

含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. 本屋敏郎, 宮田和代, 下園拓郎, 他徐放性鉄剤の吸収におよぼすお茶の影響. *病院薬学* (1986) 12, 411-4.

2. 三田村民夫, 北園正太, 吉村 修鉄剤内服時における緑茶飲用の妊婦貧血治療効果に対する影響について. *日産科誌* (1989) 41, 688-94.

3. 小切間美保, 西野幸典, 角田隆巳, 他若年女性のクエン酸第一鉄ナトリウム製剤からの鉄吸収に及ぼすアスコルビン酸含有市販緑茶飲料の影響. *栄食誌* (2001) 54, 81-7.

4. Gibson SA, Iron intake and iron status of preschool children: associations with breakfast cereals, vitamin C and meat. *Public Health Nutr* (1999) 2, 521-8.

5. Watt RG, Dykes J, Sheiham A, Drinks consumption in British pre-school children: relation to vitamin C, iron and calcium intakes. *J Hum Nutr Dietet* (2000) 13, 13-8.

6. Merhav H, Amitai Y, Palti H, et al. Tea drinking and microcytic anemia in infants. *Am J Clin Nutr* (1985) 41, 1210-3.

7. Doyle W, Crawley H, Robert H, et al, Iron deficiency in older people: interactions between food and nutrient intakes with

biochemical measures of iron; further analysis of the National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 years and over.

*Eur J Clin Nutr* (1999) 53, 552-9.

8. Imai K, Nakachi K Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br Med J* (1995) 310, 693-6.

9. Root MM, Hu J, Stephenson LS, et al. Iron status of middle-aged women in five counties of rural China. *Eur J Clin Nutr* (1999) 53, 199-206.

10. Nelson M, Poulter J Impact of tea drinking on iron status in the UK: a review. *J Hum Nutr Dietet* (2004) 17, 43-54.

11. 厚生労働省 (2008) 平成 18 年国民健康・栄養調査報告

表 1. 緑茶浸出液投与が鉄の栄養状態に及ぼす影響

測定項目	基本飼料群	緑茶投与群	高カテキン茶投与群
ヘモグロビン (g/dL)	14.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	14.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
ヘマトクリット (%)	41.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	41.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	41.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
血清鉄 (μg/dL)	242 ± 22 <sup>a</sup>	201 ± 11 <sup>a</sup>	220 ± 8 <sup>a</sup>
不飽和鉄結合能 (μg/dL)	214 ± 24 <sup>a</sup>	219 ± 15 <sup>a</sup>	201 ± 10 <sup>a</sup>
トランスフェリン飽和率 (%)	53.3 ± 3.7 <sup>a</sup>	48.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	52.3 ± 1.8 <sup>a</sup>
血清フェリチン (ng/mL)	36 ± 7 <sup>b</sup>	21 ± 2 <sup>ab</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>

値は平均値±標準誤差 (n = 6). 同じ行において, 共通の添字のない群間に有意差がある.

表 2. 緑茶浸出液投与が臓器の鉄濃度 (μg/g) に及ぼす影響

臓器	基本飼料群	緑茶投与群	高カテキン茶投与群
肝臓	28.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	25.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	19.8 ± 2.8 <sup>a</sup>
腎臓	9.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	13.7 ± 1.3 <sup>ab</sup>	17.3 ± 3.0 <sup>b</sup>
小腸	26.2 ± 8.0 <sup>a</sup>	23.9 ± 4.4 <sup>a</sup>	15.9 ± 1.8 <sup>a</sup>
脛骨	229 ± 31 <sup>b</sup>	81 ± 13 <sup>a</sup>	108 ± 26 <sup>a</sup>

値は平均値±標準誤差 (n = 6).

同じ行において, 共通の添字のない群間に有意差がある.

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 5. 食餌タンパク質の種類の変化がラットの鉄栄養状態に及ぼす影響

分担研究者 吉田 宗弘 関西大学 教授

#### 研究要旨

鉄はとくに女性において摂取不足の懸念されるミネラルである。食事の鉄の利用は共存する食成分の影響を受け、乳製品は鉄の利用を低下させるといわれている。食事の鉄の吸収性を高める食べ合わせを提案することを最終目標として、ラットをタンパク質源と鉄源の異なる飼料で飼育し、鉄栄養状態の違いを比較した。4週齢のWistar系雄ラット24匹を4群に分け、タンパク質源をカゼインまたは大豆分離タンパク質、鉄源を硫酸第一鉄（硫酸鉄）またはヘム鉄（日本バイオコン社製、ヘム鉄1.6<sup>®</sup>）とする飼料を与えて4週間飼育した。なお、飼料中のタンパク質濃度は20%、鉄濃度は12.5 ppmとした。また、カゼインと大豆分離タンパク質は飼料調製前に10倍量の0.1 M EDTA溶液で3回洗浄し、ミネラルフリーとした。大豆タンパク質と硫酸鉄を投与した群において、もっとも高いヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度、および、もっとも低い血清不飽和鉄結合能が得られ、鉄栄養状態がもっとも良いことが判明した。次いで大豆タンパク質とヘム鉄を投与した群の鉄栄養状態がよく、カゼインを与えた群の鉄栄養状態は硫酸鉄、ヘム鉄、いずれを与えた場合も著しく低かった。肝臓、腎臓、および小腸の鉄濃度も、大豆タンパク質と硫酸鉄を投与した群、大豆タンパク質とヘム鉄を投与した群の順に値が高く、カゼインを投与した群では硫酸鉄、ヘム鉄のいずれを与えた場合も値が低かった。以上の結果は、乳製品による鉄有効性低下作用は、乳製品中に高濃度に含有されるカルシウムではなく、カゼインタンパク質自身によるものであることを示している。

