

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、D<sub>2</sub>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1-13)。D<sub>2</sub>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D<sub>2</sub>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D<sub>3</sub>、D<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub> 10 ng 及び25(OH)D<sub>2</sub> 10 ngを添加して添加回収率を求めたところ、表1-14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。

#### 【文献】

1. 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.
2. 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
3. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T, Method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry” Anal. Chem. 2005, 77; 3001-7.
4. 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.
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 D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent” Biol Pharm Bull. 2001, 24; 738-43.

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 (平成 17 年度～平成 18 年度)

【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. 母乳中のビタミン A、E、D 濃度の測定

前述の母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定(1-5-(3))\_母乳中ビタミン D 類の高感度測定法 (アルカリけん化法: ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの一斉分析法) と同様の操作により行った。

b. 母乳中ビタミン K 濃度の測定

前述の母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定(1-5-(2)) 母乳中ビタミン K の抽出・測定 (リパーゼ消化法) と同様の操作により行った。

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。

推定摂取量=

母乳中脂溶性ビタミン濃度×平均哺乳量 (780 mL) <sup>1</sup>

ビタミン A 推定摂取量はレチノール当量 (RE) とした。

レチノール当量 (RE) = 1 μg

all-trans-retinol

12 μg β-carotene

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。

ビタミン D 推定摂取量=

$$D_3 + D_2 + 5 \times [25(OH)D_3 + 25(OH)D_2]$$

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。

ビタミン K 推定摂取量=

$$PK + MK-4 + MK-7 \times 444.7/649$$

444.7 : MK-4 の分子量

649 : MK-7 の分子量

#### d. 血漿中脂溶性ビタミン濃度の測定

ビタミン D 類については前述の方法「1-4-(2) DMEQ-TAD による誘導体化による血漿中ビタミン D 類の測定」で、その他の脂溶性ビタミンについては「1-4-(1) 血漿中脂溶性ビタミンの一斉測定法」で測定した。

#### 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 µg/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<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>2</sub> 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(OH)D<sub>2</sub> 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(OH)D<sub>3</sub>、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<sub>3</sub>、D<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub>、25(OH)D<sub>2</sub> 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(OH)D<sub>3</sub> 濃度の季節変動<sup>2</sup> 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<sub>2</sub> 濃度は冬季に有意に高く、25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は夏季に有意に高かった。また、血漿中濃度は 25(OH)D<sub>2</sub> 濃度は冬季に、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 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  $98 \pm 7$  日で  $0.35 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  と報告されている<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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  $\beta$ -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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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  $\text{D}_3$ 、 $\text{D}_2$ 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  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  $0.092 \text{ ng/mL}$ 、 $0.072 \text{ ng/mL}$ 、 $0.082 \text{ ng/mL}$  及び  $0.0032 \text{ ng/mL}$  であった。5訂増補日本食品成分表<sup>5</sup>では、ビタミン D 活性代謝物を含むビタミン D の濃度は  $3 \text{ ng/mL}$  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  $0.59 \text{ ng/mL}$  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、 $\text{D}_3$  については、出産後 21~89 日で  $0.12 \pm 0.12 \text{ ng/mL}$ 、出産後 90~180 日で  $0.05 \pm 0.04 \text{ ng/mL}$  という報告もあり<sup>4</sup>、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、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  は測定対象としなかったが、Reeve ら<sup>6</sup>、Hollis ら<sup>7</sup> は母乳中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  及び  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$  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  $\text{D}$  および  $25(\text{OH})\text{D}$  の母乳中濃度より算定されており、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  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  $0.46 \mu\text{g/day}$  は妥当であり、現行目安量 ( $2.5 \mu\text{g/day}$ ) 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  $\text{D}_3$  系化合物濃度は夏季に高く、 $\text{D}_2$  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  $\alpha$ -tocopherol 平均濃度は  $5.2 \mu\text{g/mL}$  であった。既報では、日本人の母乳中  $\alpha$ -tocopherol 濃度は出産後 21~89 日で  $2.8 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ 、出産後 90~180 日で  $3.3 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$  と報告されており<sup>4</sup>、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  $4.1 \text{ mg/day}$  も現行目安量の  $3.0 \mu\text{g/day}$  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<sup>8</sup>。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<sup>9</sup>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。

#### 【文献】

1. 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.
2. Kobayashi T, Okano T, Shida S, Okada K, Sugino T, Nakao H, Kuroda E, Kodama S, Matsuo T, Variation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> levels in human plasma obtained from 758 Japanese healthy subjects, J Nutr Sci Vitaminol. 1983, 29; 271-81.
3. 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.
4. 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.
5. 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
6. Reeve LE, Chesney RW, DeLuca HF, Vitamin D of human milk: identification of biologically active forms, Am J Clin Nutr. 1982, 36, 122-6.
7. Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW, Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk, J Nutr. 1981, 111; 240-8.
8. Jansson L, Akesson B, Holmberg L, Vitamin E and fatty acid composition of human milk, Am J Clin Nutr. 1981, 34; 8-13.
9. 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;

