

度と思われ、過剰摂取の域に到達することはないと判断できる。

セレンの摂取量はいずれも日本人の平均的な摂取量を大きく下回り、50 µg/日を超えることはなかった。日本の菜食主義者集団において、血清セレン濃度が低下しているという報告<sup>8)</sup>を裏付けるものといえる。なかでも、玄米多食の対象者Aでは3日とも推定平均必要量を下回っていた。副食の少ない献立であったことが影響したものと思われる。セレン欠乏症として知られる中国克山病は、推定セレン摂取量12 µg/日に全般的な栄養不良やウイルス感染が重層したことにより発生したと考えられており<sup>10)</sup>、15 µg/日前後の低セレン摂取量の継続がただちにセレン欠乏に起因する健康障害を引き起こすわけではない。しかし、低セレン摂取状態の継続は、がんをはじめとするいくつかの生活習慣病の発生リスクを高めるといわれていることから<sup>11)</sup>、放置することは好ましくないといえる。対象者BおよびCも含めて、厳格な菜食主義者であるビーガンに対しては、セレン摂取を増やすための栄養指導が必要と思われる。その場合、高セレン含量の米国産硬質小麦、あるいは米国中南部産大豆に由来する製品<sup>12)</sup>を食材として用いるのが適切ではないかと判断する。

モリブデンの摂取は、対象者Cが日本人の平均的な摂取量に近接し、他の2名はこれを下回った。モリブデンの供給源は穀物と大豆であることから<sup>4)</sup>、菜食主義者では平均的な日本人よりも高い摂取量になると予想された。実際、ドイツでは、菜食主義者のモリブデン摂取量が一般人よりも高いとする報告が提出されている<sup>13)</sup>。食品のモリブデン含量には著しい地域差が認められる<sup>14)</sup>。したがって、今回の菜食主義者

のモリブデン摂取が予想外に少なかったのは、摂取していた穀物や大豆製品のモリブデン濃度が文献値よりも低いことに起因するのかもしれない。ただし、いずれにしてもモリブデン摂取量は、推奨値を超え、耐容上限量には相当余裕のある範囲であるので、問題はまったくないといえる。

以上、ビーガン3名3日分の9献立の分析から判断できることは、日本のビーガンの献立は、カルシウムとセレンの不足が際立つが、鉄と銅の摂取が十分であり、亜鉛の摂取も非菜食主義者に匹敵するということだった。乳製品もしくは卵を摂取するラクトベジタリアンやオボベジタリアン、および少量の動物性食品の摂取を許容する"セミベジタリアン"では、カルシウムの摂取も十分であることが確認されている<sup>15)</sup>。セレンは魚介類に豊富に含まれていることもあわせると<sup>16)</sup>、ビーガンにおけるカルシウムとセレンの摂取不足を解消するには、栄養学的見地から一部の動物性食品の摂取に寛容になるように要請するのが第一選択と思う。これが受け入れられない場合には、不足の可能性のあるミネラルを高濃度に含有する植物性食品を具体的に提示することが必要となるだろう。

#### 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

吉田宗弘, 岩下裕紀. 実測にもとづく菜食主義者のカルシウムと微量ミネラル摂取量の

評価. 第27回日本微量栄養素学会, 京都, 2010  
(予定).

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

1. 健康・栄養情報研究会編. 国民健康・栄養の現状 - 平成17年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より - . 第一出版, 東京 (2008).
2. 鈴木泰夫. マンガン. ミネラル・微量元素の栄養学 (鈴木継美, 和田攻編), 第一出版, 東京 (1994) 469-481.
3. 吉田宗弘. 微量元素 (2) 日本人はセレン摂取を増やすべきか. *臨床栄養* (2007) 111, 598-599.
4. Hattori H, Ashida A, Itô C, Yoshida M. Determination of molybdenum in foods and human milk, and an estimate of average molybdenum intake in the Japanese population. *J Nutr Sci Vitaminol* (2004) 50, 404-409.
5. Kadrabová J, Madaric A, Kováčiková Z, Ginter E. Selenium status, plasma zinc, copper, and magnesium in vegetarians. *Biol Trace Elem Res* (1995) 50, 13-24.
6. Judd PA, Long A, Butcher M, Caygill CP, Diplock AT. Vegetarians and vegans may be

most at risk from low selenium intakes.

*BMJ* (1997) 314, 1834.

