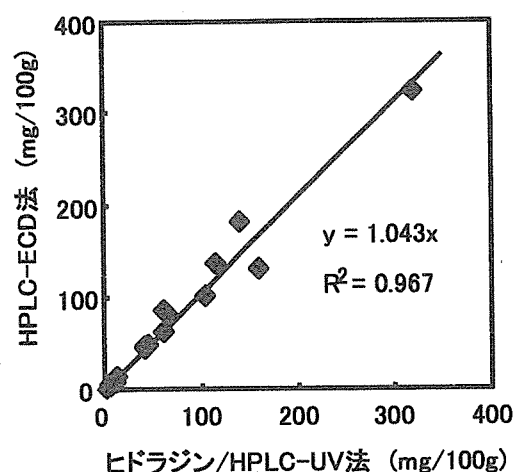


図1. 野菜と果物のビタミンC含量の測定におけるECD-HPLC法とヒドラジンHPLC法の比較. 17種類の野菜と果物のビタミンC含量をECD（電気化学検出）-HPLC法とヒドラジン-HPLC法で測定した.

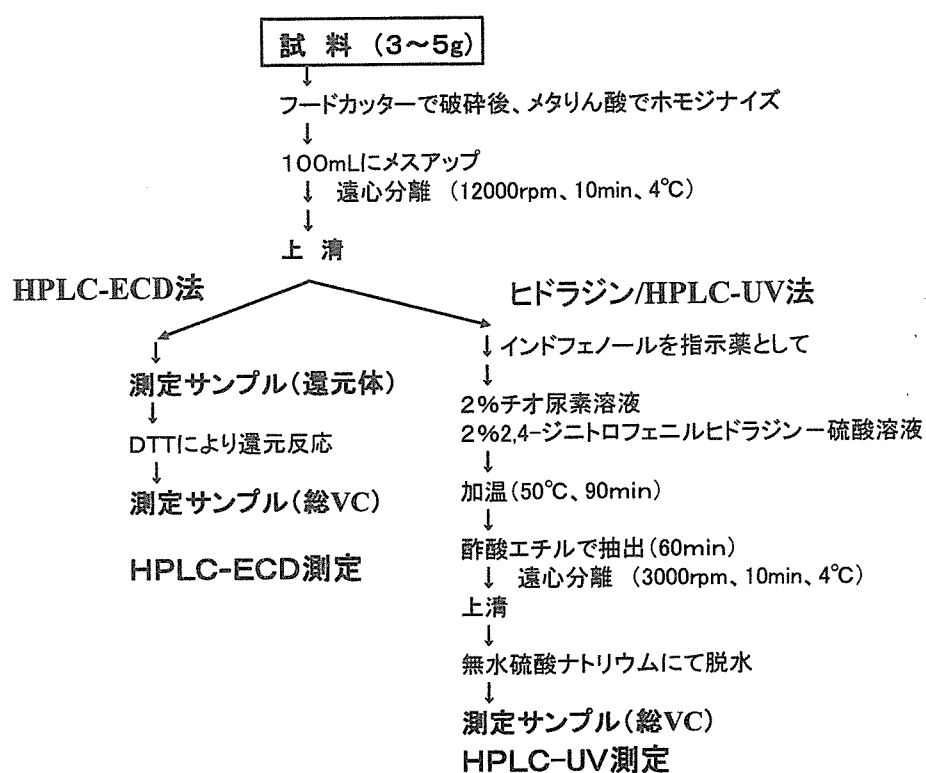


図2. 電気化学検出（ECD）HPLC法ならびにヒドラジン-UV-HPLC法による食品中のビタミンC測定方法の概略

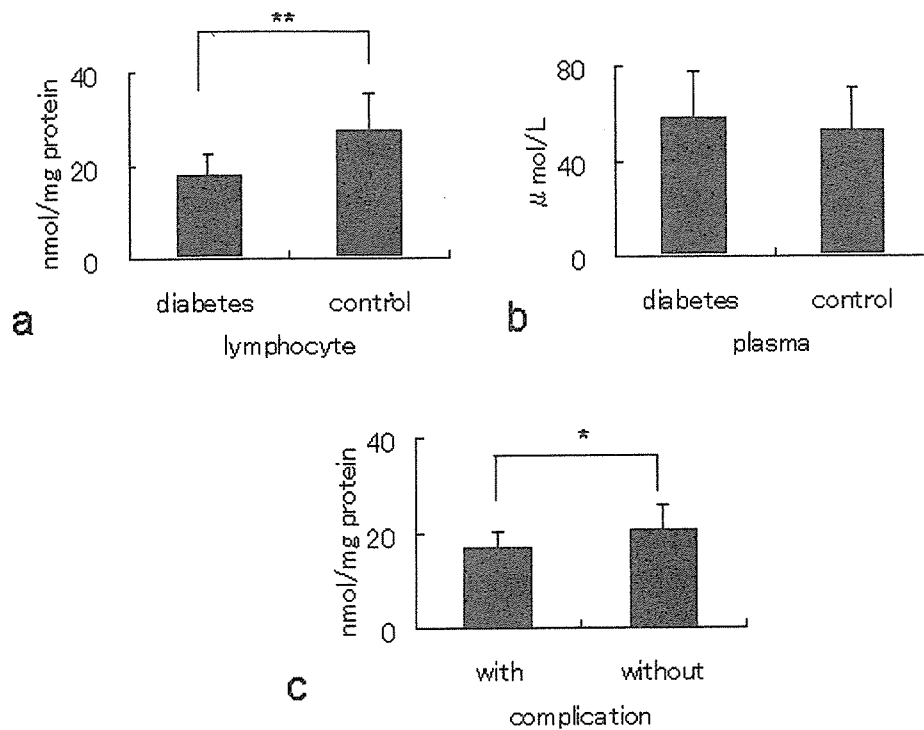


図 3. II型糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度

- a: リンパ球のビタミンC濃度, b: 血漿ビタミンC濃度,
c: リンパ球ビタミンC濃度 (合併症の有無)