### 3. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の 評価 (平成 17 年度～平成 18 年度)

#### 3-1) 骨に対するビタミンKの必要量の評価

1

##### 【目的】

ビタミンKは多くの血液凝固因子の合成において重要な役割を持つことが知られる。また、ビタミンKはオステオカルシン(OC)やマトリックスマテリアル蛋白あるいはプロテインSのようなビタミンK依存性蛋白質を $\gamma$ -カルボキシル化することによって骨代謝において重要な役割を果たす。現在、乳児の場合を除き、出血を伴うようなビタミンK欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低ビタミンK摂取が閉経後女性の大腿骨頸部骨折のリスクを増大させるとともに、大腿骨、脊椎における低BMDと関連があると報告されている。このことは、骨の健康維持に必要なビタミンK量は血液凝固に必要な量よりも多いことを示唆するものである。わが国では骨粗鬆症治療にビタミンK<sub>2</sub>が使用されているが、フィロキノン(PK)やメナキノン(MK-4, MK-7)を中心とするビタミンK栄養が骨粗鬆症予防に果たす役割については十分な検討がなされていない。血液凝固に関連するビタミンK不足のマーカ―にはPIVKaII (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対するビタミンK不足マーカ―には非カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)が用いられる。そこで、骨粗鬆症予防におけるビタミンKの栄養効果を検討するため、30～49歳、50～69歳、70歳以上の3年齢層の日本人成人女性を対象に血中PK及びMK-4、MK-7濃

度を測定し、ucOC濃度を測定するとともに骨代謝関連指標との関連について調査した。

#### 【方法】

対象者：30-88歳までの日本人女性396名（30-49歳 52名、50-69歳 208名、70歳以上 136名）。平均年齢63歳。骨粗鬆症以外の骨代謝疾患をもつ女性及び活性型ビタミンD、ビタミンK、ビタミンK拮抗薬、エストロゲン、bisphosphonate、ステロイドなどの骨代謝関連薬を服用している対象者は除外した。

測定項目：血中PK、MK-4、MK-7濃度、PTH、ucOC、intactOC、Ca、P、BAP濃度、Alp活性、尿中NTx/Cr、DPD/Cr、U-Ca/Cr、BMI、L<sub>2-4</sub>BMD及び椎体骨骨折頻度。統計解析には、JMP 5.0.1Jを用いた。

#### 【結果及び考察】

対象者の血漿中PK、MK-4、およびMK-7濃度は平均それぞれ1.57、0.10、6.47ng/mLであった。血中ucOC濃度及びucOC/intactOC比は、血中PK、MK-7濃度と有意に逆相関したが、MK-4濃度との相関はみられなかった(表3-1)。MK-4濃度がucOC濃度と有意な関係を示さなかったのは、通常の栄養レベルでの血中MK-4濃度が非常に低いことが一因と考えられる。また、骨吸収マーカーである尿中DPD濃度が、PK濃度と有意な負の相関を示した。ucOC濃度や尿中DPD濃度は、年齢とともに増加する因子であり、PK、MK-7はともに年齢と有意な負相関を示している。このことから、PK、MK-7濃度とucOC、尿中DPDの関係

に、年齢が交絡因子として関与する可能性が考えられるため、年齢、BMI、コレステロール、トリアシルグリセロール、PK、MK-4、MK-7を予測因子として、前向き段階的重回帰分析を行い、ucOC、ucOC/intactOC比、DPDの独立影響因子を求めた。その結果、ucOC、ucOC/intactOC比に対しては年齢、PK、MK-7濃度が独立因子として関与し、尿中DPDに対しては年齢、PK濃度が関与することが明らかになった(表3-2)。さらに、年齢層別にPK濃度、MK-7濃度とucOC/intactOC比の関係を評価した結果、図3-1に示すように、ucOC/intactOC比を十分に低下させるために必要なPK、MK-7濃度は加齢とともに上昇することが明らかになった。また、対象者をPK濃度とucOC濃度の中央値(PK：1.18ng/mL、ucOC：3.73ng/mL)で4群(I群：低PK高ucOC群、II群：低PK低ucOC群、III群：高PK高ucOC群、IV群：高PK低ucOC群)に分割して骨折有病率を比較した結果、BMD、年齢とは無関係に脊椎骨折有病率はI群からIV群に向けて低下した。IV群に対するI群、II群の脊椎骨折のオッズ比は各々2.9、2.2で有意に高く、Kの栄養状態が低下すると骨折の危険性が高くなることが示唆された。

以上の結果から、血液凝固を指標とする欠乏症状を示さない場合においても、骨代謝におけるビタミンKの潜在性欠乏が存在する可能性は高く、ビタミンKの栄養状態が骨折に関与する可能性が強く示唆された。また、高齢者では骨におけるビタミンK要求性が高まる可能性が示唆された。

### 3-2) 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3-3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  $\mu\text{g}/\text{day}$ 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  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、15~17歳の5  $\mu\text{g}/\text{day}$ )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 3-4)。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 3-5 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 3-6 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<sup>2,3</sup>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 濃度に相関がみられず、具体的なビタミン D 摂取量を提示することはできなかった。しかし、前述のように今回の対象者は、平均的に食事摂取基準の目安量の 2 倍量程度のビタミン D を摂取しているにもかかわらず、男子学生では約 25~30%、女子学生では約 50%が 20 ng/mL 未満の血中 25(OH)D 濃度を示している (表 3-7)。また、男女ともに食事摂取基準以上のビタミン D (4~6  $\mu$ g/d 以上) を摂取する学生は、90%以上いる (表 3-8)。このことは、現在の食事摂取基準の目安量程度の摂取ではビタミン D 不足に陥る可能性が高いことを示唆する結果である。血中 25(OH)D 濃度は戸外活動量にも強く影響されることから、今後これらの要因を除いたビタミン D の介入試験により、ビタミン D を充足させるための摂取量を求める必要があると考えられた。

