

食品の安定供給と安全性との戦い

— 食の教育の大切さ

はじめに

健康は誰もが求める本能の一つである。普段の生活習慣（ライフスタイル）が健康を支配している。生活習慣とは衣食住の習慣である。私の所属する生活文化学科の英語名はDepartment of Life Style Studiesという。この学科の中で特に食生活にかかわる専攻を担当している。食生活には大きく分けて、体に入るまで目に見える食品について追求する学問分野と、食品が口の中に入って目に見えない化学成分（体に必要な化学成分を栄養素という）となり、その化学成分の運命について追求する学問分野に分けることができる。私はどちらかといえば栄養素の体内運命に興味がある。得意とする学問分野はビタミン学である。私は栄養素の化学と栄養素自体の代謝ならびに栄養素から合成される生体成分の代謝を通じて、食品の安全性を考えている。

普段口にする食品に栄養素以外の化学成分が含

まれていなければ、理想の食品と言えそうだが、実際にはそうではないと思う。完璧なバランス（これは、日本人の食事摂取基準 2005年版、（写真1）に示された栄養素量を摂取すること）で栄養素だけを含む食品（粉状である）を作つて、学生に食べさせているが、まずくてまずくて一食分を食べることができた学生はいない。私も食べることはいまだにできない。完璧な栄養素組成であり、しかも完璧に安全性が確立されている食品でありながら、食べられない。しかしながら、この粉状の安心・安全、完璧食品に適量の水を混ぜ、こね、焼成すると、すなわち非栄養成分ができる

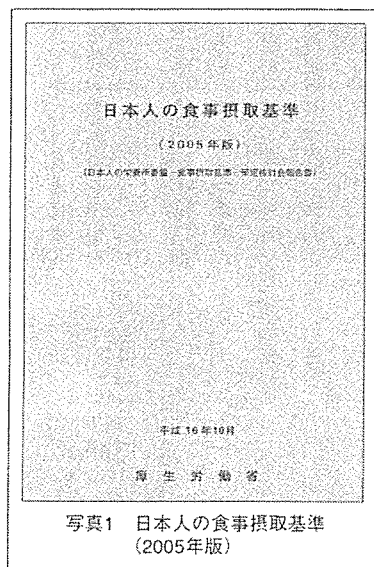


写真1 日本人の食事摂取基準 (2005年版)

と、したがって当然栄養価は下がるが、食べられるようになる（写真2）。粉を焼いている間に複雑な化学反応が起きているが、私たちはこの化学反応を完全には理解していないし、生成した非栄養成分が何種類できて、その中のどれが毒性を持っているか否かに関する情報もない。

しかし、恐らく誰もこの毒性を調べようとは思わないだろう。つまり、この焼成した食品に関する科学的な安全情報は全くないにもかかわらず、学生は毒性を調べようとも言わずに、安心して一食分を食べてしまう。先生である私を信じているからであろう。ただし、安心だと思った根本的な理由はそうではないだろう。自分が栄養素に関する知識を持っており、栄養素を自分で計り取り、自分で水を加え、自分で焼成しているからである。焼成中にどのような栄養素間の反応が起き、どの程度の栄養素が破壊されるかを完全ではないが、大体理解しているのである。学生ではなくても、ほとんどの人は大体理解している。肉を焼き、パンを焼くことぐらい経験しているからである。そ



滋賀県立大学人間文化学部
生活文化学科食生活専攻教授

● 柴田克己

してそれを食べても大丈夫だと経験的に知っているからである。私は、食の安心はこの経験と、大體理解しているという感じが大切ではないかと思う。

ところが、食品の安定供給を達成するために、私たちの経験をはるかに超えた方法とはるかに理解を超えた方法でかつ非常に巧妙な方法で、食品が世界各地から届くようになった。生産者の常識と販売業者の常識、消費者の常識が重なり合わなくなってしまった。狭い地域では自然に情報交換が行われていたが、世界中から食料が供給されるようになり、それも難しくなった。したがって、情報交換（リスクコミュニケーション）が必要となった。この三者の間をうまく調整する役割として、国と地方公共団体が乗り出した。

国と地方公共団体の取り組み

国のレベルでは平成十五年の食品安全基本法を受けて、内閣府に食品安全委員会（<http://www.fsc.go.jp>）が設置され、食品の安全性の確保に努めている。地方公共団体も「食の安全・安心」に関するホームページを作成している。例えば、私の所属する滋賀県立大学の設置者である滋賀県も県民文化生活部生活衛生課、食の安全推進室（<http://www.pref.shiga.jp/e/shoku/index.htm>）が食の安全情報の事務を担当している。ホームページは充実しており、必要な情報がほとんど得られる。行政の監視体制も正常に機能しているようだ。たまに、偽装表示の事件、厚生労働省が認可し

ていない食品添加物の事件、残留農薬の事件、食品への生体異物の混入事件、許可されていない遺伝子組み換え食品事件などがニュースとなるのは、監視体制が正常に機能していることの成果である。私は、国や地方公共団体が行っている「食の安全対策」は一つのことを除き、十分であると思っている。

足りないリスクコミュニケーション

「消費者の理解力」を高める必要がある。消費者が食品への不信任・不安感を持たないようにするには、「食品の生産から流通・販売」の過程を大體理解してもらうことである。日本は世界中から食料が供給されている。私たちが食べる食品がどこで栽培されたものなのか、どこで飼育されたものなのか、どこで漁獲されたものなのか、簡単には分からない。そこで食材の経歴を記録していく方法が考案された。「トレーサビリティ」である。しかし、これをすべての食料に適用することは無理なので、安全性に関して消費者の関心が高いと行政が判断したものだけに限られている。履歴が追跡できない食料がほとんどであるので、行政側は同じことをホームページで挙げている。それは「地産地消」である。これは、食品が世界中から供給されている現状を否定している。

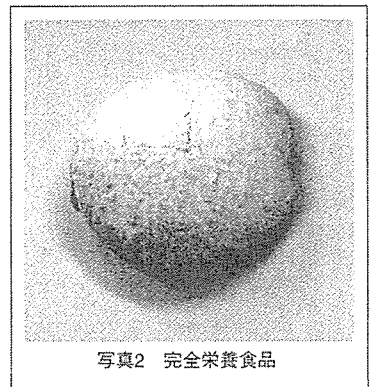


写真2 完全栄養食品

地域には風土に合った産業がある。これをうまく利用し合っているからこそ、今の繁栄がある。消費者に説明することが面倒であるといつて、「地産地消」という言葉で逃げてはいけない。農薬を使用しない食品が安全ではない、食品添加物を使用しない食品が安全でもない、遺伝子組み換え食品が危険でもない。「足りないことは教育である」、はやりことばで言えば、「リスクコミュニケーション」である。

食の教育の重要性

食の教育というと、「食育」という言葉が浮かぶが、今、行政やマスコミ関係が取り上げる内容の食育では不満である。私はまず第一に栄養素の化学とその生体内での利用、つまり栄養素の生体利用率に重点をおいてほしいと思っている。

食べ物に対して第一義に要求することは、健康を維持・増進するに足る栄養素の安定供給である。この点を押さえた上での議論が必要である。地球上のすべての生命体は共通の生体成分から成り立っているため、相互に依存し合って共生しているといえは、聞こえはいいが、言葉を換えれば、互いに食料にし合って生きているとも言える。食料になりたくなければ、自分には毒性を示さないが、食べた相手には毒性を示す生体成分を作り出し、自分を守らなければならぬ。したがって、生命体は何かの毒性成分を含んでいることが当たり前である。特に、動くことのできない植物

は毒性成分を作っている。品種改良を重ねて、そして生産者がいろんな手段で外的から植物を守ることで、植物自体は毒性成分を弱める。これが、日ごろ私たちが食べている野菜や果物である。

食べ物に対して二番目に要求されるのが、健康障害を引き起こすほどの量の毒性成分を含まないことである。しかしながら、この天然毒に関しては、私たちは比較的寛容に受け入れられていると思う。キャッサバというイモは熱帯地方の主食であるが、猛毒の青酸を含んでいる品種もある。この場合は水にさらすことで青酸を除去して、食べ物として利用している。このような例は多くある。消費者がどのような毒物が入っていて、どのような処理をすれば健康障害を引き起こさない量程度にまで、少なくともできるかを知っているから、キャッサバを食べて死亡者が出ても、人々はパニックにはならない。

ところが、外食の増加、調理済み食品の使用増加、食の国際化の拡大によって、何を食べているのか分からなくなってきた。国の食品安全委員会ができるきっかけとなったBSEでは、毒性を示す異常プリオンを自分で閾値以下にまで除去できないし、異常プリオンを含むBSE牛を食べてもすぐに症状がでるわけでもなく、十年後だとか、二十年後だとかいわれ、いつ変異型クロイツフェルト・ヤコ

ブ病になるのか分からない。安心できないから、牛肉を食べるのを一切やめようとすることもできない。人は牛肉がうまく、かつ非常に優れた栄養素の供給源であることを知ってしまったからである。それで、パニックとなる。