7. Bortoli MC, Cozzolino SMF. Zinc and selenium nutritional status in vegetarians. *Biol Trace Elem Res* (2009) 127, 228-233.
8. 小切間美保, 田川尚美, 東福祐子, 佐々木公子, 樋口寿, 井奥加奈, 梶原苗美, 岡田真理子, 奥田豊子. 45日間菜食療法実施者の血清セレン・亜鉛濃度と関連する因子. *微量栄養素研究* (2004) 21, 93-96.
9. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Manganese* (1992), 205-88.
10. Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* (2003) 133, 1463-67.
11. Etminan M, FitzGerald JM, Gleave M, Chambers K Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* (2005) 16, 1125-31.
12. 吉田宗弘, 安藤達彦, 館博. セレンの機能とセレン含量測定の意義. *食品と開発* (1995) 30 (10), 41-45.
13. Holzinger S, Anke M, Röhrig B, Gonzalez D. Molybdenum intake of adults in Germany and Mexico. *Analyst* (1998) 447-50.
14. 吉田宗弘, 三木篤史. 大豆に含有されるモリブデンの濃度と化学形態. *微量栄養素研究* (2005) 22, 13-17.
15. 仲本桂子, 渡邊早苗, 工藤秀樹, 田中明. 日本人中高年菜食者の栄養状態の特徴.

*Vegetarian Research* (2008) 9, 7-16.

16. 吉田宗弘. 日本人のセレン摂取と血中セレン濃度. *栄養誌* (1992) 45, 485-94.

表1 収集したビーガンの献立から摂取できるエネルギー、タンパク質、および脂質量

試料	エネルギー (kcal/日)	タンパク質 (g/日)	脂肪 (g/日)	脂肪エネルギー比 (%)
A 1日目	1840	43.3	41.7	20.4
2日目	2497	61.2	72.4	26.1
3日目	1752	52.9	42.6	21.9
平均	2030	52.5	52.2	22.8
B 1日目	1957	65.1	92.0	42.3
2日目	1825	47.3	60.4	29.8
3日目	1447	46.9	40.2	25.0
平均	1743	53.1	64.2	32.4
C 1日目	1835	69.9	61.0	29.9
2日目	1599	51.2	43.0	24.2
3日目	1579	77.9	55.4	31.6
平均	1671	66.3	53.1	28.6
国民健康栄養調査*	1703	64.0	52.3	27.6
食事摂取基準**				
推定平均必要量	1750	40	-	-
推奨量	-	50	-	-
目標量	-	-	-	20～25

\* 平成17年度国民健康・栄養調査成績における30～49歳女性の摂取量の中央値

\*\* 食事摂取基準(2010年版)における30～49歳女性に対する数値。エネルギーは推定エネルギー必要量(身体活動レベルI)。

表2 収集したビーガンの献立から摂取できるカルシウム, 鉄, 亜鉛, および銅量

試料	カルシウム (mg/日)	鉄 (mg/日)	亜鉛 (mg/日)	銅 (mg/日)
A 1日目	161	10.4	9.0	1.12
2日目	283	13.5	11.5	1.74
3日目	208	11.0	7.0	0.99
平均	217	11.6	9.2	1.28
B 1日目	400	14.8	7.8	1.36
2日目	403	9.3	6.4	1.44
3日目	329	7.0	6.1	1.04
平均	377	10.4	6.8	1.28
C 1日目	429	16.8	10.1	2.58
2日目	237	11.9	8.2	1.71
3日目	557	14.8	9.5	2.32
平均	408	14.5	9.3	2.20
国民健康栄養調査*	445	6.9	7.3	1.01
食事摂取基準**				
推定平均必要量	550	9.0	8	0.6
推奨量	650	11.0	9	0.7
耐容上限量	2300	40	35	10

\* 平成17年度国民健康・栄養調査成績における30～49歳女性の摂取量の中央値

\*\* 食事摂取基準(2010年版)における30～49歳女性に対する数値.

表3 収集したビーガンの献立から摂取できるマンガン、セレン、およびモリブデン量

試料	マンガン (mg/日)	セレン ( $\mu$ g/日)	モリブデン ( $\mu$ g/日)
A 1日目	9.2	15	106
2日目	10.4	12	130
3日目	5.5	19	87
平均	8.4	15	108
B 1日目	6.5	45	92
2日目	5.2	37	96
3日目	4.5	23	83
平均	5.4	35	90
C 1日目	8.2	35	142
2日目	7.7	31	202
3日目	9.4	48	217
平均	8.4	38	187
平均的な摂取量*	3.8 <sup>2)</sup>	約 100 <sup>3)</sup>	225 <sup>4)</sup>
食事摂取基準**			
推定平均必要量	-	20	20
推奨量	-	25	25
目安量	3.5	-	-
耐容上限量	11	230	500

\* 文献2) ~4) に記載の数値.