### 3-3) 思春期におけるビタミン K 栄養

## 【目的】

ビタミンKは多くの血液凝固因子の合成において重要な役割を持つことが知られる。また、ビタミンKはオステオカルシンやマトリックスマググラ蛋白あるいはプロテインSのようなビタミンK依存性蛋白質を $\gamma$ -カルボキシル化することによって骨代謝において重要な役割を果たす。現在、乳児の場合を除き、出血を伴うようなビタミンK欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低ビタミンK摂取が閉経後女性の大腿骨頸部骨折のリスクを増大させるとともに、大腿骨、脊椎における低BMDと関連があると報告されている。血液凝固に関連するビタミンK不足のマーカーにはPIVKaII (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対するビタミンK不足マーカーには非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) が用いられる。前述のように、骨粗鬆症予防におけるビタミンKの栄養効果を検討するため、高齢者を中心とする日本人成人女性を対象に血中PK及びMK-4、MK-7濃度とucOC濃度の関係を調べ、骨における不足状態を評価した。その結果、血液凝固を指標とする欠乏症状を示さない場合においても、骨代謝におけるビタミンKの潜在性欠乏が存在する可能性は高く、ビタミンKの栄養状態が骨折に関与する可能性を示唆する結果を得た。また、高齢者では骨におけるビタミンK要求性が高まる可能性が考えられた。そこで、次に日本人を対象として思春期におけるビタミンK栄養状態を調査し、ビタミンK不足のカットオフ値の策定を試みた。

## 【方法】

### <対象者>

12~18歳の健常な思春期男女1183名を対象とした。対象者の内訳は、中学1年(男子166名、女子176名)、高校1年(男子194名、女子247名)、高校3年(男子183名、女子217名)である。

### <測定項目>

血中フィロキノン(PK)、メナキノン(MK-4、MK-7)、ucOC濃度およびビタミンK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K不足のカットオフ値は、血中ucOC濃度を指標として評価した。方法は、ある一定のビタミンK濃度を境界値として対象者を高ビタミンK群と低ビタミンK群の2群に分類し、2群間の血中ucOC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3-9に対象者の背景を示す。男女いずれにおいてもPK、MK-4、MK-7濃度は学年の上昇とともに有意に増加した。ビタミンK摂取量は、男子では学年間に差はなかったが、女子では高校1年生において低い結果が得られた。血中ucOC濃度は男女ともに中学1年生で最も高く、学年が上がるにつれて有意に低下した。また、ucOC濃度は女子に比べて男子で有意に高かった。ビタミンK摂取量200  $\mu$ g/day前後であり、2005年版日本人の食事摂取基準による目安量

加した (ANCOVA: 男子 Slope  $p=0.040$ 、女子 Slope  $p<0.001$ )。この回帰式をもとに、前述のカットオフ値の濃度を得るために必要な摂取量を算出すると、表 3-14 のようになる。中学 1 年生が血中ビタミン K 濃度を 1 ng/mL に到達させるためには、男子で 122  $\mu\text{g/day}$ 、女子で 99  $\mu\text{g/day}$  となる。これらは、現在の食事摂取基準のビタミン K 目安量 (男子 70  $\mu\text{g/day}$ 、女子 65  $\mu\text{g/day}$ ) よりも、約 1.5 倍程度高い摂取量になる。高校 1 年生と高校 3 年生では、4 ng/mL に到達させるビタミン K 摂取量 (男子: 高校 1 年 106  $\mu\text{g/day}$ 、高校 3 年 67  $\mu\text{g/day}$ 、女子: 高校 1 年 84  $\mu\text{g/day}$ 、高校 3 年 128  $\mu\text{g/day}$ ) は、高校 3 年生男子を除いて食事摂取基準ビタミン K 目安量 (男子 80  $\mu\text{g/day}$ 、女子 60  $\mu\text{g/day}$ ) に比べて、約 1.3~2 倍程度高い摂取量になる。算出方法としてはかなり単純な方法ではあるが、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。

表 3-15、表 3-16、表 3-17、表 3-18 に、それぞれ血中 PK 濃度、MK-7 濃度、Total ビタミン K 濃度、ビタミン K 摂取量のパーセントイル分布を示した。各学年いずれにおいても、75%以上は骨におけるビタミン K 栄養を満たすと推定される摂取量を摂取しているが、残りの 25%においては不足が危惧される。

思春期の骨におけるビタミン K 不足に関する報告はなく、明確ではないものの、今回の検討で日本人の思春期におけるカットオフ値と必要摂取量を提示できたことは意義が高いと考えられる。

## 【文 献】

1. 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; 380-6.
2. Cheng S, Tylavsky F, Kroger H, Karkkainen M, Lyytikainen A, Koistinen A, Mahonen A, Alen M, Halleen J, Vaananen K, Lamberg-Allardt C, "Association of low 25-hydroxyvitamin D concentrations with elevated parathyroid hormone concentrations and low cortical bone density in early pubertal and prepubertal Finnish girls." *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78, 485-492.
3. Lehtonen-Veromaa MK, Mottonen TT, Nuotio IO, Irjala KM, Leino AE, Viikari JS, "Vitamin D and attainment of peak bone mass among peripubertal Finnish girls: a 3-y prospective study" *Am J Clin Nutr*, 2002, 76, 1446-1453.