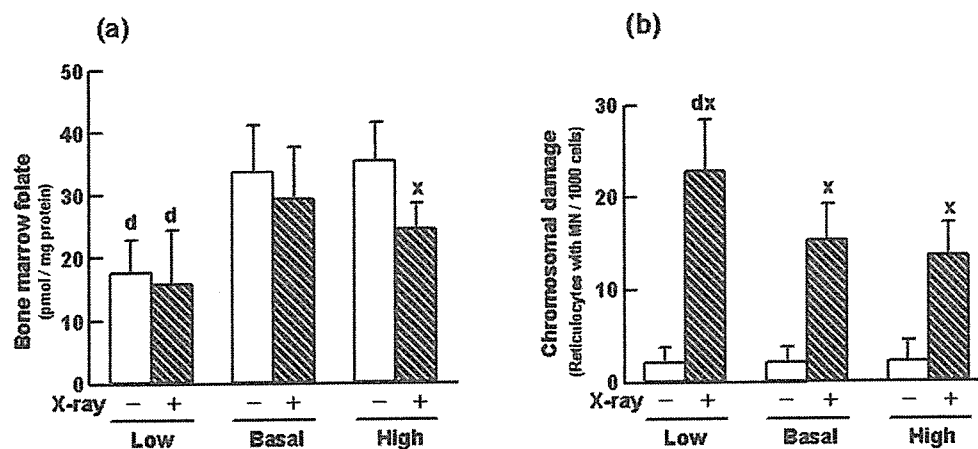


図 4. 種々の葉酸含量の飼料を4週間摂取させたマウスにX線を照射したあとの骨髓中の葉酸濃度と染色体損傷 (動物実験)

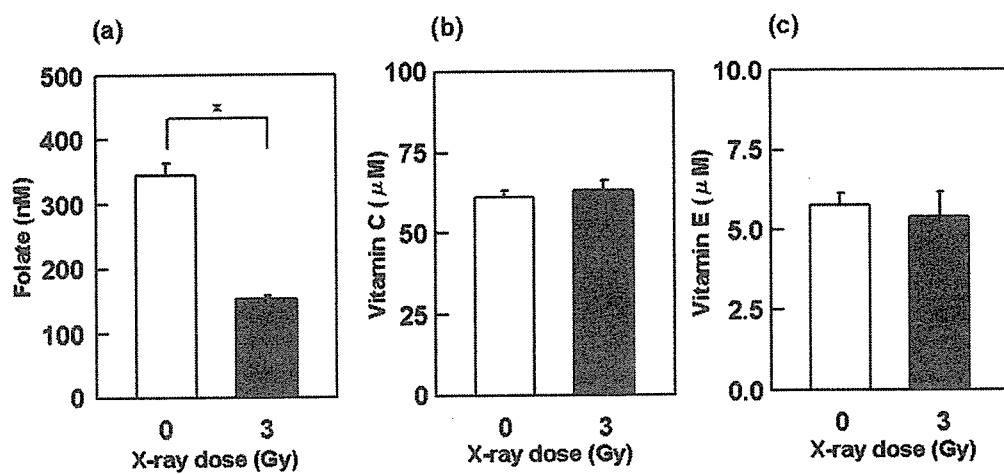


図5. マウス血漿に *in vitro* で X 線照射した場合の葉酸 (a) , ビタミン C (b) および ビタミン E (c) 濃度の変化

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

9. 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

要旨

植物性食品に普遍的に含まれるカロテノイドは食事から吸収され組織に蓄積する。このうち、プロビタミン A として機能するのはわずかであり、多くはそのままの構造で吸収蓄積して酸化ストレス抵抗性の増強や免疫賦活活性の増強などの機能を発揮すると考えられている。一方、ヒト介入試験において β -カロテン大量摂取が発がんを誘発する可能性が示唆されたことから、日常摂取するカロテノイドの必要量を明らかにすることが急務である。そこで、本研究はヒトでのカロテノイド摂取が生体の酸化ストレス抵抗性にどのように影響するかを定量的な観点から明らかにすることを目的とした。まず 16 年度はマウスへの β -カロテンおよびリコペン長期摂取実験を行い、組織からの両者の高感度 HPLC 分析法を確立した。17 年度はヒトの血漿リポタンパクである LDL と HDL それぞれに蓄積したカロテノイド（とくに β -カロテン、ルテイン、リコペン）の簡便な定量法および LDL と HDL の酸化反応系を確立した。さらに 18 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。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 の被酸化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 への蓄積は被酸化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、この場合も被酸化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（30 mg/日程度）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

カロテノイドは植物性食品素材に普遍的に含まれる機能性物質である。その種類は500種を越えるが、プロビタミンAとして機能するのはわずかである。一方、ヒトは食事由来の多様なカロテノイドを吸収するとともに、そのままの形態で組織に蓄積することが知られている。これらの中には抗酸化活性や免疫賦活活性などにより生体に様々な生理効果をもたらすものが多いが、代表的なカロテノイドであるβ-カロテンの大量摂取は喫煙者に肺ガンを誘発したとするヒト介入試験結果も報告されている。この場合、血漿β-カロテン濃度は有効に生理機能を発揮する場合の3-5倍の上昇に過ぎない(図-1)。したがって、遺伝要因や環境要因が異なるヒトの多様な集団において食品から摂取すべきカロテノイドの質と量を明らかにする必要がある。第七次改定日本人の食事摂取基準策定ではカロテノイドの摂取量に関する踏み込んだ結論は得られていない。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。β-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がある。ただし、食品成分としてカロテノイドを大量摂取した場合、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。そこで、今回のプロジェク

トは抗酸化作用あるいは酸化促進作用の面からヒトにおけるカロテノイドの適切な必要量を明らかにすることを目的とする。そこで血漿におけるカロテノイドの作用を明らかにするために、ヒト血漿リポタンパク(HDLおよびLDL)の酸化反応系を確立することを試みた。次に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血漿リポタンパクの酸化安定性に与える影響をヒトボランティア試験により検討した。