\*\* 食事摂取基準 (2010年版) における30~49歳女性に対する数値.

平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（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

#### 3. 鉄の化学形態の違い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

硫酸第一鉄，クエン酸第二鉄，ヘモグロビン，およびヘモグロビンを酵素加水分解処理して得られた低分子ヘム鉄をラットに投与し，鉄の給源の違いがラットの鉄栄養に及ぼす影響を検討した．肝臓，腎臓，小腸，脾臓，および大腿骨の鉄濃度は，硫酸鉄投与群が顕著に高い値を示した．残りの 3 群間については，有意差は認められなかったが，いずれの臓器においても低分子ヘム鉄投与群が低値を示す傾向があった．ヘモグロビン濃度，ヘマトクリット値，血清鉄濃度については，硫酸鉄投与群が最高値を示し，低分子ヘム鉄投与群が最低値を示した．逆に，血清総鉄結合能と血清不飽和鉄結合能においては，低分子ヘム鉄投与群が最高値，硫酸鉄投与群が最低値を示した．クエン酸鉄投与群とヘモグロビン投与群の間では，血清鉄においてヘモグロビン投与群が高値を示す傾向があったが，いずれも有意差は認められなかった．糞中の鉄濃度より算出した鉄の見かけの吸収率は，硫酸鉄とヘモグロビンが 52～60% だったのに対して，クエン酸鉄と低分子ヘム鉄は 20～26% であり，明らかな差が認められた．鉄サプリメントや鉄補給剤の素材として市販されている低分子ヘム鉄の有効性は無機鉄や未処理のヘモグロビンよりも低いと判断される．

## 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。平成 18 年度国民健康・栄養調査によれば、成人女性の鉄摂取量の中央値は 6.5~7.0 mg/日であり<sup>1)</sup>、食事摂取基準 2010 年版が定める月経のある成人女性の鉄の推定平均必要量である 8.5~9.0 mg/日を大きく下回っている。実際、わが国の成人女性の貧血有病率は 20%を上回っている<sup>2)</sup>。

貧血有病率を低下させるために鉄の摂取を増やすことが必要と考えられる。しかし、鉄濃度の高いレバーや赤身肉の摂取を増やすことは、動物性脂質の摂取を増やすことにつながり、三大栄養素の摂取バランスの観点からは好ましくない。食事鉄の吸収率は平均で約 15%と見積もられているが<sup>3)</sup>、鉄の化学形態や食事中共存成分によって変動することが知られている。このため、食事鉄の吸収に影響を及ぼす要因を明らかにして、鉄の吸収率の高い食品を組み合わせれば、摂取量を増やすことなく、吸収量を増やし鉄栄養状態の改善につながると期待される。

多くの教科書には、食事鉄はヘム鉄と無機鉄に分類され、人間では動物性食品に多いヘム鉄の吸収性が高いと記載されている<sup>4)</sup>。しかし、動物栄養試験で多用されるラットでは、ヘム鉄の無機鉄に対する優位性は確認できない。むしろ、無機鉄が二価の硫酸鉄である場合には、無機鉄がヘム鉄よりも利用性が大きいという報告の方が容易に見いだされる<sup>5)</sup>。このことの原因として、2 つのことが考えられる。1 つ目として、ラットでは、ヘムを分解して無機鉄を遊離させる小腸粘膜中のヘ

ムオキシゲナーゼ活性が著しく低いため、ヘム鉄を十分に利用できないことがあげられる。そして、2 つ目として、動物実験で使用されるヘム鉄標品の品質が劣化していることが考えられる。市販のヘム鉄標品の多くは、家畜の赤血球抽出物を酵素処理後、限外濾過したものであり、ヘモグロビンが低分子化した「低分子ヘム鉄」というべきものであるが、その製造過程においてヘムの構造変化が生じる可能性がある。かりにラットにおけるヘム鉄の無機鉄に対する非優位性の理由に後者が関わっているとすると、「低分子ヘム鉄」を用いた実験の結果はきわめて人為的なものといえ、その解釈には慎重さが要求されることになる。