(男子：12～14歳の70 µg/day、15～17歳の80 µg/day、女子：12～14歳の65 µg/day、15～17歳の60 µg/day)を十分に上回っていた。

次に、ビタミンKの生体内栄養指標である血中ucOC濃度と血中ビタミンK濃度の相関関係を示す(表3-10)。血中ucOC濃度は、男女ともに血中PK、MK-7およびTotalビタミンK濃度と有意に負相関した。また、男子においてはMK-4濃度およびビタミンK摂取量とも有意な負相関関係を示した。そこで、次に血中ucOC濃度と顕著な負相関関係を示した血中PK、MK-7およびTotalビタミンK濃度を基準として骨に対するビタミンK栄養充足・不足のカットオフ値を評価した。

表3-11に血中PK濃度の0.3, 0.6, 0.9, 1.2 ng/mLを境界として対象者を2群に分け、境界値以上群と境界値未満群のucOC濃度を比較した結果を示す。男子では中学1年生の0.9 ng/mLを境とした場合にp値が最も低く、高校1年生、高校3年生有意差は認められなかった。一方女子では中学1年生では0.3あるいは0.6 ng/mLで有意差がみられ、高校1年生では0.9 ng/mL、高校3年生では0.6と0.9 ng/mLに有意差が認められた。男女合わせたカットオフ値を一貫して決定することは困難であるが、少なくとも0.6～0.9 ng/mL以上のPK濃度を維持することが望ましいと推察された。

次に、MK-7濃度を用いて同様の検討を行った(表3-12)。境界値は、血中濃度の中央値付近である0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ng/mLに設定した。男子の場合、中学1年生では全ての境界値で有意差が見られ、高校1年生では

1.0 ng/mL、高校3年生では1.0, 2.0, 4.0 ng/mLで有意差がみられた。一方、女子では中学1年生では1.0, 2.0, 4.0 ng/mL、高校1年生では2.0 ng/mL、高校3年生では2.0と4.0 ng/mLで有意差が得られた。男女学年を通してみると、血中MK-7濃度が1.0～2.0 ng/mL以上に維持することが望ましいと判断される。

最後に、PK、MK-4、MK-7濃度を合計したTotalビタミンK濃度を用いてカットオフ値の評価を行った(表3-13)。男子の場合、中学1年生では全ての境界値で有意差が見られたが、高校1年生では有意差はとれず、高校3年生では2.0, 4.0, 6.0 ng/mLで有意差がみられた。一方、女子では中学1年生では1.0 ng/mL、高校1年生では4.0と6.0 ng/mL、高校3年生では2.0, 4.0, 6.0 ng/mLで有意差が得られた。男女学年を通してみると、p値が低く学年を通して有意差が得られやすい4.0 ng/mL以上にTotalビタミンK濃度を維持することが望ましいと判断される。ただし、中学1年生では1.0～2.0 ng/mLでもucOC濃度を低下させることができる判断される。

次にビタミンK摂取量と血中ビタミンK濃度との関係を調べた(図3-2)。ビタミンK摂取量と血中TotalビタミンK濃度間には、男女学年をとわず、有意な正相関関係が得られた。また、表3-9にも示したように、ビタミンK摂取量は学年間でほとんど差がないにもかかわらず、血中濃度は学年の上昇とともに増加するため、ビタミンK摂取量と血中TotalビタミンK濃度の回帰式の係数は学年が上がるにつれて有意に増

4. 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（脂溶性ビタミン）～（平成18年度）

【目的】

ビタミンには健康の増進や栄養素の代謝の異常を予防する効果、すなわち生活習慣予防の効果があることがわかってきた。ビタミンCは、血漿中の濃度が200 mg/日の投与で飽和するという報告があるが、他のビタミンに関する報告はない。水溶性ビタミンの場合、生体内での必要量を超えて摂取されたビタミンは尿中に排泄されることから、摂取量、血中濃度、尿中含量の関係から生体飽和量を求めることができると考えられる。そこで、ビタミン摂取量を順次増大させた時に血液中と尿中のビタミン含量とそれに関連する生体指標がどのように応答するのかを調べ、生活習慣病の一次予防が期待できるビタミンの摂取量を明らかにする研究を計画した。脂溶性ビタミンの場合、尿中排泄量から飽和量を求めることはできない。そこで、ビタミンDについてはその栄養指標となる血中25(OH)D濃度とビタミンDの充足・不足の生体指標の血中PTH濃度を測定し、充足量に到達したか否かで評価した。ビタミンKについては、血中ビタミンK濃度と骨における充足・不足の生体指標である非カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)濃度および血液凝固能の指標としてPIVKaIIを測定した。また、ビタミンEは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の4種の同属体の血中濃度を、ビタミンAについては血中レチノール濃度を測定した。

【方法】

＜対象者＞

本研究の目的、内容、起こりうる危害、被験者の権利、プライバシーの保護について、あらかじめ説明し、文書により参加を申し込んだ男子12名。被験者は、問診後、実験に参加可能と判断された人である。平均年齢26.5 ± 10.4歳(19歳～55歳)。