## A. 目的

鉄は、ヘモグロビンや各種酵素の構成成分であり、欠乏によって貧血や運動機能、認知機能等の低下を招く。また、月経血による損失と妊娠中の需要の増大が必要量に及ぼす影響は大きい。WHO では、ヘモグロビン濃度 12 g/dL 未満を一般成人女性の貧血の基準としている<sup>1)</sup>。このように、鉄は、とくに月経のある女性や妊娠中の女性にとって十分な摂取を心がけることが特に重要な栄養素のひとつである。

食事摂取基準(2005年版)においては、成人女性の鉄について推定平均必要量(estimated average requirement: EAR)を9.0 mg/d に設定しているが<sup>2)</sup>、平成17年度国民健康・栄養調査における18~49歳女性の鉄摂取量の75パーセンタイル値は8.8 mg/d に過ぎない<sup>3)</sup>。このことは、摂取量から見て、鉄欠乏のリスクが50%以上ある人が18~49歳の女性において75%以上存在することを意味する。実際、平成17年度国民健康・栄養調査によれば、20~49歳女性のヘモグロビン濃度の25パーセンタイル値は約12 g/dL であり<sup>3)</sup>、日本の成人女性の4人に1人は貧血状態にあるといえる。また、東京都の調査によると、1990年以降、中学校並びに高校の女子生徒の貧血有病率は経年的に直線的に増加している<sup>4)</sup>。さらに、ヘモグロビン濃度11 g/dL 未満で定義される妊娠貧血の女性の有病率は、一般女性の貧血有病率よりも明らかに高い<sup>5)</sup>。

鉄を豊富に含む食品は肉類など動物性食品に多い。このため、動物性食品の摂取の少ない日本人などの米食民族にとって、鉄の適切な摂取量を確保することは難しい。また、食品中の鉄の吸収率は、鉄自身の化

学形態、共存物、さらに摂取する人の鉄栄養状態によって変動する。したがって、健康を維持するのに必要な鉄を確保するには、単に摂取量を増やすだけではなく、吸収率を高めるための食べ合わせや調理法を提案することも必要である。

乳中の主要タンパク質であるカゼインは、その部分加水分解物であるカゼインホスホペプチドにミネラル(2価カチオン)吸収促進作用があるため、鉄、とくに無機鉄の吸収に対して促進的に作用する可能性が考えられる<sup>6-8)</sup>。しかし、実際にはカゼインを含む乳製品や調製乳は鉄吸収を抑制することが知られている<sup>9)</sup>。その理由として、カゼインに吸着しているカルシウムイオンが、同じ2価カチオンである鉄(II)イオンの吸収を阻害することが挙げられている<sup>10, 11)</sup>。しかし、カルシウムイオンの鉄吸収抑制は無機鉄だけではなく、ヘム鉄に対しても生じるとされており、カルシウムによる鉄吸収抑制に関しても不明な点が残っている。このようにメカニズムについては不明な点が多いが、一般には、鉄欠乏のリスクのある場合、鉄濃度の高い肉製品とカルシウム濃度の高い乳製品の同時摂取を避けることが必要とされている<sup>12)</sup>。

われわれは、ラットをカゼイン、または大豆タンパク質を用いて飼育し、硫酸第一鉄(硫酸鉄)とヘム鉄の鉄源としての利用性を比較した場合、最も利用性が高いのが大豆タンパク質と硫酸鉄の組み合わせ、逆に最も利用性の低いのがカゼインとヘム鉄の組み合わせであることを認めた<sup>13)</sup>。しかし、この実験では大豆タンパク質にもともと相当量の鉄(おそらく無機鉄)が吸着しており、大豆タンパク質がカゼインに比較

して本当に鉄利用性を高めていた（あるいはカゼインが大豆タンパク質に比較して鉄利用性を低下させた）かを結論できなかった。そこで本研究では、EDTA 溶液で洗浄することによってミネラルフリーとした大豆タンパク質とカゼインを飼料に用いて硫酸鉄とヘム鉄の利用性を比較し、飼料タンパク質の違いが鉄の利用性に及ぼす影響を検討した。

## B. 実験方法

### 1. 動物飼育

4週齢のWistar系雄ラット24匹を4群に分け、タンパク質源をカゼインまたは大豆分離タンパク質、鉄源を硫酸第一鉄またはヘム鉄（日本バイオコン社製、ヘム鉄1.6<sup>®</sup>（豚赤血球の酵素加水分解物の限外濾過物を濃縮したもの、鉄濃度約1.6%））とする飼料を与えて4週間飼育した。なお、飼料中のタンパク質濃度は20%、鉄濃度は12.5 ppmとした。また、カゼインと大豆分離タンパク質は飼料調製前に10倍量の0.1 M EDTA溶液で3回洗浄し、ミネラルフリーとした。飼育期間終了後に血液、肝臓、腎臓、小腸を採取して種々の測定に供した。