「生産者、販売業者、消費者よし」で食の信頼を

滋賀県は「食の安全・安心(写真3)」の取り組みに関して、十項目を挙げている。その中で「消費者団体等の自主的な食の安全活動を支援します」と、「子どものころから食への知識と理解を深める食の教育を推進します」という内容が組み込まれている。まさに不安感を取り除くにはこの二つの項目が必須である。この二つは、学校教育では「家庭科の食生活分野」に属する。手元にある高校生用の家庭科の食生活分野を

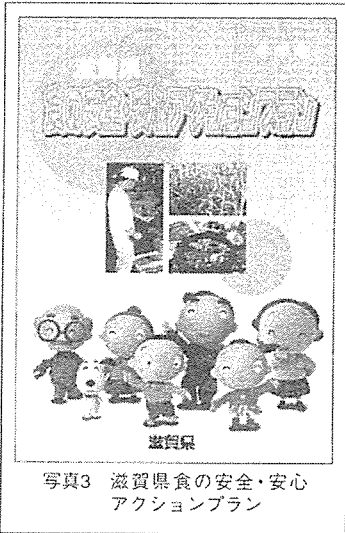


写真3 滋賀県食の安全・安心アクションプラン

読んでみると、非常に簡潔にまとまっている。小学校でも中学校でも「家庭科」がある。食に対する不安を取り除くには教育が大切である。国や地方公共団体が一つの部や課で対応しているのではなく、縦断的な組織で対応していることを学校教育でも見習う必要がある。例えば、滋賀県は県民文化生活部県民生活課、

生活衛生課、健康福祉部健康対策課、医務薬務課、

農政水産部環境こだわり農業課、農産流通課、畜産課、水産課が「食の安全」に対して共同して取り組んでいる(写真4)。家庭科の食生活に関する分野は一人の家庭科担当の教員だけではなく、全科目の先生と学校栄養士が共同して食の不安を取り除く教育をしては、と考える。

その際に最初に教育することは、食べ物は生体を健康に維持し、増進させるための栄養素を供給



写真4 滋賀県主催の「食の安全・安心シンポジウム」。筆者が基調講演を行った後、質問を受けているところ

するものであること、つまり食料資源として安定供給が第一義であること、次が食料資源から有害な物質を取り除き(主な方法は調理である)、かつ栄養素を生体が有効に利用できる形態に変えることである。これらの過程の教育を家庭科の先生だけに頼らずに、全教科の先生が「食生活」を考え、教えることで、幅の広い視野が得られるものと思う。学校以外では生産者と販売業者、消費者が行政の力を借りて、本音でリスクコミュニケーションを行うことである。食品の安定供給と食品の安全性の妥協点、「まあ、しかたがないな」を見つめることが、失いつつある「食への不信感」を取り戻すのに必要である。近江商人の家訓の一つに「三方よし」(売手によし、買手によし、世間よし)がある。「生産者よし、販売業者よし、消費者よし」で食の信頼を取り戻そう。

ビタミンの食事摂取基準

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科教授（食生活専攻）

柴田克己

13種類すべてに 食事摂取基準を設定

ビタミンと呼ばれる栄養素は13種類あります。今回の「日本人の食事摂取基準（2005年版）」では、13種類すべてのビタミンに食事摂取基準が策定されました。基本的な策定方針は、前回の「第六次改定日本人の栄養所要量―食事摂取基準」と変わりがありません。

今回の改定では、ビタミンの数値はどの化合物の量としての数値であるかを明確にしました。たとえば、ビタミンB₁と書いただけでは、チアミンなのか、一般的に市販されているチアミン塩酸塩の量なのかわかりません。そこで、「チアミン塩酸塩としての量」と

明確に書きました。

ビタミンAにおいて、β-カロテンのビタミンA効力が見直され、レチノールの $\frac{1}{2}$ の効力としました。ビタミンEに関しては、人において利用されるのはα-トコフェロールだけであることがわかりましたので、α-トコフェロールのみの量としました。

ビタミンK活性をもつ化合物には植物に含まれるフィロキノン、納豆に多く含まれるメナキノン-4とメナキノン-7があります。フィロキノンとメナキノン-4の分子量はほとんど同じですが、メナキノン-7の分子量は、フィロキノンとメナキノン-4の約1・5倍もあります。そこで、ビタミンKの量は、フィロキノン（μg）+メ

ナキノン-4（μg）+ $\frac{1}{5}$ メナキノン-7（μg）としました。

栄養状態の指標は欠乏予防と 過剰摂取防止の数値

ビタミンの食事摂取基準では、欠乏を予防するための数値（13種類のビタミンすべて）と、過剰摂取による健康障害を防止するための数値（6種類のビタミンのみ）を定めました。

ビタミンの必要量、すなわち欠乏を予防するための量は、1日当たり数μgから数mg程度です。たんぱく質が50g程度、脂質が50g程度、糖質が300g程度と比較すると、本当に少ない量です。そのために、視覚的にも感覚的にも、どのビタミンをどの程度摂っているのかわかりません。

それでは、何を指標にして毎日の食事に気をつかったらよいのでしょうか。理想的なことをいえば、定期的な血液中と尿中のビタミン量を測定してもらうことです。表1にビタミンの栄養状態の指標と必要量の概数をまとめ

新しい日本人の食事摂取基準 ～何を、どのくらい、どう食べる？

表1：ビタミンの栄養状態の指標と成人の必要量の概数

	ビタミン	栄養状態の指標	成人の必要量の概数
水溶性 ビタミン	ビタミンB1	尿中に排泄されるビタミンB1量	1.5 mg/日
	ビタミンB2	尿中に排泄されるビタミンB2量	1.7 mg/日
	ナイアシン	尿中に排泄されるナイアシン異化代謝産物 (MNA, 2-Py, 4-Py)の排泄量	16mgNE/日
	ビタミンB6	尿中に排泄されるビタミンB6異化代謝産物 (4-ピリドキシン酸)	1.5mg/日
	葉酸	尿中に排泄される葉酸量	0.24mg/日
	ビタミンB12	血清ビタミンB12濃度	0.0024mg/日
	パントテン酸	尿中に排泄されるパントテン酸量	7mg/日
	ビオチン	尿中に排泄されるビオチン量	0.045mg/日
	ビタミンC	尿中に排泄されるビタミンC量	100mg/日
脂溶性 ビタミン	ビタミンA	適当な指標なし	0.75mgRE/日
	ビタミンD	血清25-ヒドロキシビタミンD濃度	0.005mg/日
	ビタミンE	血清α-トコフェロール濃度	10mg/日
	ビタミンK	血清フィロキノン濃度と血清非カルボキシル化プロト ロンビン濃度	0.08mg/日

NE = ナイアシン当量
RE = レチノール当量

表2：ビタミンの主要な給源

	ビタミン	給源
水溶性 ビタミン	ビタミンB1	豚肉、さば、さけ、うなぎ、枝豆
	ビタミンB2	さば、うなぎ、さんま、納豆、牛乳、卵、ヨーグルト
	ナイアシン	さんま、かつお、さば、ささみ、豚肉、牛肉、落花生
	ビタミンB6	さんま、かつお、さば、ささみ、バナナ、フライドポテト
	葉酸	納豆、パン、キャベツ、ほうれん草、枝豆、イチゴ、のり、アスパラガス
	ビタミンB12	さんま、さば、かつお、ささみ、卵、のり、牛乳
	パントテン酸	さんま、うなぎ、さば、かつお
	ビオチン	納豆、落花生、カリフラワー、しいたけ、さけ、ししゃも、卵
	ビタミンC	キャベツ、ピーマン、ほうれん草、ジャガイモ、イチゴ、オレンジ
脂溶性 ビタミン	ビタミンA	うなぎ、にんじん、ほうれん草、かぼちゃ
	ビタミンD	さけ、さば、さんま
	ビタミンE	かぼちゃ、植物油
	ビタミンK	納豆、ほうれん草

表2に13種類のビタミンの主要な給源をまとめました。これらを食べる習慣があれば、まず欠乏に陥る危険性は低いと思われれます。一般的にいえば、サケ、サバ、サンマ、ウナギなどの魚、牛、豚、鶏肉、卵、納豆などのまると大豆食品、エダマメ、ホウレンソウ、キャベツ、シイタケ、植物油、牛乳・ヨーグルトなどの乳製品、イチゴ・オレンジなどの果実類を食べる習慣があれば、まずビタミン欠乏となる危険性は低いと思えます。

ました。一般的に水溶性ビタミンは尿、脂溶性ビタミンは血清が良い指標となります。しかし、これらの指標を調べるには、ビタミンの研究をしている専

門家に血液や尿を送り、分析してもらう必要があります。では、どうしたら必要量が摂れているのか否かを推測したらよいのでしよ

うか。13種類のビタミンの主要な給源を覚えるしかありません。

何を食えばよいのか

新しい食事摂取基準「日本人の食事摂取基準(2005年版)」が策定された

2005年4月1日にきわめて大きな改革が執行された。「栄養所要量」という言葉が消えたのである。代わりに、「食事摂取基準」という言葉が出現した。これは、「栄養素の必要量はひとによって異なる」、「真の必要量は測定困難または不可能である」、「下の値だけでなく、上の値も必要」、という考え方にに基づき、現実(不確実性)に対応させたもので、疫学的考え方、すなわち確率論を導入し、目的に対応した基準(複数の値)を策定したからである。