B. 研究方法

動物飼育

Hos・HR-1ヘアレスマウス(♂, 8週令)(日本SLC)を実験動物として用い(n=5), 飼育は25℃, 12時間の明暗サイクルの条件下で行った。飼料はカロテノイドの吸収を高めるために0.25%のタウロコール酸を添加した20%カゼイン食に0.05%のリコペンまたはβ-カロテンを混合して作成した。この試験食をリコペンは5週間、β-カロテンは4週間自由摂取させた後、麻酔下で脱血屍殺し、背部皮膚とその他の臓器を摘出した。これらの臓器を9倍量のPBSを加えてホモジナイズし、調製したホモジネートは分析に供するまで-20℃で保存した。採取した臓器のうち脾臓、心臓、精巣、眼球は小さく個別にカロテノイドの蓄積量を測定するには不可能であるためプールしてホモジナイズした。

組織中のカロテノイド分析

ホモジネート0.5-1mlをネジ栓付試験管にとり、内部標準と、10μlの10mMBHT/ヘキサンを加えた。このサンプルに3mlのメ

タノール/ジクロロメタン(2:1v/v)を加えて vortex して脂質画分を抽出し、次いでヘキサン 2ml を加えて激しく攪拌した後、4℃で、3000rpm x 5 分遠心を行った。得られたヘキサン層を濃縮し、酢酸エチルを 500μl 加えて残渣を溶解し HPLC の分析に供した。内部標準として、リコペンの定量には α -カロテンを、 β -カロテンの定量には 8-アポカロテナールを用いた。分析条件を以下に示す。移動層：リコペン(メタノール/酢酸エチル；7:3, v/v)， β -カロテン(メタノール/アセトニトリル/ジクロロメタン/水；7:7:2:0.16v/v)，検出波長：リコペン(470nm)， α -カロテン(450nm)，流速：1ml/min，カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6x250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った。

血漿リポタンパクのカロテノイド分析

ヒト新鮮血から得た血漿を密度勾配遠心法により調製した LDL および HDL 100uL に内部標準として 8-アポカロテナールを添加した。攪拌後、イソプロパノール/ジクロロメタンを 300uL 及び氷酢酸 2.5uL を加えて遠心分離し、上清をそのまま HPLC 分析に供した。HPLC 分析条件を以下に示す。移動層：アセトニトリル/メタノール/ジクロロメタン；7:2:1, v/v/v)，検出波長：450nm，流速：1.0 ml/min，カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6 x 250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った。

血漿リポタンパクの酸化反応

LDL あるいは HDL の P B S 溶液 (0.2mg protein/ml) にアゾラジカル発生剤(AAPH；0.2mM)を添加して、37℃でインキュベーションした。一定時間後の反応液をとり、TBARS 測定および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 5uM の β -カロテンおよびルテインを添加し、37℃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。リポタンパクの被酸化性を評価するために LDL あるいは HDL の P B S 溶液 (0.2mg protein/ml) にアゾラジカル発生剤(AAPH；0.2mM)を添加して、37℃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、前述の LOOH 測定を行った。

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160ml 缶入りニンジンジュース3缶（トータルで β -カロテン 31.2mg 摂取）あるいは1日ほうれん草ピューレ450g（トータルで β -カロテン 22.3mg, ルテイン 35.0mg）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

リコペンの分析条件の検討と各種臓器におけるリコペンと α -カロテンの蓄積

サンプルの前処理を図2に示した。組織ホモジネートから塩化メチレン・メタノー

ルで抽出し、ヘキサンを加えて二層分配した後、ヘキサン層を濃縮し、HPLC 分析用の試料とした。また作成した標準曲線によるリコペンの検出限界は 0.16pmol という高感度であった。また、HPLC 分析に要する時間も 16 分と短時間であり、多量の試料を簡便にかつ短時間に分析定量できた。他のカロテノイドも本分析法で定量可能と思われた。0.05%のリコペンを含む飼料を 5 週間摂取したマウスにおいて、肝臓を始めとする各種臓器に摂取カロテノイドの蓄積が認められた。新鮮重量あたりの蓄積は肝臓で顕著であり、次いで皮膚に高濃度に蓄積していた。また、微量ではあるが眼球、脾臓にもそれぞれ 0.9pmol/wet weight, 1.0pmol/wet weight 蓄積が確認された。□-カロテン添加飼料を 4 週間摂取したマウスの肝臓、皮膚、腎臓、脳における蓄積は飼料摂取期間がリコペン摂取より短いにもかかわらず、すべての期間でリコペンより高濃度であった (表-1)。

ヒト血漿リポタンパクのカロテノイド分析

HPLC によるヒト血漿のカロテノイド分析結果を図-3 に示した。対象とした β -カロテン、リコペン、ルテイン/ゼアキサンチンを分離定量できた。標準曲線を用いたリポタンパク中のカロテノイド定量結果から LDL には β -カロテンが、HDL にはルテイン/ゼアキサンチンが多く含まれることが確認された。したがって、それぞれのリポタンパク質における主な作用カロテノイドは β -カロテンとルテイン・ゼアキサンチンであると考えられた。

血漿リポタンパクの酸化反応

LDL, HDL ともに LOOH 測定では一定の誘導期の後に酸化反応が促進することが示されたが、LDL に比べて HDL の LOOH 蓄積はゆるやかであった (図-4)。これは HDL の方が酸化基質である脂質含量が少ないためと考えられた。本法により両リポタンパク質の被酸化性を簡便に評価できることがわかった。

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。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 (図-5)。したがって、外部から添加した場合、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 の被酸化性に対するそれぞれのカロテノイド添加の影響を図-6 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血漿濃度範囲である。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と思われる。

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HDLよりも蓄積しやすいことが確認された(図-7)。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、被酸化性を示す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。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(図-8)。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が考えられた。LDL、HDLともにルテイン含量の増加は被酸化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被酸化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。しかし、血漿濃度は数分の1である(0.8-1.2 μ M)。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。

結論

カロテノイドは植物性食品(野菜・果物)あるいはそれらの加工品(飲料、ピューレなど)から摂取する場合にはサプリメントのヒト介入試験でみられた害作用は起こりにくい。食品からの摂取の場合には、30mg/day程度大量摂取してもサプリメントに比べて血漿濃度が低く保たれることがそ