＜摂取量および方法＞

ビタミン剤の摂取スケジュールは、表4-1に示した通りである。対象者は最初の4日間同一食を摂取し、5日目に採血後、ビタミン剤①を1日3回、朝・昼・夕食後に7日間連日摂取した。翌日の朝に採血後、ビタミン剤②を同様に7日間連続摂取した。また、翌朝採血後にビタミン剤③を7日間連続摂取し、摂取終了後の翌朝に採血した。ビタミン剤①、②、③に含まれる脂溶性ビタミン含量は表4-2に示す通りである。ビタミン剤①には、2005年版日本人の食事摂取基準に相当するビタミンE((+)- $\alpha$ -トコフェロール)9 mg、ビタミンD(コレカルシフェロール)0.005 mg、ビタミンK(PK:フィロキノン)0.075 mg、および食事摂取基準の60%に相当するビタミンA(レチニルアセテート)RE 0.45 mgが含まれる。ビタミン剤②および③は、それぞれビタミン剤①の3倍量および6倍量である。ビタミンAについては、ビタミン剤③の最大摂取量が食事摂取基準の上限値を超えないように含量を調整した。摂取水分は所定のペットボトル入りの水のみである。ただし、飲水量は自由である。

#### <測定項目>

血清中のレチノール、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\delta$ -トコフェロール、25OHD、PTH (intact PTH)、PK、メナキノン (MK-4、MK-7)、ucOC 濃度を測定した。また、血中総脂質、総コレステロール、中性脂肪濃度についても測定した。

#### <統計解析>

1 週目 (摂取前)、2 週目 (ビタミン剤①を 1 週間摂取後)、3 週目 (ビタミン剤②を 1 週間摂取後)、4 週目 (ビタミン剤③を 1 週間摂取後) の血中脂溶性ビタミン濃度および生体指標である PTH あるいは ucOC 濃度の平均値を、一元配置分散分析法

(ANOVA) により解析した。ANOVA で有意になったパラメーターにつき、1 週目をコントロールとする対応のある t-検定を行い、1 週目 (初期値) に対して有意に変化した週を求めた。

#### 【結果および考察】

##### <ビタミン A>

血中レチノール濃度は、いずれの含量のビタミン剤の摂取にかかわらず変化しなかった (表 4-3, 図 4-1)。摂取されたビタミン A は、主に肝臓の細胞内レチノール結合たんぱく質 (CRBP) と結合して貯蔵される。肝組織のビタミン A 濃度は  $30 \mu \text{g/g}$  が最大限と考えられており、平均肝臓重量が 1.5kg とした場合の肝臓で貯蔵できるビタミン A は 450 mg と推定される<sup>1,2</sup>。摂取したビタミン A が肝臓における貯蔵可能な量以下であれば、血中濃度はあまり変化しない。一方、

最低量の肝臓内ビタミン A 蓄積量は  $20 \mu \text{g/g}^3$  とされており、肝臓の蓄積量がこれ以下になると血漿中レチノール濃度は低下する<sup>4</sup>。血中では RBP-トランスサイレチン (TTR) 複合体と結合して輸送され、健康成人の平均血中レチノール濃度は  $0.50 \pm 0.31 \text{mg/L}$  と報告されている。また、 $0.3 \text{mg/L}$  以下がビタミン A 欠乏<sup>5</sup>、 $1.0 \text{mg/L}$  以上が過剰の目安<sup>6</sup>となっている。今回の対象者の血中レチノール濃度は平均的であり、個々の数値からビタミン A 欠乏者もなく、摂取後の過剰者もないと判断された (図 4-2)。ビタミン A の栄養状態の判定指標としては、肝臓のビタミン A 貯蔵量が最も良い指標になるとされ、現在の食事摂取基準では、体内のビタミン A 消失率、体重あたりの肝臓重量、ビタミン A 蓄積量の体全体と肝臓の比 1.1 およびビタミン A 蓄積効率から算出されている。今回使用したビタミン剤②のレチノール含量は推奨量の 1.8 倍、ビタミン剤③では 3.6 倍となっている。摂取期間を通して平均血中濃度に変化がないことから、今回の摂取量は肝臓最大貯蔵量の範囲内の量であったと考えられるが、個々の濃度変化を観察すると 4 週目では 11 名中 4 名 (36% : No.1, 4, 7, 9) において血中濃度の上昇が観察されている。このことから、ビタミン剤③の  $2.7 \text{mg RE/日}$  は、肝臓での飽和量に近い量である可能性が示唆された。

##### <ビタミン E>

血中  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、摂取量の増加とともに有意に増加した (表 4-3, 図 4-3)。個々の数値の変動においても、例外なく上昇が見られる (図 45-4 最上段)。ビ