「食事摂取基準(栄養所要量)」は、最新の科学的知見、国際的動向への対応を図るとともに、人口構造の変化、生活環境の変化、食生活の変化、疾病構造の変化等に対応し得るよう、5年ごとに改定されてきたものであり、今回の「日本人の食事摂取基準(2005年版)」は2005年(平成17年)4月1日から2010年(平成22年)3月31日までの5年間、使用されるものである。

ビタミン学会は幅広い学問領域の方の集まりであるので、栄養学系出身以外のビタミン学会の会員の多くの方は、「栄養所要量」という言葉にあまりなじみがないのではと思う。しかし、栄養士の世界では、きわめて重要な言葉であった。「あった」というのは、上述のように、2005年(平成17年)4月1日から「栄養所要量」という言葉が消えたからである。

「食事摂取基準」の策定の目的は、健康な個人または集団を対象として、国民の健康の保持・増進、生活習慣病の予防を目的とし、エネルギーおよび各栄養素の摂取量の基準を示すものである。栄養素の摂取不足によって招来する栄養欠乏症の予防に留まらず、生活習慣病を積極的に予防することも目的としている。その用途は、①国および地域における栄養計画の策定、②栄養指導、③給食基準、④食品の栄養表示基準などである。摂取源として考慮するものは、食事として経口摂取されるものに含まれるエネルギーと栄養素である。したがって、サプリメントも含む。

さて、現在のスタイルの栄養素必要量の提示方法となつて、今回の改定が、第七回目となる。したがって、「第七次改定 日本人の栄養所要量」というタイトルと予想していた人が、栄養士関連の方ではほとんどであったと思うが、

第六次改定で未整理となっていた「食事摂取基準」という概念の周知徹底を行うために、長年使用されていた「栄養所要量」という言葉を削除した。それに伴い、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」というタイトルとなった。なお、第六次改定の正式な名前は「第六次改定 日本人の栄養所要量-食事摂取基準-」であり、すでに、食事摂取基準の概念は提示されていた。しかしながら、食事摂取基準を表す複数の指標(平均必要量、栄養所要量[平均必要量が算定される場合]、許容上限摂取量)が、過去のしがらみを引きずり、中途半端であった。今回の改定では、食事摂取量の概念は第六次とほとんど変わっていないが、より食事摂取基準の概念を理解しやすくするために、表1に示すように、各指標の名称を改定した。ちなみに、英語名の表記は第六次改定と今回の改定は全く同じである。ただ一つだけ、今回は、新しい指標を追加した。それが、目標量である。しかし、この目標量が色々あってややこしい。目標量を、「生活習慣病予防のために設定された」とだけ覚えておくと、栄養指導をおこなう時に、混乱を生じる。たとえば、ある栄養素の「目安量」を現実的に実行することは難しいので、摂取量を目安量に近づけるために設定した「目標量」や、上限量を策定することができなかったが、上限量に近い数値を策定することが必要であるため、上限量に近い意味で、目標量の上限量として設定した「目標量」などがある。ややこしいので、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」の市販本をしっかりと読んで、いろいろな目標量があることを、是非理解していただきたい。

エネルギーは、上記の栄養素の食事摂取基準の概念を適用することはできないので、推定エネルギー必要量(estimated energy requirement = EER)を採用した。これは、エネルギーの不足のリスクおよび過剰のリスクの両者が最も小さくなる摂取量を推定した数値のことである。

以下、ビタミンの摂取基準についてのみ紹介する。今回、策定したビタミンは13種類すべてのビタミンである。この数は前回と同じである。第六次改定時と比較して、主要な変更箇所を表2にまとめた。以下に変更点を

表1. 第六次改定と今回の改定における食事摂取基準の複数の名称の改定～一覧表～

第六次改定の食事摂取基準の各指標	今回の改定の食事摂取基準の各指標
平均必要量 (estimated average requirement = EAR)	推定平均必要量 (estimated average requirement = EAR)
栄養所要量[平均必要量が算定される場合] (recommended dietary allowance = RDA)	推奨量 (recommended dietary allowance = RDA)
栄養所要量[平均必要量が算定されない場合] (adequate intake = AI)	目安量 (adequate intake = AI)
許容上限摂取量 (tolerable upper intake level = UL)	上限量 (tolerable upper intake level = UL)
該当なし	目標量 (tentative dietary goal for preventing life-style related diseases = DG)

表 2. 今回の改定による主要な変更箇所～ビタミン～.

ビタミン名	変更点
ビタミン B ₁	五訂日本食品成分表の記載とあわせ、ビタミン B ₁ 塩酸塩相当量として策定した。
ナイアシン	上限量が高くなった。ニコチンアミドも策定した、 ナイアシン当量の計算方法の簡便法を記載した。
ビタミン A	プロビタミン A の活性効率の再検討を行った。
ビタミン D	大幅な再検討を行った。
ビタミン E	活性化化合物の再検討を行った。
ビタミン K	上限量の策定を見送った。

概説する。

●化合物の名前を明確化

ビタミン名の食事摂取基準の数値は、基本的に、「五訂日本食品標準成分表」の記載にあわせた。

たとえば、五訂日本食品標準成分表のビタミン B₁ の値はチアミン塩酸塩(分子量=337.3)量として記載されている。第六次改定ではチアミン量(分子量=265.3)として策定されていたが、明確に記載されていなかった。そのため、多くの栄養士の方は成分表の値と第六次の所要量の値を直接比較していた。第六次改定の所要量に $337.3/265.3=1.27$ をかけたものが、チアミン塩酸塩の所要量であった。今回の改定では、ビタミン B₁ 塩酸塩の量として策定しているので、成分表と直接比較できるようになった。

●ナイアシンの上限量

第六次改定ではニコチン酸の単回投与の上限値がフラッシングを健康障害の指標として、30 mg と策定されていたが、今回の改定では、指標を消化器系への障害を指標に変更して再検討を行った結果、数値が高くなった。さらに、今回はニコチンアミドの上限値も策定した。

●ナイアシン当量

ナイアシン当量を計算するとき、摂取したトリプトファン量がわからないと、ナイアシン当量を計算できなかった。簡便法として、ナイアシン当量(mg)=食品成分表のナイアシン(mg)+食品成分表のタンパク質(但し mg に換算すること)/6000 と記載した。

●ビタミン A

レチノール当量の求め方が変わった。β-カロテンのビタミン A としての活性効率が第六次改定時の 1/2 となった。食品からの吸収率を再検討すると、日本人では β-カロテンの吸収率の高い食品(40% の吸収率)の摂取頻度は約 10%、一方、β-カロテンの吸収率の低い食品(10% の吸収率)の摂取頻度は約 90% であった。したがって、日本人の通常の食事由来の β-カロテンの吸収率は、

$0.40 \times 0.10 + 0.10 \times 0.90 = 0.0166 \approx 1/6$ と見積もった。この数値は前回の 1/2 である。つまり、レチノール当量への換算は、

$$1 \mu\text{gRE}$$

$$=1 \mu\text{g レチノール}$$

$$=12 \mu\text{g } \beta\text{-カロテン (従来: } 6 \mu\text{g } \beta\text{-カロテン)}$$

$$=24 \mu\text{g } \alpha\text{-カロテン (従来: } 12 \mu\text{g } \beta\text{-カロテン)}$$

$$=24 \mu\text{g クリプトキサンチン(従来: } 12 \mu\text{g } \beta\text{-カロテン)}$$

となる。

●ビタミン D

乳児

適度な日照を受ける環境にある乳児とない乳児にわけ、母乳中のビタミン D 含量の値を重要視して策定した。その結果、0～5 か月児では、前回の 1/4(日照を受ける環境にある乳児)となった。6～11 か月児も 0～5 か月児の値を外挿したので、前回の 1/2 となった。

小児(1～5 歳)

平成 13 年度国民栄養調査結果の中央値中央値を採用した結果、前回の 1/3 となった。

成人

血中副甲状腺ホルモン濃度を正常に保つのに必要な 25-OH-D 濃度を維持できるビタミン D 摂取量から求めた。その結果、成人では前回の倍の数値となった。

●ビタミン E

ビタミン E 同族体(α-, β-, γ-, δ-トコフェロール)のうち、α-トコフェロール量のみをビタミン E とした。体内には、α-トコフェロールが優先的に取り込まれるためである。

●ビタミン K の上限値の策定をしなかった理由

第六次改定では上限量が策定されていたが、再検討の結果、健康障害非発現量を設定するに足る十分なデータが見あたらなかったので見送った。

なお、今回の「日本人の食事摂取基準(2005 年版)」の策定に伴い、科学技術庁資源調査会報告第 124 号、平成 12 年 11 月 22 日 日本食品標準成分表の改訂に関する調査報告-五訂日本食品標準成分表-、いわゆる「五訂 日本食品標準成分表」に記載されているビタミン A とビタミン E の数値が利用できなくなったので、「食事摂取基準」との整合性を確保するために、平成 17 年 1 月 24 日に文部科学省科学技術・学術審議会資源調査会分科会報告書として、「五訂増補日本食品標準成分表」が出された。

(¹ 滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻

² 神戸薬科大学薬学部衛生化学研究室

柴田 克己¹、岡野登志夫²)



Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for γ -carboxylation of osteocalcin¹⁻³

Naoko Tsugawa, Masataka Shiraki, Yoshitomo Suhara, Maya Kamao, Kiyoshi Tanaka, and Toshio Okano

ABSTRACT

Background: Vitamin K deficiency is associated with low bone mineral density and increased risk of bone fracture. Phylloquinone (K_1) and menaquinone 4 (MK-4) and 7 (MK-7) are generally observed in human plasma; however, data are limited on their circulating concentrations and their associations with bone metabolism or with γ -carboxylation of the osteocalcin molecule.