の理由のひとつと考えられた。

E. 研究発表

1. 発表論文

○板東紀子, 寺尾純二 サプリメントデータブック(吉川敏一, 桜井弘編) III-11 キサンフィル, III-12 カロテノイド (pp.359-374 オーム社, 2005)

2. 学会発表

○斎藤聡美, 板東紀子, 南裕子, 徳島沙知, 稲熊隆博, 寺尾純二「ヘアレスマウスにおける摂取リコペンの臓器への蓄積: UVA照射の影響」

2004年度日本農芸化学会中四国支部大会:
2004年9月17日: 徳島大学

○瀬戸山真理, 板東紀子, 南裕子, 林宏紀, 寺尾純二「UVA照射により誘導される皮膚の酸化障害に対するリコペンの作用」第10回日本フードファクター学会 2005年11月24日 岡山大学]

○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18年度日本栄養食糧学会中国四国支部大会(2006年10月28日 徳島)

G. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許予定

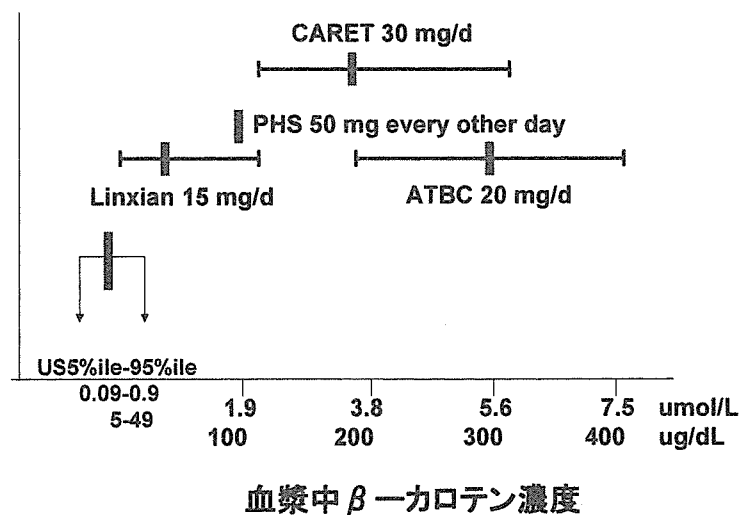
なし

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし



From Dr. S. Watanabe

図 1. ヒト介入試験における β -カロテン摂取量と血漿カロテン濃度の関係

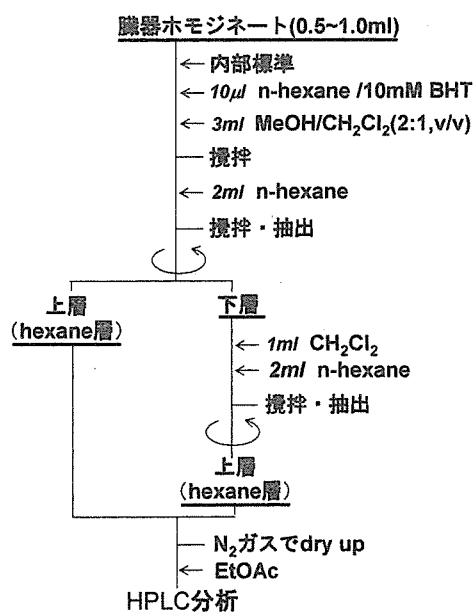


図 2. カロテノイド分析用試料の調製方法

表 1. リコペンと β -カロテンの蓄積量

リコペン		β -カロテン	
pmol/wet tissue		pmol/wet tissue	
肝臓	1238 $\pm$ 539	肝臓	2010 $\pm$ 550
皮膚	71.0 $\pm$ 11.1	皮膚	1647 $\pm$ 349
脾臓	67.4 $\pm$ 52.4	腎臓	57.2 $\pm$ 7.4
腎臓	7.2 $\pm$ 2.9	脳	2.6
脳	2.4 $\pm$ 1.5		
精巣	2.3		
心臓	2.1		
脾臓	1.0		
眼球	0.9		