本研究では、硫酸第一鉄、クエン酸第二鉄、ヘモグロビン、およびヘモグロビンを酵素加水分解処理して得られた低分子ヘム鉄をラットに投与し、鉄の給源の違いがラットの鉄栄養に及ぼす影響を検討した。

## B. 実験方法

### 1. 実験動物と飼料

4 週齢の Wistar 系雄ラット 24 匹を 6 匹ずつ 4 群に分け、それぞれに、鉄を含まないミネラル配合を用いて調製した AIN93G 飼料を基本食として、鉄給源として硫酸第一鉄、クエン酸第二鉄、ヘモグロビン粉末、低分子ヘム鉄粉末をそれぞれ鉄濃度 20 µg/g 添加した飼料を与えて 4 週間飼育した。飼育期間終了後、ネンブタール麻酔下で、血液、肝臓、腎臓、小腸、脾臓、および大腿骨を採取した。また、飼育終了前 4 日間にわたって糞を回収した。なお、ヘモグロビン粉末は ILS 株式会社、低分子ヘム鉄は日本バイオコン株式会社から供与されたもの（いずれもブタ血液由来）を



用いた。それぞれの鉄含有量は、ヘモグロビン粉末が 0.31%，低分子ヘム鉄が 1.6%だった。

## 2. 分析

採取した臓器と糞は濃硝酸を用いて灰化し、フレイム式原子吸光光度計を用いて鉄を定量した。また、全血と血清については、血球計算と血清生化学検査（タンパク質状態、鉄関連、脂質関連、肝機能、および腎機能指標）、を日本医学研究所に委託した。

## C. 結果

表 1 に各群ラットの体重と臓器重量をまとめた。体重については群間の差を認めなかったが、腎臓、および小腸重量においてはヘモグロビン投与群、肝臓においてはヘモグロビン投与群と低分子ヘム鉄投与群が高値を示した。

表 2 に採取した臓器中の鉄濃度をまとめた。いずれの臓器においても、硫酸鉄投与群が顕著に高い鉄濃度を示した。残りの 3 群間については、有意差は認められなかったが、いずれの臓器においても低分子ヘム鉄投与群が低値を示す傾向があった。

表 3 には、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、血清総鉄結合能、および血清不飽和鉄結合能をまとめた。ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度については、硫酸鉄投与群が最高値を示し、低分子ヘム鉄投与群が最低値を示した。逆に、血清総鉄結合能と血清不飽和鉄結合能においては、低分子ヘム鉄投与群が最高値、硫酸鉄投与群が最低値を示した。クエン酸鉄投与群とヘモグロビン投与群の間では、血清鉄においてヘモグロビン投与群が高値を示す傾向があったが、いずれも有意差は認めら

れなかった。

糞中の鉄濃度の測定結果、総糞排泄量、飼料摂取量、飼料中鉄濃度を用いて、各群における鉄の見かけの吸収率を算出し、表 4 にまとめた。硫酸鉄とヘモグロビンに含まれる鉄の見かけの吸収率はいずれも 52~60%の範囲にあったのに対して、クエン酸鉄と低分子ヘム鉄に含まれる鉄の見かけの吸収率は 20~26%の範囲であり、明らかな差が認められた。

表 5 に各群の血清脂質関連指標をまとめた。いずれの指標においても、ヘモグロビン投与群が低値を示した。なお、血清タンパク質および肝機能指標については、群間の差をまったく認めなかった。

## D. 考察

鉄の給源が異なる 4 種の飼料でラットを飼育したところ、ヘモグロビン投与群において、血清脂質濃度の低下が認められた。ヘモグロビンタンパク質の消化性が低いため、未消化分が消化管内容物中の脂質成分を吸着し、その吸収を阻害したと考えられる。ヘモグロビン投与群の小腸重量が他群よりも大きかったことと併せると、ヘモグロビンタンパク質は一種の難消化性タンパク質として食物繊維様の作用<sup>6)</sup>をもつといえるだろう。事実、ヘモグロビン投与群の糞は他群よりも軟らかく、かつ臭気も強かった。

低分子ヘム鉄が開発された背景には、このようにヘモグロビンタンパク質の難消化性があるといえる。しかし、表 3 に示した血球と血清鉄関連指標の測定結果は、4 群中で低分子ヘム鉄投与群の鉄栄養状態がもっとも低いことを示していた。ヘモグロビン投与群に比較しても明らかに鉄状態が悪かったと