Objectives: The objectives were to measure the circulating concentrations of K_1 , MK-4, and MK-7 in women and to ascertain whether each form of vitamin K is significantly associated with bone metabolism.

Design: Plasma concentrations of K_1 , MK-4, MK-7, undercarboxylated osteocalcin (ucOC; measured by using the new electrochemiluminescence immunoassay), intact osteocalcin (iOC), calcium, and phosphorus; bone-derived alkaline phosphatase activity; and concentrations of urinary creatinine, *N*-terminal telopeptide, and deoxypyridinoline were measured in healthy women ($n = 396$).

Results: On average, MK-7 and MK-4 were the highest and lowest, respectively, of the 3 vitamers in all age groups. K_1 and MK-7 correlated inversely with ucOC, but associations between nutritional basal concentration of MK-4 and ucOC were not observed. Multiple regression analysis indicated that not only K_1 and MK-7 concentrations but also age were independently correlated with ucOC concentration and the ratio of ucOC to iOC. The plasma K_1 or MK-7 concentration required to minimize the ucOC concentration was highest in the group aged ≥ 70 y, and it decreased progressively for each of the younger age groups.

Conclusions: The definite role of ucOC remains unclear. However, if submaximal γ -carboxylation is related to the prevention of fracture or bone mineral loss, circulating vitamin K concentrations in elderly people should be kept higher than those in young people. *Am J Clin Nutr* 2006;83:380-6.

KEY WORDS Phylloquinone, menaquinone 4, menaquinone 7, vitamin K, plasma concentrations, osteocalcin, bone turnover makers, healthy elderly women

INTRODUCTION

Vitamin K is a cofactor for the enzyme responsible for the conversion of specific glutamyl residues to γ -carboxyglutamyl residues in a limited number of blood coagulation factors (1) and bone-related proteins (2, 3). Vitamin K is thought to maintain bone strength via the γ -carboxylation of osteocalcin (4) and to suppress arterial calcification via γ -carboxylation of matrix glutamic acid residues of protein (5). In vitamin K insufficiency or

deficiency, a small amount of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) is released from the osteoblast into the circulation. Thus, the serum concentration of ucOC has been considered a sensitive marker of vitamin K status in bone (6, 7). High concentrations of circulating ucOC have been associated with low bone mineral density (8, 9) and a greater risk of hip fracture evening those subjects without any abnormalities in the blood coagulation system (10, 11).

Vitamin K naturally exists in 2 forms, namely phylloquinone (K_1) and a group called vitamin K_2 , also called menaquinones. K_1 is widely distributed in green and leafy vegetables, whereas menaquinones exist preferentially in meats [menaquinone (MK)-4], eggs (MK-4), curd (MK-7), cheese (MK-7), and fermented soybeans (MK-7). The predominant dietary and circulating form of vitamin K for people in the United States, Europe, and most other parts of the world is K_1 (12, 13). However, the other major component of dietary vitamin K for the Japanese, especially those living in eastern Japan, is MK-7, which is mainly derived from soybeans fermented by *Bacillus natto* (referred to as natto). The small amount of available data on circulating vitamin K concentrations of healthy women has limited precise examination of the relation between vitamin K status and bone health. In the current study, using our new liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass-spectrometry (LC-APCI-MS/MS) method for the measurement of K_1 , MK-4, and MK-7, we investigated the relations between the plasma concentrations of K_1 , MK-4, or MK-7, as biochemical measures of vitamin K status, and bone turnover markers, including ucOC, in women stratified by age. As far as we know, there are no previous studies including the precise

¹ From the Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan (NT, YS, MK, and TO); the Research Institute and Practice for Involuntal Diseases, Nagano, Japan (MS); and the Department of Nutrition, Kyoto Women's University, Kyoto, Japan (KT).

² Supported by a Grant-in-Aid from the Japan Osteoporosis Foundation: Grant-in-Aid no. 15590083 from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan; a Grant-in-Aid for Comprehensive Research on Cardiovascular Diseases and the Research on the Dietary Reference Intakes in Japanese from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; and the Second Project of Advanced Research and High Technology of Kobe Pharmaceutical University.

³ Address reprint requests and correspondence to T Okano, Department of Hygiene Sciences, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan. E-mail: t-okano@kobepharm-u.ac.jp.

Received May 9, 2005.

Accepted for publication November 8, 2005.

measurement of plasma MK concentrations and the detailed analyses of their associations with bone turnover markers and the status of γ -carboxylation of the osteocalcin molecule in premenopausal or postmenopausal healthy women. The objectives of the current study were to examine the associations between the biochemical measures of vitamin K status and bone metabolic markers in healthy Japanese women and to evaluate age-related differences in the requirement for vitamin K in bone in terms of the γ -carboxylation of osteocalcin.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Women aged 30–88 y were recruited from the rural area of Nagano prefecture, Japan, where most people frequently eat natto. Women with a metabolic bone disease other than primary osteoporosis and women who were taking medicine related to bone metabolism—eg, active vitamin D, vitamin K, a vitamin K antagonist, estrogen, bisphosphonate, and steroids—were excluded. A total of 396 women with a $\bar{x} \pm$ SD age of 63.0 ± 10.9 y met the inclusion criteria for this study. The subjects were stratified into 3 groups by age: 30–49, 50–69, and ≥ 70 y old. All of the subjects in the group aged 30–49 y were premenopausal, and all of the subjects in the other 2 groups were postmenopausal.

Measurements

After a 12-h overnight fast, plasma and urine samples were collected from the patients in the morning and stored immediately at -30°C until measurement. The urine sample was a second morning void per kit instructions. Plasma K_1 , MK-4, and MK-7 concentrations were measured by using an LC-APCI-MS/MS method (14). Plasma ucOC, as a sensitive marker of vitamin K deficiency or insufficiency, was measured with the new electrochemiluminescence immunoassay (Sanko Junyaku Co Ltd, Ibaragi, Japan). The specific antibody to ucOC was purchased from Takara Shuzo Co Ltd (Kyoto, Japan). In brief, the measurement is conducted as follows: after the ucOC in the sample is bound to anti-human ucOC prepared on the solid phase by using magnetic beads, antiosteocalcin labeled with a ruthenium complex emitting luminescence in response to an electrochemical change is bound, and then electricity is applied onto the electrode. The ruthenium complex emits luminescence according to the amount of the ruthenium-labeled antibody that is bound. We measured iOC with an immunoradiometric assay (Mitsubishi Kagaku BioClinical Laboratories Inc, Tokyo, Japan). We measured bone resorption markers, urinary excretion of *N*-telopeptide [(NTx) as measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay (Osteomark; Ostex International, Seattle, WA), total deoxypyridinoline (DPD); as measured by HPLC after hydrolysis of the urine sample; Teijin Bio-Lab, Tokyo, Japan), and a bone formation marker, bone-derived alkaline phosphatase [(BAP) measured by using an enzyme immunoassay and a microplate (Sumitomo Seiyaku Biomedical Co Ltd, Osaka, Japan). For the evaluation of calcium metabolism, the serum concentrations of calcium, phosphorus, and the ratio of urinary calcium to creatinine were measured. Height and weight were measured, and body mass index (BMI) was calculated as the weight (in kg) divided by the height (in m^2).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed by using JMP statistical software (version 5.0.1 J; SAS Institute Inc, Cary, NC). For cross-sectional analyses, simple regression analysis was performed to assess the associations between plasma K_1 , MK-4, or MK-7 and ucOC, the ratio of ucOC to intact osteocalcin (ucOC:iOC), or plasma or urinary bone metabolic variables. Pearson's correlation coefficient (*r*) and the corresponding *P* values were used to evaluate the relation of plasma vitamin K concentrations to each variable. In secondary analyses, multiple linear regression analyses were performed to explore determinants of ucOC, ucOC:iOC, and DPD, which simple regression analysis showed to be significantly related to vitamin K concentration.

To evaluate the age-related difference in the amount of vitamin K required to minimize ucOC:iOC, nonlinear logarithmic regression analysis was performed by using the plasma K_1 or MK-7 concentration as an independent variable and ucOC:iOC as a dependent variable after subjects were classified into the 3 age groups. Significant differences in intercepts and slopes of regression curves between the 3 age groups were evaluated by analysis of covariance.

Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol was approved by the ethic committee of the Research Institute and Practice for Involuntal Diseases.