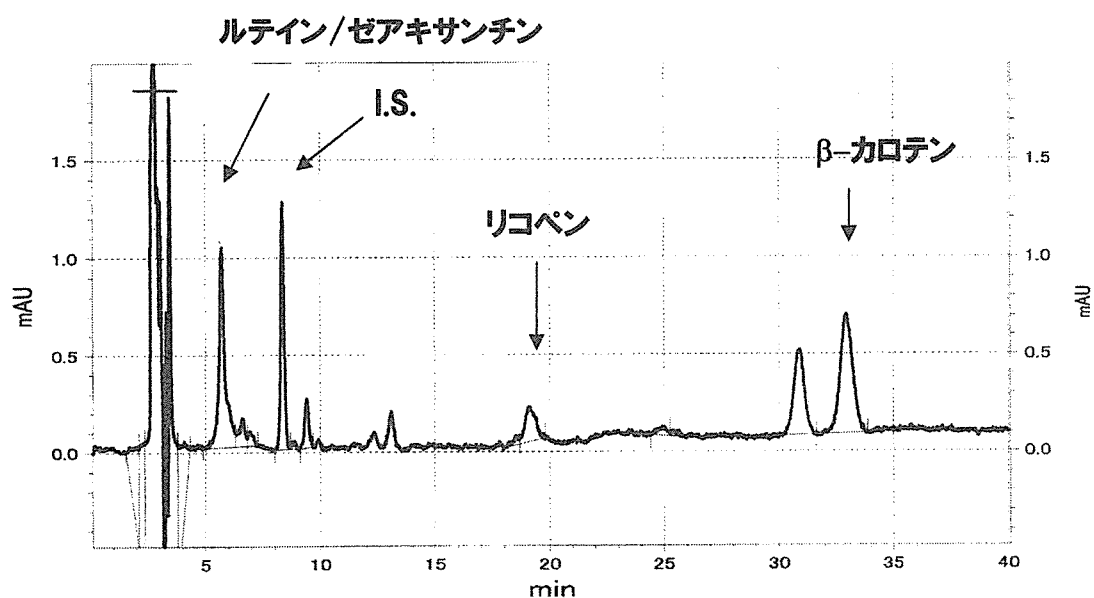


図 3. HPLC によるヒト血漿のカロテノイド分析クロマトグラム
内部標準には 8-アポカロテナールを用いた。

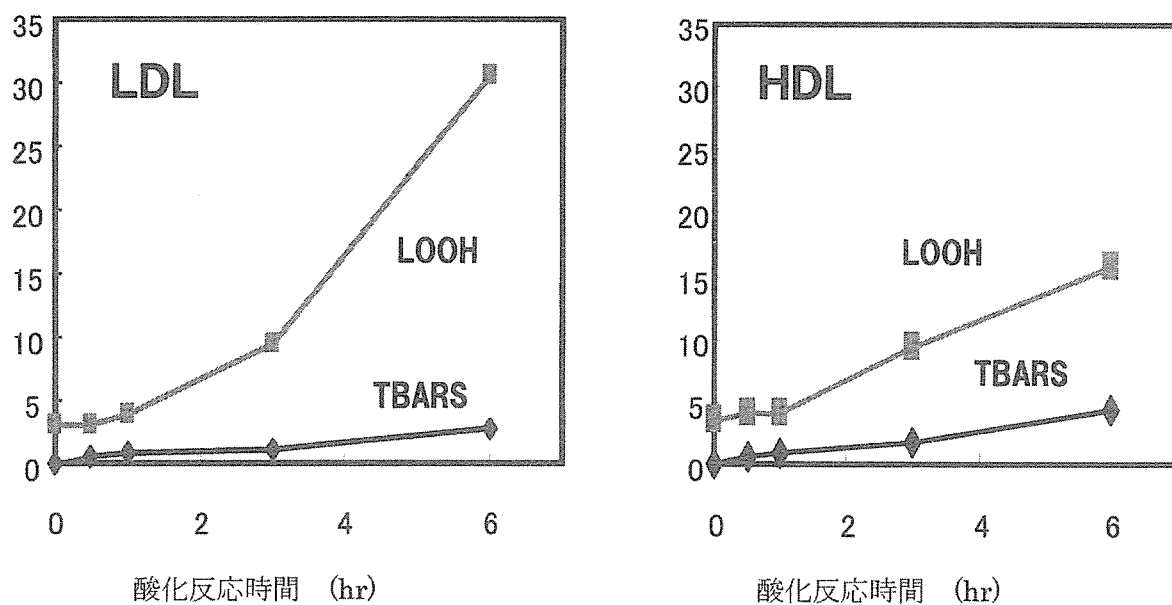


図 4. アゾラジカル発生剤によるヒト血漿 LDL と HDL の酸化反応の経時変化
LOOH (脂質ヒドロペルオキシド) TBARS (T B A 反応性物質)
(縦軸の単位は nmol/mg protein)