タミンEの欠乏指標となる血中 $\alpha$ -トコフェロール濃度は5 mg/L以下<sup>5</sup>であることから、欠乏症と考えられる対象者はいないと判断された。血中 $\alpha$ -トコフェロール濃度は、血中コレステロールあるいはトリグリセリド濃度と相関することが知られ<sup>7</sup>、今回の場合も総脂質 (p=0.033)、総コレステロール (p=0.023) と相関した。また、図4-5に示すようにBMIとも有意に相関した。また、血中レチノール濃度と $\alpha$ -トコフェロール濃度も有意な正相関関係を示した(図4-6)が、BMI(図4-7)や総脂質、総コレステロールとレチノール濃度には統計的に有意な相関はみられなかった。前述のように、レチノールは肝臓で合成されるRBP-TTR複合体と結合して血中を循環することから、肝臓でのこれらの蛋白質の合成能が血中濃度に関与していると考えられる。 $\alpha$ -トコフェロールは、肝臓中で $\alpha$ -トコフェロール輸送蛋白質( $\alpha$ -TTP)を介して、VLDLに引き渡され血中を循環する。ビタミンEは、目安量の10倍程度までの範囲では、摂取量に比例して血中 $\alpha$ -トコフェロール濃度が上昇し、それ以上になると肝臓の $\alpha$ -TTPとの結合能に制限があるために上昇率は低下するといわれている<sup>8</sup>。今回の対象者において、大部分の血中 $\alpha$ -トコフェロール濃度は1~4週目まで直線的に上昇しているが、No.2とNo.4の対象者においては3週目から4週目にかけての上昇率が低い(図4-4)。4週目の摂取量は目安量の6倍であり、10倍以上ではないものの個人レベルでは摂取量が肝臓の $\alpha$ -TTPに対して飽和し始める量ではないかと推察される。一方、 $\gamma$ -トコ

フェロール濃度は摂取量の増加とともに顕著に低下し、 $\beta$ -トコフェロール濃度も有意に低下した。 $\gamma$ -および $\beta$ -トコフェロールも $\alpha$ -トコフェロールよりは弱いものの $\alpha$ -TTPと結合するため、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量の増加に伴って肝臓で $\alpha$ -TTPと競合することにより血中濃度が低下したと考えられる。

#### <ビタミンD>

ビタミンD栄養を最もよく反映するビタミンD代謝物は25(OH)Dである。25(OH)D濃度測定法として現在最も繁用されているのは、Radioimmunoassay法(RIA法)であるが、この方法では血中の25(OH)D<sub>2</sub>、25(OH)D<sub>3</sub>および24,25(OH)<sub>2</sub>Dに対して同等の交差反応性を示す抗体を用いるため、RIA測定値はこれらの代謝物の合算値を示す。一方、われわれが新規に開発したLC-APCI/MS/MS法による測定(平成16年度に報告)では、これらの代謝物を全て分別定量できる。そこで、今回の研究ではLC-APCI/MS/MS法によりビタミン剤に配合されたコレカルシフェロール(ビタミンD<sub>3</sub>)由来の25(OH)D<sub>3</sub>濃度と25(OH)D<sub>2</sub>、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を分別定量した。測定値としては、25(OH)D<sub>3</sub>濃度およびRIA法で求められると同様の25(OH)D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>と24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の合算値を示す。

表4-3に示したように、血中25(OH)D<sub>3</sub>濃度は、摂取期間を通して有意に上昇した。対象者の初期血中25(OH)D<sub>3</sub>濃度は20 ng/mL前後であり、平均的にはビタミンD栄養がほぼ充足された状態であったといえる。血中25(OH)D濃度の半減期は1ヶ月程

度と長い間、この初期値のビタミンD栄養は試験開始前のビタミンD摂取状態を反映している。一方、血中PTH濃度に有意な変化は見られなかった。血中PTH濃度の健常者の基準値は10~60 pg/mLであり、いずれの対象者もこの範囲に入っていた。血中PTH濃度は25(OH)D濃度が20 ng/mL以下で上昇し始めることから、ビタミン栄養がある程度充足している今回の対象者ではビタミンD摂取によるPTH濃度への影響は低かったと考えられる。一方、個々の測定値を比較すると、血中25(OH)D濃度とPTH濃度の変化にはある一定の関係が見られるように思われる。図4-8に示すように、血中PTH濃度が初期値に比べて低下した対象者は、No.3, 4, 9, 12である。この4名の血中25(OH)D<sub>3</sub>あるいは25(OH)Dおよび24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の合算値は良好に上昇し、4週目には30 ng/mLを超えている。No.5とNo.7に関しては、例外的であるが、No.5の血中PTH濃度の初期値は健常者下限に近く(16 pg/mL)、血中25(OH)D濃度が十分に上昇してもPTH濃度はそれ以上に低下しなかったのではないかと考えられた。No.7において、PTH濃度が低下しなかった理由は不明であるが、PTH濃度にはCaおよびP摂取量や腎機能なども関与するためこれらが影響した可能性も考えられる。Chapuyら<sup>9</sup>は、PTH濃度低下を指標としたビタミンD栄養のカットオフ値として30 ng/mLを提案しており、今回の結果からも血中25(OH)D濃度が30 ng/mLを超えるか否かはPTH濃度低下に影響を与えるものと考えられた。

ビタミンDの体内飽和量の評価にあつ

ては、ビタミンDの生体内栄養指標であるPTH濃度が一定の低値に達し、それ以上に低下しないビタミンD摂取量あるいは血中25(OH)D濃度ということを念頭に検討した。その結果、個々のデータから20~30ng/mLの範囲ではPTH濃度はほとんど変動しないが、30 ng/mL以上に上昇する場合はPTH濃度がさらに徐々に低下する傾向がみられ、明らかな体内飽和量を見出すことはできなかった。PTH濃度が一定の低値に達するのは、少なくとも25(OH)D濃度30 ng/mL以上であると思われる。本試験の最高摂取量である30 μg/dayの1週間摂取では、血中25(OH)D濃度が30 ng/mLに達する対象者とそうでない場合があるが、体内飽和量に達する摂取量は30 μg/day以上である可能性が高い。しかし、長半減期の25(OH)D濃度がビタミンDの摂取量を反映して反復摂取後一定濃度維持に到達するには約1ヶ月間が必要であると考えられ、もう少し長期間の観察が必要と判断された。