RESULTS

Subjects

The characteristics of the study samples are shown in Table 1. Weight and height were negatively correlated with age, whereas BMI and plasma triacylglycerol and total cholesterol concentrations did not significantly differ between the 3 age groups. Bone turnover markers, including ucOC and BAP activity in the serum and NTx and DPD in the urine, were significantly correlated with age, whereas the plasma iOC concentration was not. Moreover, MK-7 was the major contributor to plasma vitamin K concentration in this Japanese population, unlike in Americans and Europeans. Plasma concentrations of K_1 and MK-7 were highest in the group aged 50–69 y and lowest in the group aged ≥ 70 y. Plasma concentrations of MK-4 did not significantly differ between the 3 age groups. Plasma concentrations of MK-7 were ≈ 3 –4 times higher than those of K_1 in any of the age groups. Plasma phosphorus concentrations differed significantly between the 3 age groups, although the actual differences were small and within the normal laboratory range and did not appear to be of practical importance.

Distribution of plasma concentrations of phylloquinone and menaquinones 4 and 7

As shown in Figure 1, K_1 was detected in all subjects at a range of 0.13 to 8.83 ng/mL, and the mean (\pm SD) and median values in the groups aged 30–49, 50–69, and ≥ 70 y were 1.52 ± 1.02 and 1.16 ng/mL, 1.74 ± 1.29 and 1.31 ng/mL, and 1.29 ± 1.09 and 0.94 ng/mL, respectively. MK-4 was detected in 56.8% of the subjects, and the mean and median values were 0.07 ± 0.14 and 0.01 ng/mL, 0.10 ± 0.19 and 0.03 ng/mL, and 0.09 ± 0.15 and 0.02 ng/mL, respectively. MK-7 was detected in 97.8% of the subjects, and the mean and median values were 4.96 ± 6.93 and 2.65 ng/mL, 8.42 ± 11.44 and 3.92 ng/mL, and 4.21 ± 6.81 and 2.14 ng/mL, respectively. Similar distribution patterns for



Table 1
Subject characteristics¹

	Age group			P
	30–49 y (n = 52)	50–69 y (n = 208)	≥70 y (n = 136)	
Age (y)	45.4 ± 4.3	59.6 ± 5.3	74.9 ± 4.1	<0.001
Time since menopause (y)	0.0 ± 0.0	9.9 ± 6.2	25.2 ± 5.1	<0.001
Body weight (g)	55.3 ± 8.4	53.2 ± 7.5	48.7 ± 7.5	<0.001
Body height (cm)	155.7 ± 5.4	152.8 ± 5.3	148.0 ± 5.5	<0.001
BMI (kg/m ²)	22.8 ± 3.1	22.8 ± 3.0	22.2 ± 3.0	0.170
Triacylglycerol (mg/dL)	134.0 ± 95.1	138.3 ± 77.4	132.8 ± 62.6	0.793
Total cholesterol (mg/dL)	192.1 ± 39.7	202.4 ± 31.2	199.1 ± 31.8	0.126
K ₁ (ng/mL)	1.52 ± 1.02	1.74 ± 1.29	1.29 ± 1.09	0.002
MK-4 (ng/mL)	0.07 ± 0.14	0.10 ± 0.19	0.09 ± 0.15	0.563
MK-7 (ng/mL)	4.96 ± 6.93	8.42 ± 11.44	4.21 ± 6.81	<0.001
ucOC (ng/mL)	3.59 ± 2.17	4.39 ± 2.79	5.51 ± 3.82	<0.001
iOC (ng/mL)	6.91 ± 3.02	9.11 ± 8.92	8.82 ± 4.30	0.149
ucOC:iOC	0.54 ± 0.28	0.55 ± 0.35	0.73 ± 0.68	0.003
Calcium (mg/dL)	9.18 ± 0.39	9.21 ± 0.37	9.22 ± 0.45	0.820
Phosphorus (mg/dL)	3.38 ± 0.47	3.53 ± 0.47	3.41 ± 0.46	0.025
BAP (U/L)	25.69 ± 9.85	32.81 ± 11.56	32.28 ± 12.30	<0.001
NTx (pmol BCE/μmol creatinine)	45.16 ± 18.94	57.49 ± 31.15	63.95 ± 27.81	<0.001
DPD (nmol/mmol creatinine)	5.50 ± 1.86	5.97 ± 2.49	7.39 ± 3.15	<0.001

¹ All values are $\bar{x} \pm SD$. K₁, phyloquinone; MK, menaquinone; ucOC, undercarboxylated osteocalcin; iOC, intact osteocalcin; BAP, bone-derived alkaline phosphatase; NTx, N-terminal telopeptide; BCE, bone collagen equivalents; DPD, deoxypyridinoline. Parametric comparisons used ANOVA. All women in the group aged 30–49 y were premenopausal, and all women in the other 2 groups were postmenopausal.

each plasma concentration of K₁, MK-4, and MK-7 were observed in the 3 age groups.

Plasma concentrations of phyloquinone and menaquinone 4 or 7 and anthropometric, nutritional, or calcium metabolic variables

As shown in Table 2, plasma concentrations of K₁ correlated significantly and positively with BMI and cholesterol, triacylglycerol, MK-4, and MK-7 concentrations and correlated negatively with age, ucOC:iOC, and ucOC and urinary DPD concentrations. In contrast, plasma MK-7 concentrations also significantly correlated negatively with age, ucOC concentrations, and ucOC:iOC but not with urinary DPD concentrations. No correlations were observed between plasma concentrations of MK-4 and ucOC, ucOC:iOC, or concentrations of NTx, DPD, or BAP.

Plasma concentrations of phyloquinone or menaquinone 7 and plasma concentrations of undercarboxylated osteocalcin or the ratio of undercarboxylated osteocalcin to intact osteocalcin

Stepwise multiple linear regression analyses were performed to explore determinants of ucOC, ucOC:iOC, and urinary DPD. Plausible predictors (ie, age, BMI, cholesterol, triacylglycerol, K₁, MK-4, and MK-7) were included in the original model. Forward stepwise regression was performed, and a *P* value > 0.25 was used to exclude some of the predictors that had been in the original model. As a result, not only K₁ and MK-7 concentrations but also age correlated independently with ucOC concentrations and ucOC:iOC (Table 3). In contrast, only age and K₁ concentrations correlated independently with urinary DPD concentrations.

The age-related differences in the regression curves obtained from nonlinear logarithmic regression analysis with the use of plasma K₁ or MK-7 concentrations as an independent variable and ucOC:iOC as a dependent variable are shown in Figure 2. In the relation between plasma K₁ concentrations and ucOC:iOC, it was confirmed that the intercepts in the 3 age groups differed significantly (*P* < 0.001). In contrast, in the relation between plasma MK-7 concentrations and ucOC:iOC, significant differences were observed between the intercepts (*P* < 0.001) and slopes (*P* < 0.022) in the 3 age groups. In both analyses, with the use of the plasma K₁ and MK-7 concentrations, values of the intercept and slope of the curves were highest in the group aged ≥70 y and decrease progressively in the 2 younger age groups. An age-related difference clearly observed at a low vitamin K concentration. When the groups aged 50–69 and ≥70 y were compared, the vitamin K concentrations that had reached a plateau in the former group was significantly lower than that in the latter group.

DISCUSSION

Several reports on the circulating concentrations of vitamin K in Japanese women have been published. Kawana et al (15) reported circulating concentrations of K₁, MK-4, and MK-7 in healthy elderly women and women with vertebral fracture or hip fracture. In their study, a large proportion of the subjects had undetectable concentrations of K₁ (35% and 38% of healthy control subjects and patients with fractures, respectively) and MK-7 (52% and 24% of healthy control subjects and patients with fractures, respectively). Kaneki et al (16) reported that the concentrations of K₁, MK-4, and MK-7 were undetectable in 0%, 90%, and 24%, respectively, of 49 postmenopausal women in Japan. In another study, the concentrations of K₁ and MK-7 were