いうことは、低分子化処理によって、ヘモグロビン中の鉄の利用性が低下したことを意味している。

低分子ヘム鉄は、豚などの家畜血液から遠心分離によって赤血球を回収し、これにプロテアーゼを加えてヘモグロビンのタンパク質部分を加水分解後、限外濾過によって低分子化したものだけを集め、濃縮後、乾燥させたものである。低分子ヘム鉄中の鉄の利用性が低かったことは、このプロセスにおいて、ヘムの変性・劣化が生じていることを意味する。ヘムの溶解性にはタンパク質部分が重要であり、タンパク質からヘムを遊離させると、不溶性になるために利用性が低くなることを指摘する研究者もいる<sup>7)</sup>。たしかに、今回用いた低分子ヘム鉄は水に対して不溶性であった。しかし限外濾過の段階では水溶性であったはずであるから、不溶化の原因は、ヘモグロビンをプロテアーゼ処理したこのではなく、濃縮・乾燥段階にあると考えるのが自然である。この濃縮・乾燥操作は公表されていないが、おそらく噴霧乾燥などの加熱操作が含まれていると推定され、これによってヘムの化学変化と不溶化が生じたと思われる。低分子ヘム鉄については、水溶性をうたうものも市販されていることから、今回用いた不溶性の標品については、鉄の栄養価が低下しており、これを動物実験における鉄の給源、あるいは、サプリメントや貧血治療用鉄補給剤の素材に用いるのは不適切といわざるを得ない。したがって過去の研究において、低分子ヘム鉄を用いているものについては、その標品を確認し、再評価する必要があると思われる。

一方、ヘモグロビン中の鉄の利用率は、クエン酸鉄とはほぼ同等であったが、硫酸鉄に

は及ばなかった。今回の 20  $\mu\text{g/g}$  という鉄の投与水準は一般の AIN93G 飼料の鉄濃度 35  $\mu\text{g/g}$ <sup>8)</sup>には及ばない。しかし、AIN93G に含有されている鉄はクエン酸鉄であること、および AIN93G 飼料は微量栄養素を十二分に含有するように設計されていることを考えると、硫酸鉄で 20  $\mu\text{g/g}$  という鉄の投与水準はラットにおいては十分な量であると判断する。ゆえに、硫酸鉄由来の鉄の利用性が最大であったのは、鉄投与水準が低くて無機鉄(二価鉄)の吸収性が通常よりも高まっていたということではなく、ラットではもともとヘム鉄よりも二価鉄の方が利用性が高いことを示すといえる。

ラットにおいて、ヘム鉄の利用性が低いのは、小腸粘膜においてヘムを加水分解してヘムから鉄を遊離させるヘムオキシゲナーゼの活性がきわめて微弱であることに起因するといわれている。事実、小腸粘膜中のヘムオキシゲナーゼタンパク質を抗体を用いて測定することを試みたが、検出できなかった。

以上述べたように、ラットではヘム鉄の利用性が低いことは明らかである。しかし、糞中鉄排泄を測定して鉄の見かけの吸収率を算定したところ、ヘモグロビン鉄の見かけの吸収率はクエン酸鉄を大幅に上回り、硫酸鉄に匹敵するものであった。一方、臓器や血清の鉄濃度、ヘモグロビン、血清鉄結合能の測定結果は、ヘモグロビン投与群は硫酸鉄投与群に比較して、体内鉄量が少なく、鉄栄養状態が低いというものであった。したがって、ここで算定したヘモグロビン鉄の見かけの吸収率が、鉄の吸収量を反映しているとはいえない。この「糞に出ていないが、吸収もされていない」という矛盾については、盲腸あるいは大腸を内容物も含めて分析していな

いので、これ以上の考察は無理である。今後の検討課題としたい。ただし、かりに盲腸や腸内細菌などが関わっているとすると、鉄が吸収されているわけではないので、ラットにおいてヘム鉄の利用性が二価鉄よりも低いという事実が変わるわけではないことを強調しておきたい。

#### E. 健康危機情報

特記する情報なし

#### F. 研究発表

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

1. 健康・栄養情報研究会編. 国民健康・栄養の現状 - 平成18年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より - . 第一出版, 東京 (2009).
2. Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, Ishida H, Abe S. 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.
3. Food and Agriculture Organization/World