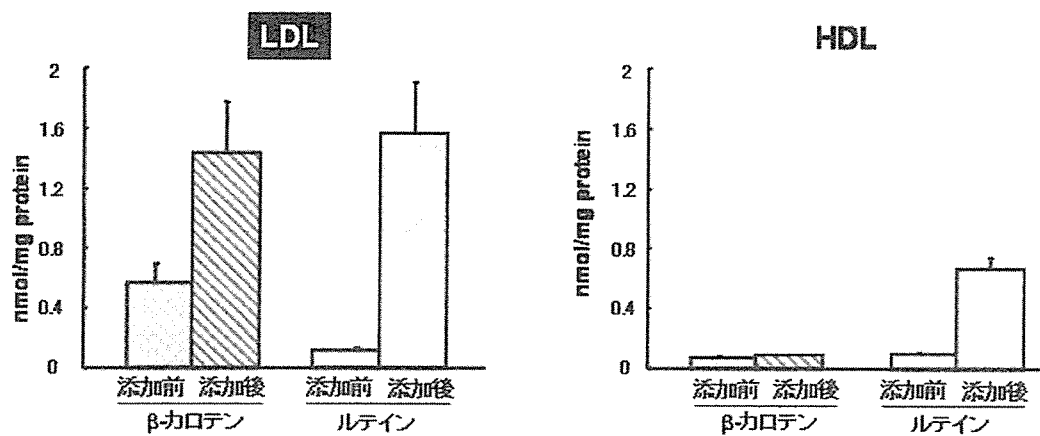


図 5. β-カロテンおよびルテインの血漿への同時添加によるリポタンパクへの分布蓄積

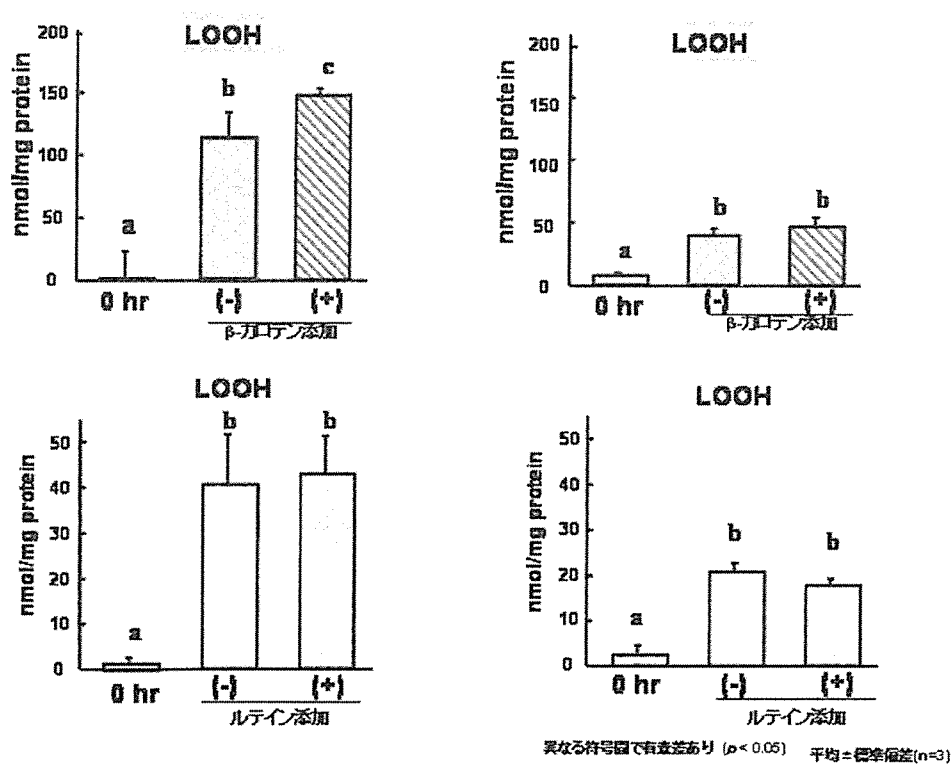


図 6. LDL と HDL の被酸化性に対する添加 β-カロテンおよびルテインの影響

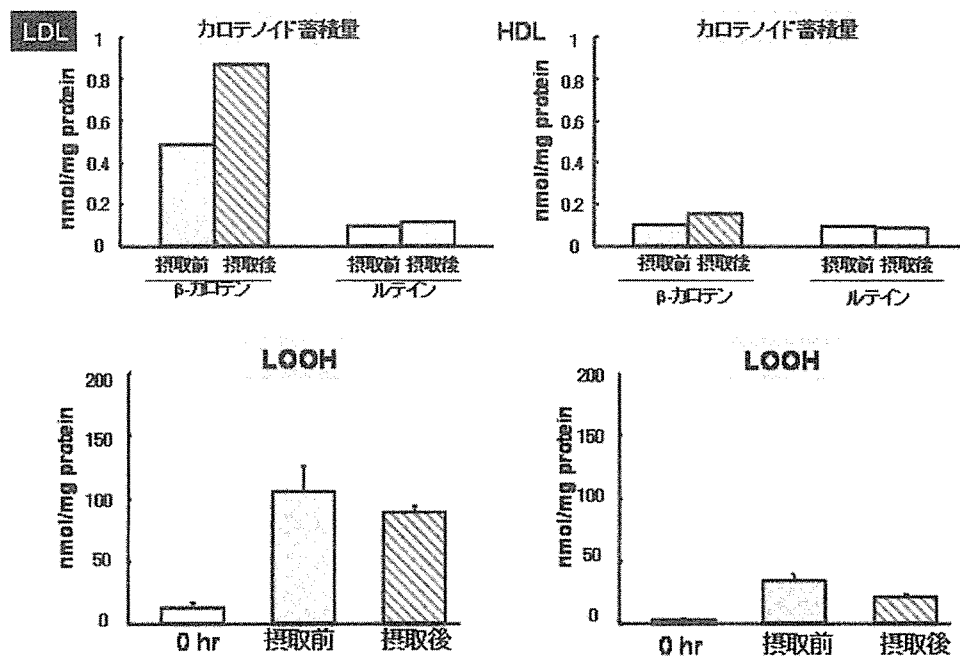


図 7. LDL および HDL の酸化安定性に対するニンジンジュース摂取の影響

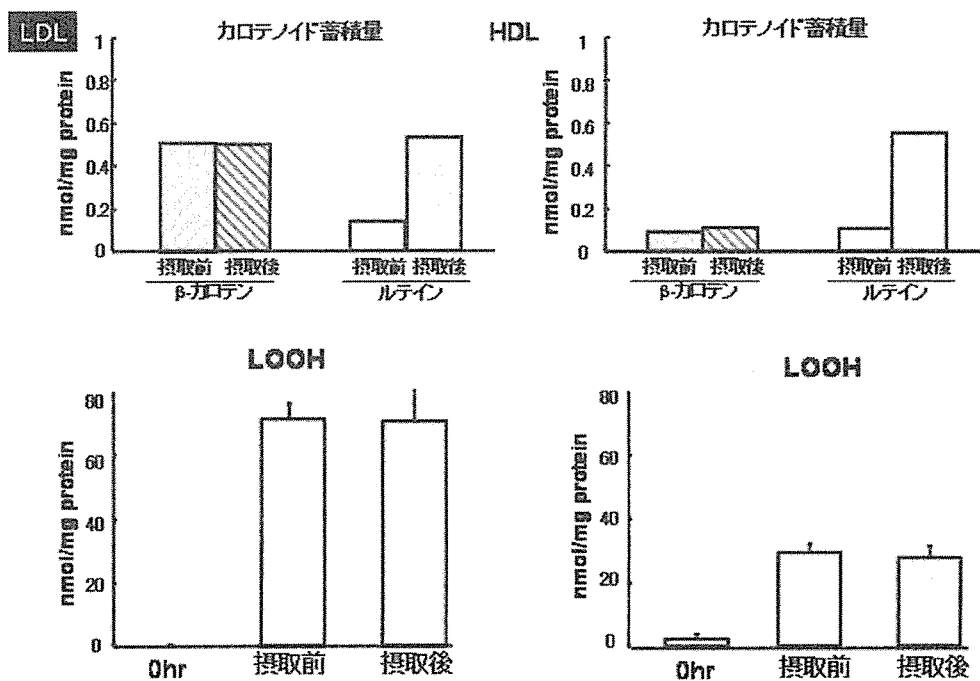


図 8. LDL および HDL の酸化安定性に対するほうれん草ピューレ摂取の影響

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

10. 脂溶性ビタミン（ビタミン D、ビタミン K）摂取基準に関する検討

分担研究者 田中 清 京都女子大学 教授

研究協力者 木戸詔子 京都女子大学 教授

要旨

本研究は、脂溶性ビタミンのうち、特にビタミン D・ビタミン K の摂取基準策定に役立つ研究を目指したものである。これら 2 つのビタミンを対象としたのは、いずれも骨粗鬆症・骨折予防に必要なビタミンであることから、骨の健康維持を意識した、栄養研究であるともいえる。