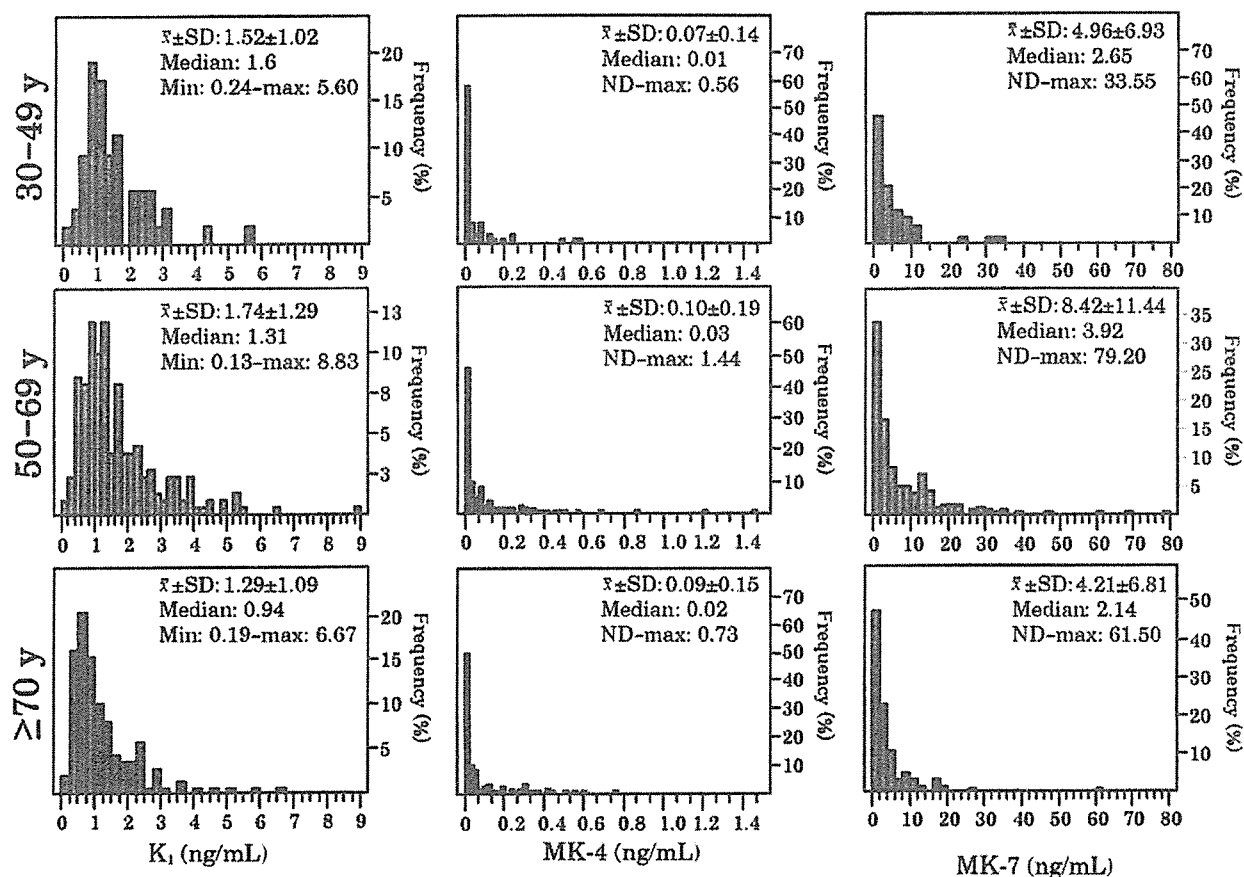


FIGURE 1. Distribution of plasma phyloquinone (K₁) and menaquinone (MK) 4 and MK-7 concentrations in 3 age groups. K₁ was detected in all subjects. MK-4 and MK-7 were detected in 56.8% and 97.8% of subjects, respectively. Min, minimum; max, maximum; ND, not detected. *n* = 52, 208, and 136 in the groups aged 30-49, 50-69, and ≥70 y, respectively.

undetectable in < 5% and 15%, respectively, of groups of European whites (13) and Japanese (16, 17). The existence of large interlaboratory differences in the measurement of MK-4 and

MK-7 has been suggested (15). Therefore, we recently established a precise and sensitive method for simultaneously measuring plasma K₁, MK-4, and MK-7 by using the LC-APCI-

Table 2
Relation between plasma vitamin K concentrations and bone metabolism variables¹

	K ₁		MK-4		MK-7	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Age	-0.146	0.004	-0.006	0.916	-0.125	0.013
BMI	0.147	0.004	0.093	0.092	0.086	0.087
Cholesterol	0.122	0.016	-0.017	0.759	0.156	0.002
Triacylglycerol	0.342	<0.001	0.047	0.398	0.062	0.221
K ₁	—	—	—	—	—	—
MK-4	0.153	0.005	—	—	—	—
MK-7	0.173	0.001	0.009	0.875	—	—
ucOC	-0.216	<0.001	0.020	0.720	-0.227	<0.001
ucOC:iOC	-0.203	0.001	-0.005	0.927	-0.181	0.001
NTx	-0.071	0.189	-0.066	0.249	-0.015	0.781
DPD	-0.223	<0.001	-0.065	0.254	-0.091	0.101
BAP	0.013	0.815	0.001	0.988	0.004	0.937

¹ K₁, phyloquinone; MK, menaquinone; ucOC, undercarboxylated osteocalcin; iOC, intact osteocalcin; NTx, N-terminal telopeptide; DPD, deoxypyridinoline; BAP, bone-derived alkaline phosphatase. Pearson's correlation coefficient (*r*) and the corresponding *P* values were used to evaluate the relation of the plasma vitamin K concentration with each variable.

Table 3Relation between undercarboxylated osteocalcin (ucOC), the ratio of ucOC to intact osteocalcin (iOC), or deoxypyridinoline (DPD) and age¹

	ucOC		ucOC:iOC		DPD	
	r ²	P	r ²	P	r ²	P
Age	0.054	<0.001	0.030	0.008	0.095	<0.001
K ₁	0.047	0.001	0.041	0.002	0.050	<0.001
MK-7	0.052	<0.001	0.033	0.009		NR

¹ K₁, phylloquinone; MK, menaquinone; NR, no relation. Stepwise multiple linear regression analyses were performed to explore determinants of ucOC, ucOC:iOC, or DPD. Plausible predictors [age, BMI, cholesterol, triacylglycerol, K₁, MK-4, and MK-7] were included in the original model. Forward stepwise regression was performed, and $P > 0.25$ was used for variable removal.

MS/MS technique (14). With this method, we detected K₁ in the plasma of all subjects who participated in this study, and the proportion of subjects with undetectable concentrations of MK-4 and MK-7 was 47.8% and 1.9%, 42.0% and 2.3%, 45.3% and 2.3%, respectively, in the groups aged 30–49, 50–69, and ≥ 70 y, respectively. Thus, we believe the current system of assay for serum vitamin K has achieved a significant improvement in terms of the minimum detectable sensitivity.

The mean plasma K₁ concentrations of the groups aged 30–49, 50–69, and ≥ 70 y were 1.52, 1.75, and 1.29 ng/mL, respectively, which were almost the same as or slightly higher than those of previous reports (13, 18). As we expected, the plasma MK-4 concentration was below the limit of detection in nearly half of the women, and the concentrations were extremely low. There were no significant differences between the plasma concentrations of MK-4 and ucOC or the plasma ucOC:iOC in any of the age groups. This lack of difference does not indicate the failure of MK-4 to reduce the concentration of plasma ucOC. In fact, pharmacologic doses of MK-4 significantly decreased the serum ucOC concentration (19). It has been suggested that K₁ is converted in part into MK-4 in various tissues of animals after K₁ ingestion, and thus the plasma concentrations of K₁ may reflect the plasma MK-4 concentrations (20). In our study, however, no

correlation was observed between the plasma concentrations of K₁ and MK-4 in any of the age groups. Differences in the circulating concentrations of MK-7 maybe attributable to differences in eating habits, especially in the intake of fermented soybean (natto). Kaneki et al (16) reported that the average plasma MK-7 concentrations in Japanese women in Tokyo were higher than those in Japanese women in Hiroshima (Tokyo: 5.26 ng/mL; Hiroshima: 1.22 ng/mL) because natto is eaten frequently in Tokyo but seldom in Hiroshima. The customary natto intake in the population in the current study is almost same as that in the Tokyo area. When the plasma K₁ and MK-7 concentrations in the 3 age groups were compared, both K₁ and MK-7 were highest in the group aged 50–69 y. Triacylglycerol-rich lipoproteins are known to serve as carriers of K₁ in the circulation (21). Consistent with the previous reports (22), we found a significant positive correlation between the plasma concentrations of K₁ or MK-7 and the plasma triacylglycerol concentrations. In this regard, the subjects aged 50–69 y seemed to have a higher vitamin K status, as well as a faster lipoprotein metabolism, than did the other 2 age groups.

Plasma K₁ concentrations correlated negatively and independently with urinary DPD concentrations. It was reported that 15 d of dietary vitamin K depletion led to increased bone

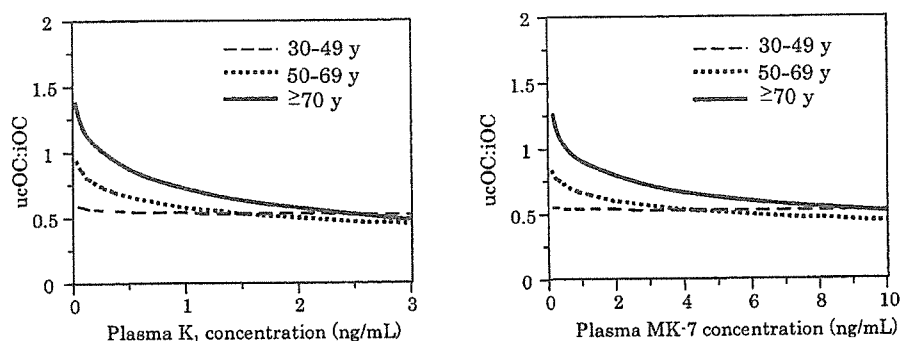


FIGURE 2. Association between the plasma phylloquinone (K₁) or menaquinone (MK) 7 concentration and the ratio of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) to intact osteocalcin (iOC) in 3 age groups. Regression curves and P values were obtained from nonlinear logarithmic regression analysis by using the plasma K₁ or MK-7 concentrations and ucOC:iOC. $n = 52, 208,$ and 136 in the groups aged 30–49, 50–69, and ≥ 70 y, respectively. The equations of regression curves using the plasma K₁ concentration and ucOC:iOC were $y = 0.546 - 0.015 \log x$ ($P = 0.8151$) for the group aged 30–49 y, $y = 0.589 - 0.117 \log x$ ($P = 0.0020$) for the group aged 50–69 y, and $y = 0.748 - 0.224 \log x$ ($P = 0.0101$) for the group aged ≥ 70 y, where $y =$ mean ucOC:iOC, and $x =$ mean plasma concentration of K₁ or MK-7. Intercepts of the 3 age groups were significantly different ($P < 0.001$, analysis of covariance). The equations of regression curves that used the plasma MK-7 concentrations and ucOC:iOC were $y = 0.550 - 0.006 \log x$ ($P = 0.8401$) for the group aged 30–49 y, $y = 0.677 - 0.094 \log x$ ($P < 0.0001$) for the group aged 50–69 y, and $y = 0.870 - 0.172 \log x$ ($P = 0.0005$) for the group aged ≥ 70 y, where $y =$ mean ucOC:iOC, and $x =$ mean plasma concentration of K₁ or MK-7. Significant differences were detected in intercepts ($P < 0.001$, analysis of covariance) and slopes ($P < 0.022$, analysis of covariance) of the 3 age groups.