なお、本実験は、関西医科大学実験動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

### 2. 分析

採取した臓器の約1 gを10 mLの濃硝酸を用いて湿式灰化した。灰化後の溶液を水で一定量にメスアップし、鉄濃度をフレイム式原子吸光法で測定した。

血液は日本医学研究所に委託して、血球計算と血清生化学検査を行った。

## C. 結果

飼育期間中のラットの体重増加量には、群間の差を認めなかった。また、解剖後の臓器重量にも群間に差はなく、飼料のタンパク質源、および鉄源の違いの影響を認めなかった。さらに、血清の総タンパク質、尿素窒素、中性脂肪、総コレステロール、グルコース濃度、および、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素活性と $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性値にも群間に差を認めなかった。

表1に、各群ラットのヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度、および血清不飽和鉄結合能をまとめた。大豆タンパク質と硫酸鉄を投与した群において、もっとも高いヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度、および、もっとも低い血清不飽和鉄結合能が得られ、鉄栄養状態がもっとも良いことが判明した。次いで大豆タンパク質とヘム鉄を投与した群の鉄栄養状態がよく、カゼインを与えた群の鉄栄養状態は硫酸鉄、ヘム鉄、いずれを与えた場合も低かった。

表2に、肝臓、腎臓、および小腸の鉄濃度をまとめた。これらの臓器中の鉄濃度は、血液検査から判定される鉄栄養状態をよく反映しており、いずれの臓器においても、大豆タンパク質と硫酸鉄を投与した群の値がもっとも高く、次いで大豆タンパク質とヘム鉄を投与した群が高かった。そして、カゼインを投与した場合は、硫酸鉄、ヘム鉄のいずれを与えた場合も臓器中铁濃度が低かった。

#### D. 考察

今回の実験では飼料中铁濃度を12.5 ppmとした。この鉄濃度は通常のラット飼料の鉄濃度 (35 ppm) の半分以下である。この濃度を選択したのは、十分量の鉄を投与した場合には飼料中の共存物の影響を受けにくいと判断したからである。

設定した4群を比較した場合、タンパク質源としてはカゼインよりも大豆タンパク質、鉄源としてはヘム鉄よりも硫酸鉄を与えた場合に高い鉄栄養状態が得られた。

人を対象にした調査研究では、動物性食品由来の鉄は植物性食品由来の鉄よりも吸収性が高いため有効であるとされている。そして、動物性食品中の鉄の大半がヘム鉄、植物性食品中の鉄の大半が無機鉄であることから、ヘム鉄は無機鉄よりも有効であるとされてきた。しかし、本実験では、ブタ赤血球由来ヘム鉄の有効性は硫酸鉄よりも明らかに低かった。ラットを対象にした実験において、このようなブタ赤血球由来ヘム鉄の低有効性は、しばしば観察されている<sup>14)</sup>。その原因としては二つのことが考えられる。

一つは、本実験も含めて、このような鉄の有効性を比較する実験では、今回のように鉄の投与量を低くするか、あるいはあらかじめ鉄欠乏貧血状態を作成し、貧血状態からの回復能力を比較するという手法が用いられている。鉄栄養状態が低下すると、小腸粘膜における無機鉄の輸送担体が増加することが知られている<sup>15)</sup>。すなわち、低鉄栄養状態では無機鉄の吸収能力がヘム鉄のそれを上回っているため、このような実験では、無機鉄の有効性がヘム鉄を上回ることになる。

もう一つの可能性として、実験に用いたヘム鉄標品の問題がある。今回、および多くの実験で用いられるヘム鉄標品は、ブタ赤血球を酵素加水分解後、不溶物を遠心分離で除去し、限外濾過後、濃縮したものであるが、最終的に乾燥させるために高温処理を行っている。このため、本来は水溶性であるものが、市販製品は水に対して溶けにくく、0.1 M塩酸中でも鉄の遊離が認められない。すなわち、市販されているブタ赤血球由来ヘム鉄は熱変性しており、消化管内においても不溶であるため、利用率が低かったと考えられる。事実、カツオ血合肉から温和な条件で調製された鉄濃縮物 (大半がヘムタンパク質に由来すると考えられる) の有効性はラットを用いた貧血回復試験でも無機鉄に匹敵する有効性を示している<sup>14)</sup>。

タンパク質源として用いたカゼインと大豆タンパク質を比較した場合、カゼイン摂取時の鉄の有効性は大豆タンパク質摂取時に比較して明らかに低下していた。飼料中铁濃度12.5 ppmは低鉄ではあるが欠乏レベルではない。また、カゼインを投与したラットにおけるヘモグロビン濃度 (約5 g/dL) は飼料中铁濃度1 ppmの鉄欠乏食を投与したラット<sup>14)</sup>と同水準である。つまり、大豆タンパク質摂取が鉄の利用を高めたのではなく、カゼインが鉄の利用を抑制したといえる。そしてカゼイン摂取時には、ヘム鉄と硫酸鉄の差が顕著でないことを見ると、カゼインによる鉄利用の抑制は無機鉄とヘム鉄の双方に共通ということになる。

前回の実験において、EDTA非洗浄カゼインと12.5 ppmの鉄を硫酸鉄またはヘム鉄として与えたラットのヘモグロビン濃度は、

それぞれ約14  $\mu\text{g}/\text{dL}$ と約9  $\mu\text{g}/\text{dL}$ であり、今回のEDTA洗浄カゼインを与えた場合よりも高い値を示していた<sup>13)</sup>。すなわち、EDTA洗浄によってカゼインからカルシウムを除去すると、カゼインによる鉄利用抑制作用は強まったことになる。乳製品の鉄利用抑制に、カゼインに吸着しているカルシウムの影響をあげる研究者も多いが<sup>10,11)</sup>、今回の結果はこれを否定するものといえる。つまり、カゼインタンパク質自身が鉄の利用を妨げたといわざるを得ない。