#### <ビタミンK>

ビタミンKには、K<sub>1</sub>(フィロキノロン:PK)と側鎖構造の異なるK<sub>2</sub>(メナキノロン)があり、ビタミン剤にはPKを添加している。血中ビタミンK濃度として、PKとメナキノロン-4(MK-4)、メナキノロン-7(MK-7)を測定した結果、いずれの濃度も有意に変化しなかった(表4-3)。ビタミン剤にはPKが添加されているため、血中PK濃度の上昇が予想されたが、上昇傾向がみられたのみでその変化は統計的に有意ではなかった。また、ビタミンK濃度と逆相関することが知られるucOC濃度も、低下の傾向はみら



れたが摂取期間を通して有意に変化しなかった。表には示していないが、PIVKaIIは十分な低値を示し、変化はみられなかった。個々の血中PK濃度とucOC濃度を図4-9に示した。血中PK濃度は、ほとんどの対象者において上昇したが、No.9では低下、No.11, 12では1週目と4週目の濃度にほとんど変化がみられなかった。そこで、PK濃度が著減したNo.9を除いて、血中PK濃度の変化率を計算した。変化率の計算は、1週目の血中濃度を1として2週目、3週目、4週目の変化率を個々に算出した。図4-10の左に全対象者のPK濃度変化率を、右にNo.9除外後の変化率を示した。その結果、No.9除外後の血中PK濃度は有意に上昇し、4週目の上昇率は1週目の1.24倍程度であった。フィロキノンは代謝回転が速く、経口摂取後4~6時間目に最高濃度に達し、12時間後には最高濃度の15%程度に減少、24時間後にはほとんど血中から消失する<sup>10, 11</sup>。一方、MK-7の血中半減期はPKに比べてかなり長い<sup>10</sup>。今回の研究プロトコールでは、前日の夕食後にビタミン剤を摂取し、翌朝の朝食前に採血するため、摂取後の血中PK濃度かなり低下した状態であり、血中濃度は摂取量を反映し難かったと考えられた。

一方、No.5, 7, 10, 11, 12の対象者では血中ucOC濃度が低下したが、血中PK濃度が上昇した対象者とは必ずしも一致しなかった。ucOC濃度の変化率も低下傾向にあったが、有意ではなかった(図4-11)。これらのことから、今回の検討ではビタミンK摂取量からビタミンKの充足量あるいは飽和量を知ることが困難であると考えられた。本研究に

類似した報告として、Schurgersら<sup>12</sup>は抗血液凝固薬を服用させた健常成人に、50、100、150、200、250、300、500  $\mu\text{g/day}$ を順次7日間ずつ摂取させ、プロトロンビン時間(INR値)、血中非カルボキシル化凝固因子II(ucFIIc)およびucOC濃度の変動を調べている。その報告では、血液凝固に関連するINRは150  $\mu\text{g/day}$ で、ucFIIcは100  $\mu\text{g/day}$ で有意に低下したのに対し、骨関連指標であるucOCは300  $\mu\text{g/day}$ で有意に低下している。OCのカルボキシル化に必要なビタミンKは血液凝固に必要な量より高く、ビタミン剤②(270  $\mu\text{g/day}$ )に近い服用量でucOCを低下させている。Schurgersらは予め抗血液凝固薬を服用させた健常成人を対象としているが、われわれの検討では全くの健常者にPKを摂取させているため、オステオカルシンのグラ化に関する作用が現れ難かったものと考えられた。

前述のように、血中PKあるいはMK-7濃度とucOC濃度は負相関することが知られており、われわれもucOC濃度を十分に低下させるために必要な血中PK、MK-7濃度は、年齢とともに増加することを昨年報告している<sup>13</sup>。そこで、1~4週目の全ての検体の血中PK濃度とucOC濃度の関係を調べた結果、いずれにおいても有意な相関はみられなかった(図4-12)。しかし、図4-13に示すようにNo.4の検体のみが血中PK濃度が高いにもかかわらずucOC濃度が例外的に高く、No.4を除く対象者で再度相関関係を評価した結果、PK、MK-7、TotalビタミンK濃度のいずれともucOC濃度は有意な負の相関関係を示した。血中ビタミンK

濃度は、摂取量と別に明らかに個人差がある(図 4-9)。血中では主にリポ蛋白質と結合して輸送されるため、一般的には血中のトリアシルグリセロール濃度と相関することが知られているが、今回の場合、トリアシルグリセロール、血中総脂質、総コレステロール濃度との相関はみられなかった。初期値の血中 PK 濃度とレチノール濃度あるいは  $\alpha$ -トコフェロール濃度に相関は見られなかったが、BMI と血中 PK 濃度は有意に正相関した ( $p=0.0243$ ,  $r^2=0.447$ )。MK-4 と MK-7 濃度については、BMI との相関は認められなかった。

これらのことから、血中 PK 濃度は BMI に関連する何らかの因子によってある程度規定されるものと判断され、ucOC 濃度は血中 PK 濃度に相関すると考えられた。PK 摂取の増加とともに ucOC の低下が見られる対象者もあったが、今回の研究結果からビタミン K 摂取の飽和量を求めることは困難であった。