turnover, as measured by the serum osteocalcin and urinary NTx concentrations; these markers were subsequently normalized by K_1 repletion for 10 d (200 $\mu\text{g}/\text{d}$) (23). In other studies, these bone turnover markers either were not significantly changed (7, 18) or were increased (24, 25) by K_1 supplementation. In our study, plasma K_1 concentrations correlated significantly only with urinary DPD concentrations, not with urinary NTx and plasma BAP concentrations, which suggested that vitamin K may be a weak regulatory factor for bone turnover in women.

In this cross-sectional observational study of healthy Japanese women, we observed a significant negative correlation between the plasma concentrations of K_1 or MK-7 and the plasma ucOC concentration or ucOC:iOC in the subjects aged > 50 y; however, these correlations were not observed in the subjects aged 30–49 y. It is conceivable that the plasma concentrations of vitamin K required for γ -carboxylation of osteocalcin in younger subjects may be lower than those required in older subjects, and, thus, even at a concentration below the median, the plasma concentrations of vitamin K in the groups aged 30–49 y may be almost sufficient for the subjects to sustain normal γ -carboxylation of ucOC in the bone. In previous reports (26, 27), the circulating ucOC concentrations in elderly women were higher than those in young women. We also confirmed that the plasma ucOC concentration and ucOC:iOC were highest in the oldest group (Table 1), which suggests an age-related difference in osteocalcin γ -carboxylation efficiency. Figure 2 clearly indicates that requirements for vitamin K increase with age. According to the minimum ucOC:iOC (0.546 for K_1 and 0.550 for MK-7) presumed by the logarithmic regression analysis of the group aged 30–49 y, minimum ucOC:iOC in the groups aged 50–69 and ≥ 70 y would be achieved by the consumption of 1.4 and 2.5 ng K_1/mL , respectively, and of 3.9 and 6.4 ng MK-7/mL, respectively. However, because almost all subjects had both K_1 and MK-7 in their plasma, the effect of K_1 and MK-7 to reduce ucOC:iOC could not be compared. Binkley et al (28) reported that, when 1000 μg K_1/d was supplemented for 1 wk, the K_1 concentrations rose to 2.9 ng/mL, and the ucOC percentage reached a minimum in subjects aged 19–36 y. In other studies, younger or elderly subjects who supplemented their diets with 1000 μg K_1/d for 1 wk had 6.5 or 12 nmol K_1/L (2.9 or 5.4 ng K_1/mL), respectively, at the end of the week, and the ucOC percentage decreased maximally in both age groups (18). The mechanisms of the increase in the vitamin K requirement with aging are not clear. It may be that a decrease in the number of osteoblasts—target cells of vitamin K—or in the enzymatic activity of γ -carboxylase in osteoblasts with aging may be related to the mechanism.

This is the first report showing the difference between the requirements for K_1 and MK-7 to minimize ucOC concentrations in healthy young adult and elderly women. Several reports indicated that the increase in serum ucOC concentrations is a risk factor for fractures (29–32), and a high ucOC concentration correlates with low bone mineral density (33). The precise role of ucOC remains unclear. However, if the subminimum ucOC concentration is related to the prevention of bone fracture or bone mineral loss, circulating vitamin K concentrations in elderly people should probably be kept higher than those in younger people.

We thank Sanko Junyaku Co Ltd for measuring the plasma uncarboxylated osteocalcin concentrations. We also thank Yuri Uchino, Yumiko Inoue, Kimi Ueta, Reo Ozaki, and Seiji Hirokawa for technical assistance.

KT was responsible for and MS and TO contributed to the conception and design of the study; MS was responsible for data collection; NT, YS, and MK were responsible for data analysis; NT was responsible for statistical analysis; NT, MS, YS, MK, and TO contributed to drafting the manuscript; NT and TO were responsible for critical revision of the manuscript for intellectual content and for final approval of the manuscript; MS was responsible for overall supervision of the study; and TO was the principal investigator. None of the authors had any personal or financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Olason RE. The function and metabolism of vitamin K. *Annu Rev Nutr* 1984;4:281–337.
2. Ferland G. The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev* 1998;56:223–30.
3. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 1995;125:1812–21.
4. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448–52.
5. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78–81.
6. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr* 1996;63:566–73.
7. Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaion KI, Sadowski JA. Changes in serum osteocalcin, plasma phyloquinone, and urinary γ -carboxylglutamic acid in response to altered intakes of dietary phyloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1997;65:779–84.
8. Booth SL, Broe KE, Peterson JW, et al. Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4904–9.
9. Booth S, Broe K, Gagnon D, et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003;77:512–6.
10. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999;69:74–9.
11. Booth SL, Tucker KL, Chen H, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1201–8.
12. Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* 1998;128:785–8.
13. Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K, Delmas PD. Circulating levels of vitamins K_1 and K_2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 1993;8:1241–5.
14. 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.
15. Kawana K, Takahashi M, Hoshino H, Kushida K. Circulating levels of vitamin K_1 , menaquinone-4, and menaquinone-7 in healthy elderly Japanese women and patients with vertebral fractures and patients with hip fractures. *Endocr Res* 2001;27:337–43.
16. Kaneki M, Hodges SJ, Hosoi T, et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K_2 : possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 2001;17:315–21.
17. Kaneki M, Mizuno Y, Hosoi T, et al. Serum concentration of vitamin K in elderly women with involutional osteoporosis. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1995;32:195–200.
18. Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JS. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under- γ -carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1523–8.
19. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K_2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:515–21.
20. Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues; dietary phyloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr* 1998;72:415–25.



21. Lamon-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

栞原 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 0.12 M 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化される。1974年 Stenfloら¹⁾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プラ、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 回繰り返す、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

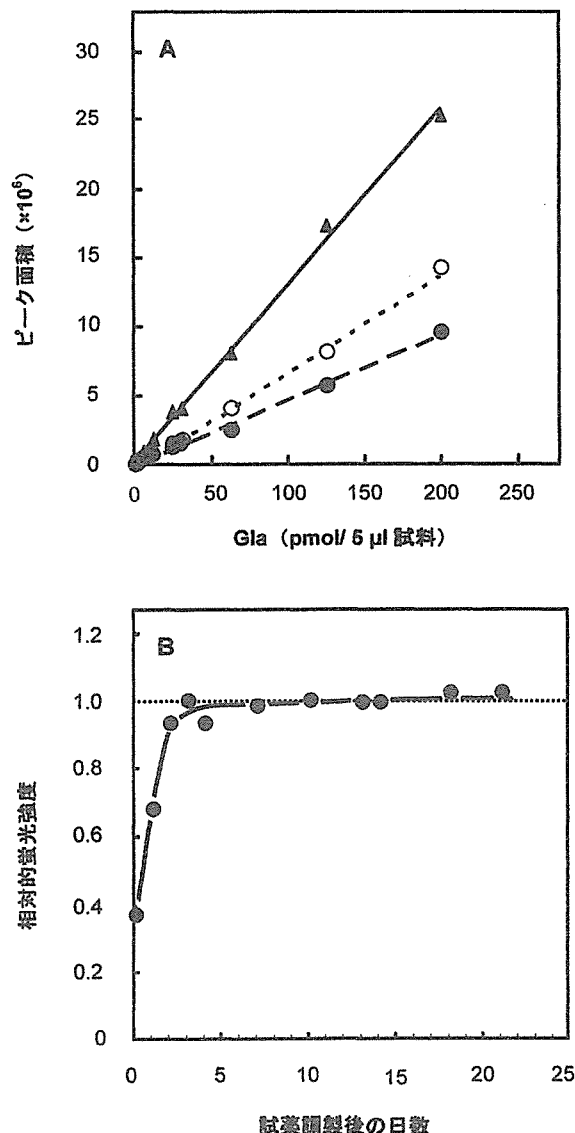


図1 蛍光試薬の経時的安定性
測定日毎に Gla 標準液 100 μl (Gla 64 pmol~16 nmol を含有) に OPA/ET 試薬 100 μl と緩衝液 200 μl を加えて蛍光化した。この溶液 5 μl を HPLC に注入し、A のグラフに示すように 0.80~200 pmol の Gla に対する蛍光強度をピーク面積で示し、9 点プロットの標準曲線を作成した。●は試薬調製当日、○は1日後、▲は3日後に測定した結果を示した。この結果に示すように、測定日によって蛍光強度(ピーク面積 / Gla pmole) が大きく変化した。B は蛍光試薬の安定性を調べるために、OPA/ET 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。