最近、 $\beta$ -カゼイン由来のカゼインホスホペプチドに結合した鉄は消化管において効率よく吸収されるが、 $\alpha\text{s}$ -カゼイン由来のカゼインホスホペプチドに結合した鉄は吸収されにくいことが報告された<sup>16)</sup>。EDTA洗浄したカゼインにはカルシウムフリーのカゼインホスホペプチドが多数存在しており、EDTA非洗浄のカゼインよりも消化管内で鉄-カゼインホスホペプチド複合体を形成する可能性が高い。カゼインによる鉄利用抑制にはこの吸収率の低い $\alpha\text{s}$ -カゼイン由来のカゼインホスホペプチドと鉄との複合体が関わっているのかもしれない。

#### E. 健康危機情報

特記する情報なし

#### F. 研究発表

##### 1. 発表論文

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案特許

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 引用文献

- World Health Organization (1992) The prevalence of anaemia in women. A Tabulation of Available Information. WHO, Geneva.
- 厚生労働省策定, (2005) 日本人の食事摂取基準 [2005年版], 第一出版, 東京, 161-71.
- 健康・情報研究会編 (2008) 国民健康・栄養の現状 -平成17年厚生労働省国民健康・栄養調査より-, 第一出版, 東京.
- Maeda M, Yamamoto M, Yamauchi K. Prevalence of anemia in Japanese adolescents: 30 years' experience in screening for anemia. *Int J Hematol* (1999) 69, 75-80.
- Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, *et al.* Nutritional status of pregnant and lactating women in Japan: A comparison with non-pregnant/non-lactating controls in the National Nutrition Survey. *J Obstet Gynaecol Res* (2003) 29, 96-103.
- Ait-Oukhatar N, Peres JM, Bouhallab S, Neuville D, *et al.* Bioavailability of caseinophosphopeptide-bound iron. *J Lab Clin Med* (2002) 140, 290-4.
- Bouhallab S, Cinga V, Ait-Oukhatar N, *et al.* Influence of various phosphopeptides of caseins on iron absorption. *J Agric Food*

- Chem* (2002) 50, 7127-30.
8. Pérès J-M, Bouhallab S, Bureau F, *et al.*  
Mechanisms of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *J Nutr Biochem* (1999) 10, 215-22.
  9. Jackson LS, Lee K. The effect of dairy products on iron availability. *Crit Rev Food Sci Nutr* (1992) 31, 259-70.
  10. Hallberg L, Rossander-Hultén L, Brune M *et al.* Bioavailability in man of iron in human milk and cow's milk in relation to their calcium contents. *Pediatr Res* (1992) 31, 524-7.
  11. Gleerup A, Rossander-Hultén L, Gramatkovski E, *et al.* Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am J Clin Nutr* (1995) 61, 97-104.
  12. Hallberg L, Sandström B, Ralph A, *et al.*  
(吉田宗弘訳)(2004) 鉄, 亜鉛, その他の微量元素, ヒューマン・ニュートリション 基礎・食事・臨床第 10 版 (Garrow JS, James WPT, Ralph A eds. (翻訳監修代表, 細谷憲政)), 医歯薬出版, 東京, 185-218.
  13. 吉田宗弘, 田仲麻友美, 福永健治 (2008) 食餌タンパク質の種類の変化がラットにおける鉄の利用に及ぼす影響, 第 19 回日本微量元素学会, 東京.
  14. Matsumoto E, Mori N, Doi M, *et al.*  
Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. *J Agric Food Chem* (2003) 51, 4478-82.
  15. Trinder D, Oates PS, Thomas C, *et al.*  
Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut* (2000) 46, 270-6.
  16. Kibangou IB, Bouhallab S, Henry G, *et al.*  
Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatric Res* (2005) 58, 731-4.



表 1. 食餌タンパク質と摂取鉄の形態の違いによるヘモグロビンおよび血清鉄濃度の変化

測定項目	カゼイン		大豆タンパク質	
	硫酸鉄	ヘム鉄	硫酸鉄	ヘム鉄
ヘモグロビン (g/dL)	5.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	13.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	9.2 ± 0.5 <sup>b</sup>
ヘマトクリット (%)	15.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	39.2 ± 1.9 <sup>c</sup>	26.1 ± 1.7 <sup>b</sup>
血清鉄 (μg/dL)	28 ± 1 <sup>a</sup>	28 ± 1 <sup>a</sup>	253 ± 21 <sup>b</sup>	61 ± 3 <sup>b</sup>
不飽和鉄結合能 (μg/dL)	753 ± 56 <sup>b</sup>	768 ± 61 <sup>b</sup>	283 ± 34 <sup>a</sup>	636 ± 23 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 6). 同じ行の中で共通の添字のない群間に有意差がある.

表 2. 食餌タンパク質と摂取鉄の形態の違いによる臓器中铁濃度 (μg/g) の変化

臓器	カゼイン		大豆タンパク質	
	硫酸鉄	ヘム鉄	硫酸鉄	ヘム鉄
肝臓	18.4 ± 0.6 <sup>ab</sup>	17.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	23.4 ± 1.8 <sup>c</sup>	22.5 ± 1.0 <sup>bc</sup>
腎臓	16.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	16.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	33.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	23.3 ± 1.3 <sup>b</sup>
小腸	6.1 ± 1.3 <sup>ab</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	6.9 ± 0.4 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 6). 同じ行の中で共通の添字のない群間に有意差がある.