本研究において、①食事摂取基準策定の基準とすべきデータを収集する調査方法、②高齢者に対する摂取基準は、より若年層と同じでよいのか、③摂取基準の策定にあたって、ビタミンの欠乏 (deficiency)に加えて、不足 (insufficiency)をも考慮する必要があるのか、の 3 点を解明すべく、平成 16 年度は、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD)患者の調査、平成 17 年度は大腿骨頸部骨折患者の調査、平成 18 年度は介護老人福祉施設の調査を行った。

①食事摂取基準策定の基準とすべきデータを収集する調査方法：調査方法として、食事摂取調査・血液検査などの生体指標を用いる方法があるが、同一対象者にこれら両指標を同時に測定した調査研究は、わが国においては、意外なほど少なかった。本研究においては、食事摂取調査と、血液中ビタミン濃度、及びビタミン充足状態あるいは作用の指標となる項目を同時に測定した。IBD 患者では、ビタミン D・K は十分摂取しているのに、血中濃度が低く、脂質摂取制限がその原因と考えられた。今後可能な限り、食事調査・血液検査を同時に行う調査が望ましいと考えられた。

②高齢者に対する摂取基準は、より若年層と同じでよいのか：高齢者において、ビタミン D・K とも、目安量以上摂取しているにも関わらず、血中濃度は低かった。また高齢者においては、吸収障害に加え、作用不全（ビタミン D 活性化障害、ビタミン K サイクル不全）も考えられ、おそらく若年者より多い量の摂取を要すると考えられる。

③摂取基準の策定にあたって、ビタミンの欠乏 (deficiency)に加えて、不足 (insufficiency)をも考慮する必要があるのか：どの臓器における作用を考慮するか、何を指標とするのか、というのも重要な問題である。例えばビタミン K に関して、現在摂取基準で考慮の対象となっているのは、肝臓における血液凝固因子の活性化のみであるが、近年骨など肝外作用の意義が注目されている。大腿骨頸部骨折患者では、血液中ビタミン D・K 濃度が非常に低かった。また高齢者調査の結果、これらビタミンの欠乏/不足のため、実際に骨吸収が亢進しており、骨折のリスクを増大させているものと考えられた。

高齢者においては、おそらく若年者より多くのビタミン D・K を必要とすると考えられるが、今後さらに調査研究が求められる。

I. 緒言

本研究は、脂溶性ビタミンのうち、特にビタミンD・ビタミンKの摂取基準策定に役立つ研究を目指したものである。これら2つのビタミンを対象としたのは、いずれも骨粗鬆症・骨折予防に必要なビタミンであることから、骨の健康維持を意識した、栄養研究であるともいえる。

本研究において、特に検討したかったことが何点かある。一つは、食事摂取基準策定の基準とすべきデータを収集する調査方法である。一つの方法は、食事摂取調査を行うことであるが、もう一つの方法は、血液検査などの生体指標を用いる指標である。同一対象者にこれら両指標を同時に測定した調査研究は、わが国においては、意外なほど少なかった。本研究においては、食事摂取調査と、血液中ビタミン濃度、及びビタミン充足状態あるいは作用の指標となる項目を同時に測定することによって、これらの相互関係を検討した。二つ目は、高齢者に対する摂取基準は、より若年層と同じでよいのか、という点である。詳しくは後述するが、例えばビタミンDの目安量は、わが国においては、高齢者に対しても、特別な値を設定していないが、アメリカでは高齢者に対しては、より高い値が設定されている。三点目は、摂取基準の策定にあたって、ビタミンの欠乏 (deficiency)だけを考慮すればよいのか、不足 (insufficiency)をも考える必要があるのか、という点である。最近欧米では、古典的欠乏症を起こすような、重症の欠乏ではなく、より軽度の不足であっても疾病の原因となることが知られ

ているが、わが国ではまだ、このような考え方が普及しているとは言い難い。さらに、この欠乏と不足の問題とも関連するが、どの臓器における作用を考慮するかというのも重要な問題である。例えばビタミンKに関して、現在摂取基準で考慮の対象となっているのは、肝臓における血液凝固因子の活性化のみであるが、近年骨など肝外作用の意義が注目されている。

これらの疑問点を解明すべく、いくつかの病態モデルを用いて解析を行った。まず平成16年度は、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD)患者の調査、平成17年度は大腿骨頸部骨折患者の調査、平成18年度は介護老人福祉施設の調査を行った。本報告書においては、まずこれら3年間の成果の要約を述べた後、それらを統合して最初に挙げた問題点を考察する、という形で記述を行う。

II. 研究成果の概要

1. IBD患者における脂溶性ビタミン欠乏症調査 (平成16年度研究成果)

IBDは、クローン病 (Crohn's disease; CD)と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC)に分けられる。UCはその名前の通り、大腸に炎症を起こす疾患であるが、CDは消化管のすべての部位に炎症を起こす可能性があり、小腸病変を伴う例が多い。栄養素の吸収は主に小腸で行われるので、当然CDの方が栄養障害を起こしやすく、また栄養療法の意義も大きい。

京都大学医学部附属病院消化器内科外来受診のIBD患者51名を対象に調査を行った。

年齢は CD で、 32.5 ± 5.8 歳，UC で 41.2 ± 15.0 歳，病歴は CD で 12.8 ± 6.4 年，UC で 5.6 ± 5.1 年，BMI (kg/m²) は CD で 19.6 ± 2.7 ，UC で 21.4 ± 2.70 ，CRP (mg/dl) は CD で 2.5 ± 3.3 ，UC で 0.9 ± 2.8 ，血清アルブミンは CD で 3.9 ± 0.4 g/dl，UC で 4.3 ± 0.3 g/dl と，CD の方が UC に比べて若く，病歴が長く，やせており，炎症が強く，低栄養状態という背景であった。

これら患者における骨密度測定結果を表 1 に示す。骨密度測定結果は，若年成人平均値 (young adult mean; YAM) に対する値，すなわち T 値で表し，T が -2.5 未満を osteoporosis (骨粗鬆症)， $-2.5 \sim -1$ を osteopenia (骨量減少)， -1 以上を正常とする WHO の基準により判定した。