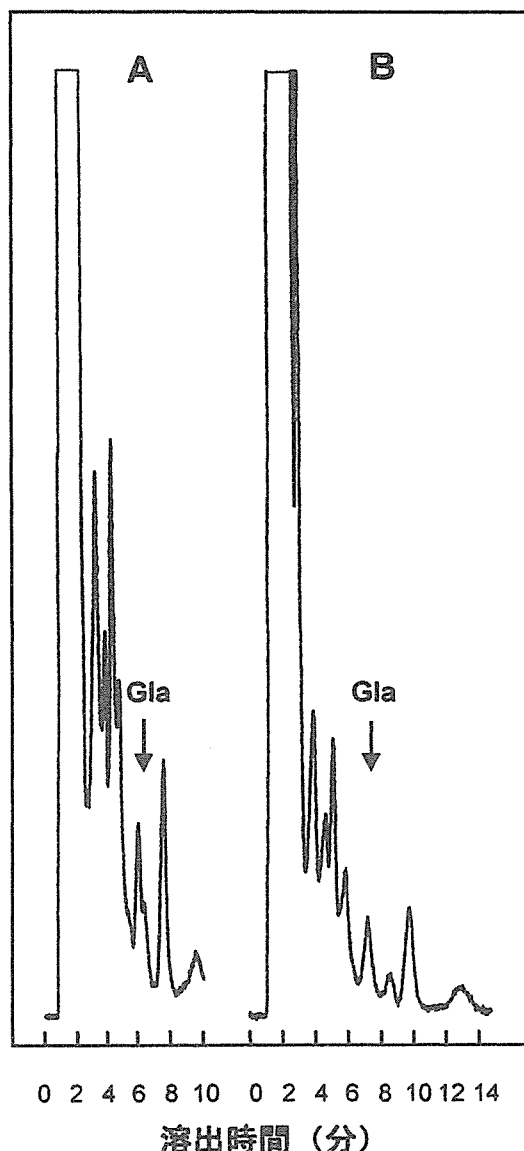


図2 尿試料中の遊離 Gla の HPLC 溶出パターン
A は蛍光化した 20 倍希釈の尿試料を 2.5 μl 注入し、0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 50:50, 流速 1 ml/min で溶出したパターンを示した。10 分以降に溶出していたペプチドやタンパク質のピークは拡散していたためカットしている。B は A と同じ尿試料を 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 60:40, 流速 1 ml/min で溶出したパターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

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

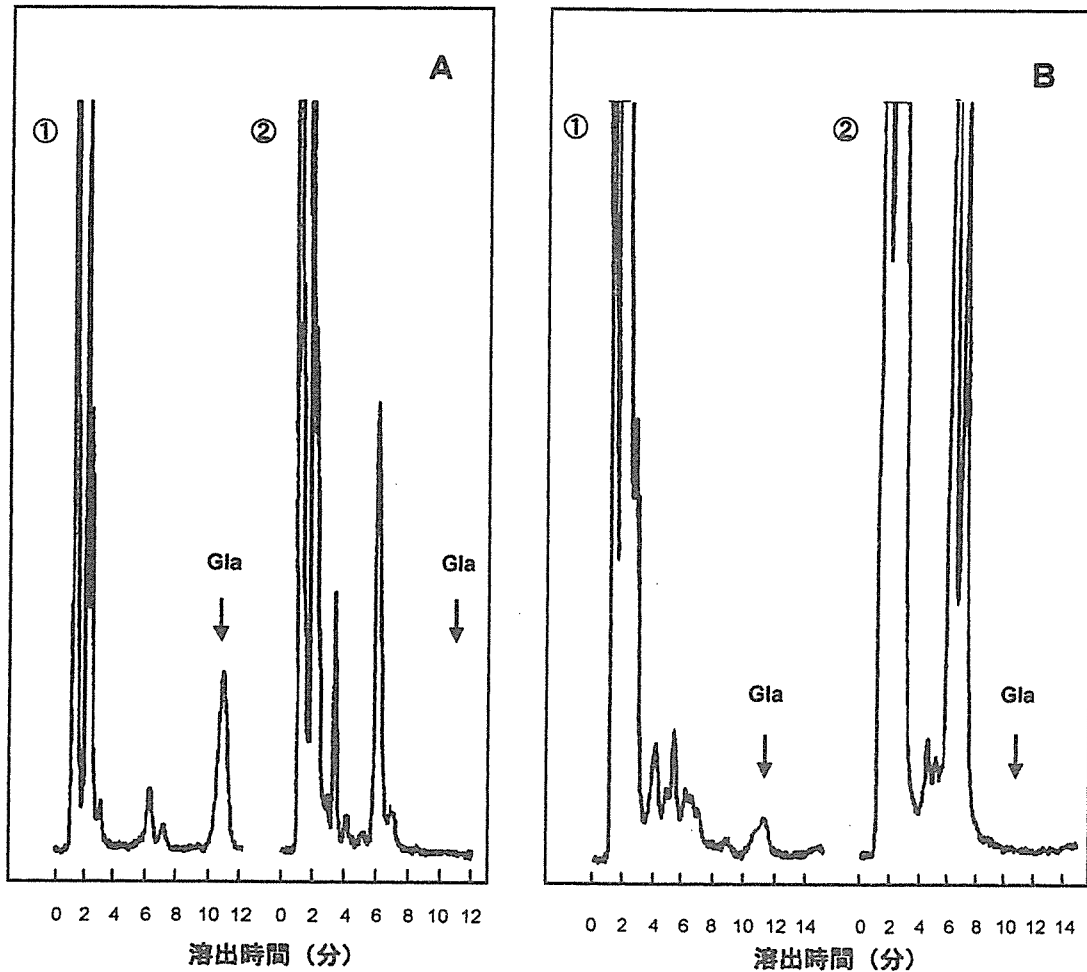


図3 脱カルボキシル化による Gla の HPLC 溶出パターン
 A は 2pmol の Gla 標準液, B は 20 倍希釈の尿試料をそれぞれ蛍光化し, 各試料を 2.5 μ l ずつ注入し, 図 2-B の条件で溶出した。A と B 共に①が塩酸未処理の溶出パターン, ②が塩酸処理による脱カルボキシル化の溶出パターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

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 分のグラシェ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→0.5 M 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 0.10pmol より濃度が低いと定量性に乏しく, また 150pmol 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, 0.10pmol より低くなると検出が難しく, 4.0pmol 以上になると分離が悪くなることから尿試料中の Gla

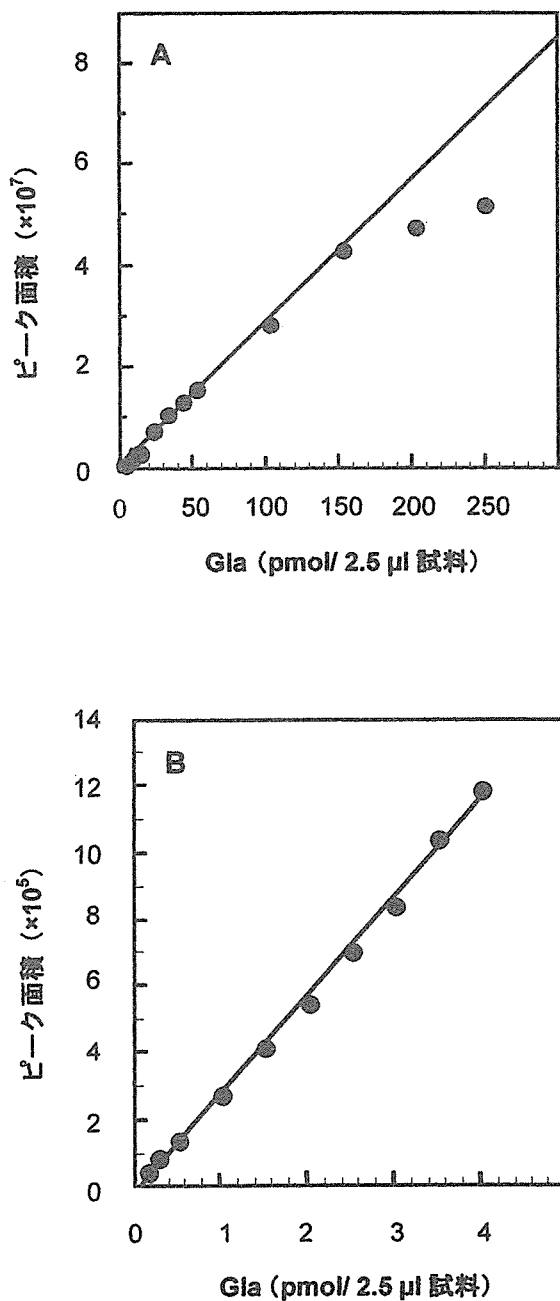


図 4 蛍光プレラベル Gla の HPLC による標準曲線の作成
 決定した HPLC の測定条件下で、Gla 量 0.25~250pmol (A) および 0.12~4.0pmol (B) の範囲の標準曲線を得るように測定した。

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、その後はエタノールを 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 2.5μl 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 (pH5.28) とアセトニトリルが 60:40、流速 1ml/min とし、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