平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### III. 分担研究者の報告書

#### 6. 曲率解析法を用いた思春期および若年成人のビタミン K 栄養評価

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学 教授

研究協力者 津川尚子 神戸薬科大学 講師

研究協力者 鎌尾まや 神戸薬科大学 助手

#### 研究要旨

ビタミン K (VK) 栄養の低下は、閉経後女性の大腿骨頸部骨折や大腿骨、脊椎の低 BMD のリスクを増大するといわれている。我々は、これまでに高齢者女性において、VK 栄養状態が骨折に関与する結果を得た。一方、我が国では思春期から若年成人を対象としたビタミン K 栄養を評価した研究はほとんどない。そこで、ビタミン K 栄養を評価するために VK 摂取量を調査するとともに骨の VK 不足マーカーとして低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) を測定し、対数回帰式を用いた曲率解析法を用いて VK 必要量の算定を試みた。対象者は、12～18 歳（中学 1 年，高校 1，3 年）の健常な思春期男女 1183 名と若年成人女性（19～29 歳）316 名。血中 ucOC 濃度を測定し、ビタミン K 摂取量（食事摂取頻度調査により算出）との相関関係を評価した。VK 必要量を従来法である二群間比較法と、今回新たに考案した曲率解析法により評価した。解析の結果、全ての学年において、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の間に有意な負の相関関係が認められた。二群間比較法で各年齢の VK 摂取量のカットオフ値を評価した結果、100  $\mu\text{g}/\text{日}$ ～400  $\mu\text{g}/\text{日}$ までの範囲で性別・年齢に無関係にばらつく値が得られた。一方、曲率解析法による評価値は 155～188  $\mu\text{g}/\text{日}$ となり、中学 1 年～高校 3 年までほとんどばらつかないカットオフ値が得られた。

対数回帰式を用いた曲率解析法により、思春期の骨に対する VK 摂取量のカットオフ値 155～205  $\mu\text{g}/\text{日}$ が得られた。この値は、血液凝固を指標とする現在の食事摂取基準（男子：75～80  $\mu\text{g}/\text{日}$ ，女子：60～65  $\mu\text{g}/\text{日}$ ）を上回る量であり、骨の健康維持にはより多くの VK 摂取が必要である可能性が示唆された。

## A. 目的

ビタミン K (VK) は、血液凝固因子として欠かせないビタミンである。一方、VK は骨の非コラーゲンたんぱく質であるオステオカルシンを Gla 化し、骨ミネラルのハイドロキシアパタイトと結合することで骨強度を維持する役割を持ち、VK 栄養の低下が閉経後女性の大腿骨頸部骨折や大腿骨、脊椎の低 BMD のリスクを増大させることが報告されている。現在、VK の食事摂取基準は血液凝固遅延を指標として設定されており、正常な血液凝固能を維持するに必要な VK 摂取量  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日が目安量の設定基準となっている。これにより、成人男性では  $75 \mu\text{g}/\text{日}$ 、成人女性では  $60\sim 65 \mu\text{g}/\text{日}$  が目安量として設定されている。国民栄養調査の結果では、成人男女ともに平均  $200 \mu\text{g}/\text{日}$  以上を摂取していることから、VK 摂取量についてはほぼ充足しているといえる。

一方、大腿骨頸部骨折とビタミン K 摂取量との関係を検討したコホート研究では、 $100 \mu\text{g}/\text{日}$  以上の VK 摂取群ではそれ未満の摂取量の群に比べて骨折発生率が低下することが報告されている<sup>1,2)</sup>。われわれも閉経後女性において、血中フィロキノン濃度が  $2.67 \text{ nmol}/\text{L}$  未満の低  $K_1$  濃度群の椎体骨骨折相対危険度は、それ以上の高  $K_1$  濃度群に比べて 3.5 倍高くなることを確認した<sup>3)</sup>。また、血中の PIVKII と低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) をそれぞれ血液凝固と骨の VK 不足マーカーとして比較した場合、骨に必要な VK は血液凝固に比べて多いことが示唆されている<sup>4,5)</sup>。骨における VK の栄養評価研究は不足しているため、骨代謝に必要な VK 摂取量を食事摂取基準に反映させることは困難である。しかし、血中 ucOC 濃度が VK

不足マーカーとして骨折に関連することが明らかとなってきており、血中 ucOC 濃度を用いて骨の VK 栄養状態を評価し、必要量を求めていくことは非常に重要な課題である。特に若年者の場合、骨折の発生頻度が少ないために骨折が VK 栄養の評価対象にならないことから、血中 ucOC 濃度が骨の VK 栄養マーカーとして非常に重要になる。これまで若年者の骨に対する VK 栄養の調査研究はほとんどないことから、今回、思春期から若年成人層における VK 摂取量と ucOC 濃度の関係を評価し、その必要量を対数回帰式を用いた曲率解析法を用いて算定する方法の開発を試みた。

## B. 方法

### 1. 対象者

12~18 歳 (中学 1 年, 高校 1 年, 高校 3 年) の健常思春期男女 1,183 名と若年成人女性 (19~29 歳) 316 名。

### 2. 測定項目

ビタミン K 摂取量 (食事摂取頻度調査により算出)、血中 ucOC 濃度、血中 VK 濃度。

### 3. 統計解析

統計解析ソフト JMP7 ならびに MedCalc を用いて解析を行った。VK 必要量の評価は、従来法である二群間比較法と、新たに考案した曲率解析法により評価した。二群間比較法: 各年齢・性別の対象者を VK 摂取量 100, 150, 200, 250, 300, 350 あるいは  $400 \mu\text{g}/\text{日}$  を基準値として 2 群に分け、基準値以上群と未満群の血中 ucOC 濃度を Student's t-test を用いて有意差検定し、最も差が得られる ( $p$  値が最低かつ  $t$  値の絶対値が最高) 基準値をカットオフ値として評価する。曲率解析法 (図 1): VK 摂取量と ucOC 濃度の関係を示す非線形対数回