#### 【参考文献】

1. Silverman AK, Ellis CN, Voorhees JJ, Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J Am Acad Dermatol*, 1987, 16(5 Pt 1); 1027-39.
2. Leo MA, Lieber CS, Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69; 1071-85.
3. Olson JA, Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am J Clin Nutr*, 1987, 45; 704-16
4. Loerch JD, Underwood BA, Lewis KC, Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. *J Nutr*, 1979, 109; 778-86.
5. Haller J, Lowik MR, Ferry M, Ferro-Luzzi A, Nutritional status: blood vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotene. Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr*, 199, 45 S3; 63-82.
6. Bendich A, Langseth L., Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr*. 1989, 49; 358-71.
7. Gomez-Coronado D, Entrala A, Alvarez JJ, Ortega H, Olmos JM, Castro M, Sastre A, Herrera E, Lasuncion MA, Influence of apolipoprotein E polymorphism on plasma vitamin A and vitamin E levels European *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 32; 251-258
8. 平井俊策 編, ビタミンEの臨床—最近の知見と臨床応用への展望—, 医薬ジャーナル社, p35-37.
9. Chapuy MC, Meunier PJ, Prevention of secondary hyperparathyroidism and hip fracture in elderly women with calcium and vitamin D<sub>3</sub> supplements. *Osteoporos Int*. 1996, 6 Suppl 3:60-3.
10. Schurgers LJ, Vermeer C, Determination of phylloquinone and menaquinones in food, *Haemostasis* 2000, 30; 298-307.
11. Hagstrom JN, Bovill EG, Soll RF, Davidson KW, Sadowski JA, The pharmacokinetics and lipoprotein fraction distribution of intramuscular vs. oral vitamin

- K<sub>1</sub> supplementation in women of childbearing age: effects on hemostasis. *Thromb Haemost*, 1995, 74; 1486-90.
12. Schurgers LJ, Shearer MJ, Hamulyak K, Stocklin E, Vermeer C, Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects. *Blood*, 2004, 104; 2682-9.
13. 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; 380-6.

【投稿論文】

1. 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.
2. 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
3. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T, Method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry” *Anal. Chem.* 2005, 77; 3001-7.
4. 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.
5. 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; 380-6.
6. 津川尚子、鎌尾まや、須原義智、岡野登志夫「血中 25-ヒドロキシビタミン D の新規定量法の開発と臨床応用」 *Osteoporosis Japan*, 2006, 14; 679-684
7. Naoko Tsugawa, Masataka Shiraki, Yoshitomo Suhara, Maya Kamao, Kiyoshi Tanaka, and Toshio Okano, Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab*, 投稿中
8. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, Nishino R, Ukita T, Tanaka K, Okano T, Multianalyte quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, 投稿中

【学会発表】

1. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登

- 志夫「内部標準-蛍光検出 HPLC 法を用いた食品中ビタミン K 類縁体の定量」日本栄養・食糧学会近畿支部大会、平成 16 年 10 月 16 日、滋賀県立大学
2. 津川 尚子、須原 義智、岡野 登志夫「RIA 法と LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度測定の比較」第 6 回日本骨粗鬆症学会、平成 16 年 11 月 18 日、大宮..
  3. 津川 尚子、岡野 登志夫、他「思春期の骨代謝におけるビタミン D 栄養の重要性」第 6 回日本骨粗鬆症学会、平成 16 年 11 月 18 日、大宮..
  4. 津川 尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野 登志夫、他「日本人高齢女性を中心としたビタミン K 栄養状態と骨代謝の関係」第 53 回関西カルシウム懇話会平成 16 年 11 月 23 日、大阪.
  5. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登志夫「内部標準-蛍光検出 HPLC 法による各種食品中ビタミン K 類縁体含量の測定」日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月 30 日、東京
  6. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫「LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度の測定」日本薬学会第 125 年会、平成 17 年 3 月 30 日、東京.
  7. 津川 尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫、他「思春期の骨代謝とビタミン D 栄養の関係」第 54 回関西カルシウム懇話会、平成 17 年 4 月 23 日、大阪.
  8. 鎌尾まや、上野雅子、山口紀子、岡野登志夫「日本人の食事性ビタミン K 摂取量調査を目的とした食品中ビタミン K 類縁体の定量」日本ビタミン学会第 57 回大会、平成 17 年 5 月 26 日、志摩
  9. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫「LC-APCI-MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度測定法の開発」日本ビタミン学会第 57 回大会、平成 17 年 5 月 27 日、志摩
  10. 岡野登志夫、津川尚子、須原義智、鎌尾まや “A Precise and Sensitive Method for the Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry” 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 2005. 6.26 Geneva.
  11. 津川尚子、岡野登志夫、他 “Vitamin D Status, Parathyroid Function and Bone Mineral Density in Japanese Adolescent Males and Females” 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 2005. 6.27 Geneva.
  12. 鎌尾まや、内野由理、上野雅子、山口紀子、津川尚子、白木正孝、上西一弘、石田裕美、岡野登志夫「高齢者におけるビタミン K 栄養調査を目的とした血漿中および食品中ビタミン K の定量」第 7 回日本骨粗鬆症学会、平成 17 年 10 月 14 日、大阪
  13. 津川尚子、須原義智、鎌尾まや、岡野登志夫、他「日本人高齢女性における血中ビタミン K 濃度と骨折との関係」、第 7