(表 1) IBD 患者における骨密度

	腰椎	大腿骨	1/3	UD
Normal	18	20	9	10
Osteopenia	23	21	21	22
Osteoporosis	3	3	14	12

腰椎は第 1-4 腰椎，大腿骨は total hip，1/3 は橈骨遠位 1/3，UD は橈骨超遠位を示す。

その結果，これら対象者は若年者が多いにも関わらず，骨粗鬆症または骨量減少と判定される例が多かった。各測定部位とも，骨量は，UC より CD において有意に低かった。骨量低下の原因として，ステロイド投与の有無，血清アルブミンや CRP 値や罹病期間では説明できなかった。

これら患者の血清 25(OH)D 濃度 (ng/ml) は， 15.5 ± 6.6 (CD: 11.2 ± 4.1 ，UC: 19.9 ± 5.8 ， $p < 0.001$) と全体に低値であり，特に CD で低

かった。Intact PTH (pg/ml) は， 50.2 ± 22.2 (CD: 56.6 ± 23.6 ，UC: 43.6 ± 18.9 ， $p < 0.05$) と，CD において高かった。

血清 PK 濃度 (ng/ml) は， 0.74 ± 0.56

(CD: 0.44 ± 0.28 ，UC: 1.03 ± 0.62 ， $p < 0.001$)，

MK-7 濃度 (ng/ml) は， 3.10 ± 4.34

(CD: 1.84 ± 3.70 ，UC: 4.32 ± 4.63 ， $p < 0.001$) と

やはり CD で低い結果であった。

肝臓におけるビタミン K 作用不足の指標である PIVKA-II (mAU/ml) は， 26.6 ± 23.6 (CD: 33.0 ± 31.4 ，UC: 19.9 ± 6.5 ， $p < 0.05$)，骨におけるビタミン K 作用不足の指標である ucOC (ng/ml) は， 8.3 ± 7.8 (CD: 11.7 ± 9.5 ，UC: 4.9 ± 3.1 ， $p < 0.001$) と，いずれも CD において高く，CD においてビタミン K の作用不足がより重症であることを示していた。

血清 25(OH)D・血清 PK と各測定部位の骨密度は，有意の負の相関を示した。これら患者の食事調査を行ったところ，当時の第 6 次改訂日本人の食事摂取基準に対して，これら患者は，ビタミン D に関して約 400%，ビタミン K に関して約 200% の充足率を示していたが，これらビタミンの摂取量と血清濃度は相関を示さなかった。しかし脂質摂取量とこれらビタミンの血清濃度は正の相関を示した。

以上のことを要約すると，IBD 患者には，骨密度減少が高頻度に認められ，特に橈骨の減少が顕著であった。血中のビタミン D・K は低値であり，特に CD で顕著であった。血中ビタミン D・K 濃度は骨密度と相関し，IBD における骨密度低下への関与が示唆された。食事調査では，食事からのビタミン D・K 摂取量は十分充足していたが，

血中ビタミン D・K 濃度とは相関がみられず、強い吸収障害が疑われた。脂質摂取量と血中ビタミン D・K 濃度には相関が認められ、脂質摂取制限と脂溶性ビタミン欠乏の関与が示唆された。

2. 大腿骨頸部骨折患者における脂溶性ビタミン欠乏症調査（平成 17 年度研究成果）

大腿骨頸部骨折は、年間 12 万人の新規患者が発生していると推測されており、受傷後 1 年以内の死亡率は 10-20% と高く、また死亡を免れても、非常に高い割合で日常生活レベルの低下を招くことから、寝たきりの基礎疾患としても重要である¹²⁾。

対象は、大腿骨頸部骨折にて公立玉名病院受診の大腿骨頸部骨折患者であり、ほとんどの例において、受傷後 24 時間以内に採血を行った。また非骨折群として、年齢を合致させて、近接の老人ホーム入所者から採血を行った。

血清 25(OH)D、副甲状腺ホルモン(PTH)、PK・MK-7、undercarboxylated osteocalcin (ucOC)濃度を測定した。

血清 25(OH)D 濃度(ng/ml)は女性において、骨折群 9.1 ± 4.6 、非骨折群 18.6 ± 6.3 と、有意に($p < 0.0001$)骨折群で低かった。ビタミン K に関しては、PK 濃度(ng/ml)は男性において、骨折群 0.31 ± 0.24 、非骨折群 0.55 ± 0.31 、女性において骨折群 0.46 ± 0.36 、非骨折群 0.77 ± 0.36 、MK-7 濃度(ng/ml)は男性において、骨折群 1.60 ± 1.60 、非骨折群 4.28 ± 3.75 、女性において骨折群 2.67 ± 4.13 、非骨折群 10.77 ± 7.01 、といずれも骨折群で低かった。

この結果をロジスティック回帰によって

分析すると、血清 25(OH)D、PK、アルブミンいずれの上昇も、骨折の Odds 比率を著しく低下させることという結果であり、求められた回帰式は 90.6% の例を正しく判別できた。

表 2 ロジスティック回帰の結果

	Odds 比 (95% CI)
25(OH)D (10ng/ml 増加ごと) $p=0.002$	0.217(0.084-0.560)
PK (1ng/ml 増加ごと) $p=0.004$	0.061 (0.009-0.416)
Alb (1g/dl 増加ごと) $p<0.001$	0.005 (0.001-0.038)

以上の結果をまとめると、男性の大腿骨頸部骨折例においては、血清 PK・MK-7 濃度が、女性例においては、血中 25(OH)D・PK・MK-7 が、対照群に比して、有意に低かった。血清 25(OH)D が 20ng/ml 未満は、明らかな D 欠乏/不足であるが、今回の骨折例では、90% が 20ng/ml であり、9ng/ml 未満という極端な欠乏症例が 47% に見られた。ロジスティック解析の結果、PK・25(OH)D・アルブミン増加は骨折の Odds 比を著しく低下させた。血液は受傷直後に採取したので、おそらく今回の結果は、患者の受傷前の状態を反映していると考えられる。すなわち大腿骨近位骨折患者では、ビタミン D・K 欠乏症の頻度が高く、骨折の危険因子としての重要な意義が示唆された。

3. 高齢者における脂溶性ビタミン欠乏に関する検討（平成 18 年度研究成果）