帰式を Passing & Bablock 回帰分析法により得る。VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の平均 +2SD の値をもとに、この回帰式の線上における上限値を求める。この上限値をそれぞれ 100 として、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度を 100 分率で分け、曲率解析を行う。曲率解析とは、曲線の内側に接する円の半径を求める方法で、その円の半径が極小になる点、すなわち、VK 摂取量の低下に伴って血中 ucOC 濃度が最も急激に変化する点をカットオフ値として応用評価した。

### C. 結果と考察

被験者の VK 摂取量、血中 ucOC 濃度と両因子の相関関係を表 1 に示す。VK 摂取量は思春期では 200  $\mu\text{g}/\text{日}$  前後、若年成人女性では 283  $\mu\text{g}/\text{日}$  であった。思春期女子では、高校 1 年生で摂取量が低かったものの、加齢的な一定の変化の傾向は認められなかった。一方、血中 ucOC 濃度は、男女いずれにおいても中学 1 年生が最も高く、年齢とともに有意に低下した。また、男子の ucOC 濃度は女子に比べて有意に高かった。ucOC 濃度が、性別、年齢で変化することから、一律の ucOC 濃度を基準値として骨の VK 栄養を評価することは出来ないと判断された。VK 摂取量と ucOC 濃度は、年齢性別を問わず有意な負の相関関係を示すことが確認できたことから、いずれの群においても血中 ucOC 濃度を VK 栄養の指標に用いることができると判断した。

2 群間比較法で VK 摂取量のカットオフ値を評価した結果、男子では中学 1 年：300  $\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年：100  $\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年：300  $\text{g}/\text{日}$  となり、女子では中学 1 年：250  $\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年：150  $\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年：400  $\text{g}/\text{日}$ 、若年成人女性：300  $\text{g}/\text{日}$  となった (図 2)。このよ

うに、二群間比較法では、100  $\mu\text{g}/\text{日}$ ~400  $\mu\text{g}/\text{日}$  までの範囲で性別・年齢に無関係に大きくばらつくカットオフ値が得られ、この方法は VK 栄養の評価には不向きであると考えられた。

次に、若年成人女性を対象に曲率解析法によりカットオフ値を評価した (図 3)。VK 摂取量の上限値を 907  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、ucOC 濃度の上限値を 12.8  $\text{ng}/\text{mL}$  と設定し、求めたカットオフ値は 205  $\mu\text{g}/\text{日}$  となった。同様に思春期男女について評価した結果、男子では中学 1 年：170  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年：178  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年：154  $\mu\text{g}/\text{日}$  となり、女子では中学 1 年：188  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 1 年：155  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、高校 3 年：162  $\mu\text{g}/\text{日}$  となった (図 4)。曲率解析法で求めた思春期の VK 摂取量のカットオフ値は、155~188  $\mu\text{g}/\text{日}$  にあり、二群間比較法で見られたような極端なばらつきは認められなかった。

二群間比較法は、Jesudason ら<sup>9)</sup>がビタミン D (VD) のカットオフ値を評価するために報告した方法である。VD 栄養を評価する場合、血中 25-ヒドロキシビタミン D (25OHD) 濃度と副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度が負相関関係を示すために、PTH が VD 栄養の不足マーカーとして用いられる。われわれは、これまでにこの方法を用いて高齢者女性、若年女性ならびに思春期の VD カットオフ値を評価してきたが、VK でみられたような極端な評価値のばらつきは見られなかった。VK の栄養評価において二群間比較法で極端なばらつきが見られたのは、VK vs ucOC の負相関関係におけるばらつきが VD vs PTH の場合に比べて大きいことが原因として考えられる。今回、二群間比較法が VK 栄養評価には不向きと判断し、それに代わる方法として新規に曲率解析法を考案した。この方法の特徴

は、まず、対数回帰式を X 軸の数値の変動が考慮されない最小二乗法を用いるのではなく、X 軸と Y 軸両方の数値の変動を考慮して回帰式を求める Passing & Bablock 法で評価することにある。この式をもとに、VK 摂取量の低下により ucOC 濃度が最も急激に上昇し始めるポイントを曲率解析で求めるといのがこの方法の原理であるが、まず、曲率解析法の有用性を確認する必要がある。そこで、すでに二群間比較法でカットオフ値を求めている若年成人女性（今回の対象と同一の対象者）VD 栄養の評価に適用した。その結果、二群間比較法では 25OHD 濃度のカットオフ値が 18 ng/mL となるのに対して、曲率解析法では 19.8 ng/mL と非常に近似する数値を得ることができた。このことから、曲率解析法は栄養素とその不足マーカーに有意な相関関係があり、かつ、非線形回帰式が求められる場合、データのばらつきの影響をあまり受けることなく栄養評価できる方法であると考えられ、VK 栄養にも適用可能と判断した。

対数回帰式を用いた曲率解析法により、思春期の骨に対する VK 摂取量のカットオフ値 155~205  $\mu\text{g}/\text{日}$  が得られた。この値は、血液凝固を指標とする現在の食事摂取基準（男子：75~80  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、女子：60~65  $\mu\text{g}/\text{日}$ ）を上回る量であり、骨の健康維持にはより多くの VK 摂取が必要である可能性が示唆された。

#### D. 健康危機情報 特記する情報なし

#### E. 研究発表

##### 1. 発表論文

- Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M,

Ozaki R, Tanaka K, Okano T. Low Plasma Phylloquinone Concentration Is Associated with High Incidence of Vertebral Fracture in Japanese Women. *J Bone Miner Metab* (2008), 26(1),79-852.

- Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H., Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T and Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporosis Int* (2009), in press.
- Nakamura K, Tsugawa N, Saito T, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Hyodo K, Maruyama K, Oshiki R, Kobayashi R, Nashimoto M, Yoshihara A, Ozaki R, Okano T, Yamamoto M. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone* (2008) 42, 271-277
- Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Uwano M, Yamaguchi N, Uenishi K, Ishida H, Sasaki S, Okano T. Vitamin k content of foods and dietary vitamin k intake in Japanese young women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008), 53(6), 464-70.

##### 2. 学会発表

- 津川 尚子, 鎌尾 まや, 須原 義智, 上西 一弘, 石田 裕美, 岡野登志夫, 「思春期におけるビタミン K 栄養評価とビタミン K 不足マーカーとしての低カルボキシル化オステオカルシンの有用性の評価」日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月 27 日
- 津川尚子, 佐々木敏, 鎌尾まや, 村上健太郎, 高橋佳子, 上西一弘, 山崎美津代,

早瀬仁美, 合田敏尚, 岡純, 馬場啓子, 大木和子, 渡邊令子<sup>1</sup>, 杉山佳子, 岡野登志夫「女子大学生におけるビタミン D 栄養の評価」第 60 回関西カルシウム懇話会, 大阪, 2008 年 4 月 5 日

- ・ 津川尚子, 佐々木敏, 鎌尾まや, 村上健太郎, 高橋佳子, 上西一弘, 山崎美津代, 早瀬仁美, 合田敏尚, 岡純, 馬場啓子, 大木和子, 渡邊令子, 杉山佳子, 岡野登志夫「血中 25OHD 濃度および PTH 濃度を指標とした女子大学生のビタミン D 栄養の評価」日本ビタミン学会第 60 回大会, 仙台, 2008 年 6 月 14 日
- ・ 津川尚子, 高瀬友貴, 峯上卓也, 小池さやか, 土井綾子, 鎌尾まや, 須原義智, 上西一弘, 石田裕美, 岡野登志夫「微分解析法を用いたビタミン D 必要量の評価」第 10 回日本骨粗鬆症学会, 大阪, 2008 年 10 月 31 日

F. 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

G. 引用文献

1. 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(1), 74-9.
2. Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW,

Ordovas J, Schaefer EJ, Dawson-Hughes B, Kiel DP. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* (2000), 71(5), 1201-8.

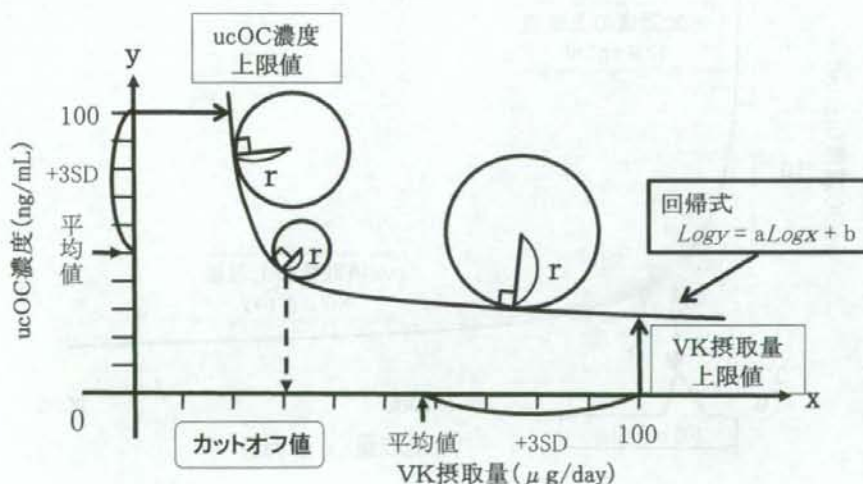
3. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* (2008), 26(1), 79-85.
4. Booth SL, Martini L, Peterson JW, Saltzman E, Dallal GE, Wood RJ. Dietary phylloquinone depletion and repletion in older women. *J Nutr* (2003) 133(8), 2565-2569.
5. 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(5), 1055-60.
6. Jesudason D, Need AG, Horowitz M, O'Loughlin PD, Morris HA, Nordin BE. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Bone* (2000) 31(5), 626-30.

表1 被験者のVK摂取量, 血中 ucOC 濃度と両者の相関関係

対象者	人数	ビタミンK 摂取量	ucOC 濃度	VK 摂取量と ucOC 濃度の 相関関係		
				r	p	
男子	中一	166	212.5 ± 122.2	40.4 ± 22.4*	-0.2483	0.0013
	高一	194	222.7 ± 180.3	19.7 ± 13.5*	-0.1857	0.0109
	高三	183	196.6 ± 129.2	12.2 ± 7.0*	-0.1964	0.0092
		$p^{\#}$	0.2262	< 0.0001		
女子	中一	176	228.5 ± 145.0	27.5 ± 17.0	-0.1587	0.0359
	高一	247	193.9 ± 135.4	9.5 ± 5.5	-0.2968	< 0.0001
	高三	217	209.7 ± 128.5	6.5 ± 3.5	-0.1980	0.0035
		$p^{\#}$	0.0355	< 0.0001		
若年成人女性		316	283.3 ± 207.9		-0.1594	0.0045

\*男女間の有意差 (Student's t-test :  $p < 0.05$ )

#学年間の有意差 (ANOVA :  $p < 0.05$ )



非線形回帰式における曲率(1/r)が最大となる点をカットオフ値とする。

注) 平均+3SDで全体の99.85%の人を含む

図1 曲率解析法



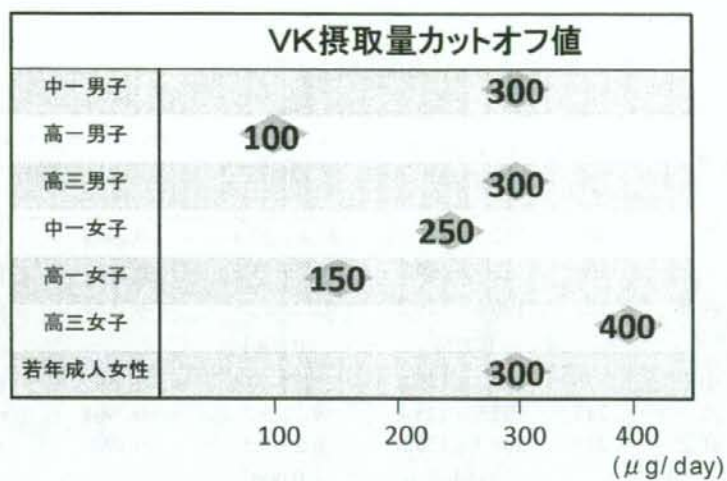


図2 二群間比較法で評価した VK 摂取量のカットオフ値

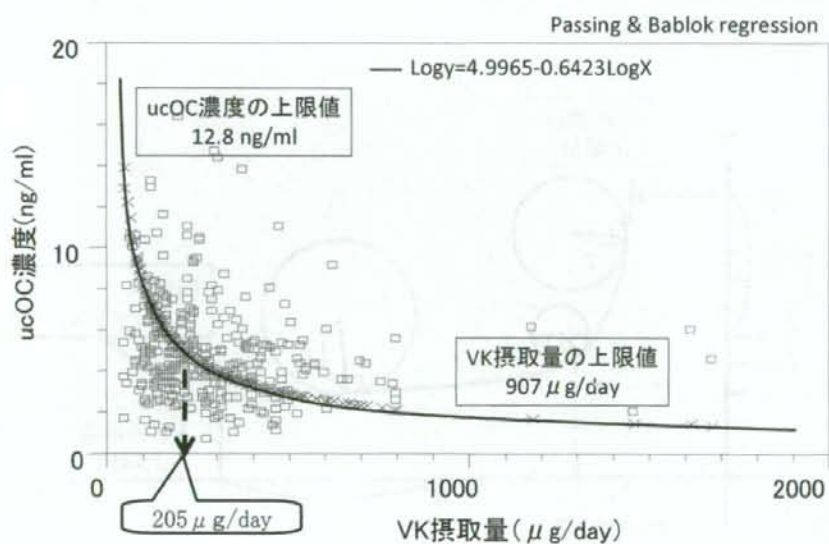


図3 曲率解析法による若年成人女性の VK 摂取量のカットオフ値評価

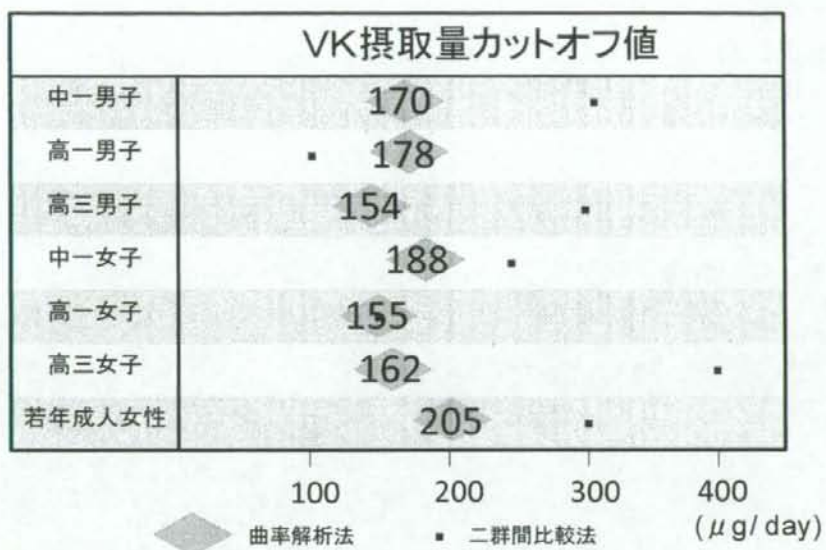


図4 曲率解析法で評価した VK 摂取量のカットオフ値

## IV. 研究協力者の報告書

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

#### IV. 研究協力者の報告書

##### 1. ビオチンの必要量策定に関する研究

研究協力者 渡邊 敏明 兵庫県立大学 教授

研究協力者 榎原 周平 兵庫県立大学 助手

#### 研究要旨

2010 年版食事摂取基準におけるビオチン必要量を策定するための文献調査を行った。