- Health Organization. Requirements of Vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B12 (FAO Food and Nutrition Series No.23). Rome (1988) 33-50.
4. 吉田宗弘. 無機質（ミネラル）の栄養と水の役割. 基礎栄養学 (伏木亨編). 光生館, 東京 (2004) 131-148.
  5. Matsumoto J, Mori N, Doi M, Kishida T, Ebihara K. Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. *J Agric Food Chem* (2003) 51, 4478-82.
  6. Matsuo M. Serum cholesterol reduction by quinoa tempe, Quinoa fermented *Rhizopus oligosporus*, in rats fed with a cholesterol-free diet. *J Hom Econ Jpn* (2005) 56, 791-795.
  7. Martinez-Torres C, Layrisse M. Iron absorption from veal muscle. *Am J Clin Nutr* (1971) 24, 531-40.
  8. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* (1993) 123, 1939-51.

表1 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの体重と器官重量

鉄の給源	体重 (g)	肝臓 (g/100 g 体 重)	腎臓 (g/100 g 体 重)	小腸 (g/100 g 体 重)	脾臓 (g/100 g 体 重)
硫酸鉄	298 ± 9 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.96 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>
クエン酸鉄	277 ± 6 <sup>a</sup>	3.69 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>a</sup>
ヘモグロビ ン	283 ± 4 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>
低分子ヘム 鉄	287 ± 5 <sup>a</sup>	4.26 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められる.

表2 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの臓器中鉄濃度

鉄の給源	肝臓 (μg/g)	腎臓 (μg/g)	小腸 (μg/g)	脾臓 (μg/g)	大腿骨 (μg/g)
硫酸鉄	75.7 ± 5.2 <sup>b</sup>	51.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	10.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	130.1 ± 5.7 <sup>b</sup>	31.3 ± 3.6 <sup>b</sup>
クエン酸鉄	31.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	42.4 ± 4.9 <sup>ab</sup>	8.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	98.3 ± 9.6 <sup>a</sup>	14.7 ± 2.5 <sup>a</sup>
ヘモグロビ ン	29.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	41.6 ± 3.3 <sup>ab</sup>	8.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	84.3 ± 5.2 <sup>a</sup>	15.8 ± 1.4 <sup>a</sup>
低分子ヘム 鉄	25.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	36.4 ± 2.3 <sup>b</sup>	8.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	80.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 0.5 <sup>a</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められる.

表3 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの血球と血清の鉄栄養指標

鉄の給源	ヘモグロビ ン (g/dL)	ヘマト クリット値 (%)	血清鉄 (μg/dL)	血清総 鉄結合能 (μg/dL)	血清不飽和 鉄結合能 (μg/dL)
硫酸鉄	14.4 ± 0.2 <sup>c</sup>	40.9 ± 0.7 <sup>c</sup>	259 ± 8 <sup>c</sup>	577 ± 25 <sup>a</sup>	318 ± 22 <sup>a</sup>
クエン酸鉄	10.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	30.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	97 ± 16 <sup>ab</sup>	737 ± 23 <sup>b</sup>	640 ± 37 <sup>b</sup>
ヘモグロビ ン	11.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	32.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	144 ± 31 <sup>b</sup>	753 ± 33 <sup>bc</sup>	609 ± 55 <sup>b</sup>
低分子ヘム 鉄	7.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	53 ± 5 <sup>a</sup>	901 ± 55 <sup>c</sup>	831 ± 55 <sup>a</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められる.

表4 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの鉄の見かけの吸収率

鉄の給源	鉄の見かけの吸収率 (%)
硫酸鉄	58.3 ± 3.6 <sup>b</sup>
クエン酸鉄	21.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
ヘモグロビン	52.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
低分子ヘム鉄	25.6 ± 0.3 <sup>a</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められる.

表 5 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの血清脂質濃度

鉄の給源	中性脂肪 (mg/dL)	総コレステロール (mg/dL)	総脂質 (mg/dL)
硫酸鉄	39 ± 3 <sup>b</sup>	78 ± 4 <sup>b</sup>	240 ± 9 <sup>b</sup>
クエン酸鉄	26 ± 4 <sup>ab</sup>	65 ± 8 <sup>ab</sup>	191 ± 21 <sup>ab</sup>
ヘモグロビン	21 ± 3 <sup>a</sup>	48 ± 1 <sup>a</sup>	143 ± 5 <sup>a</sup>
低分子ヘム鉄	31 ± 3 <sup>ab</sup>	62 ± 3 <sup>ab</sup>	190 ± 10 <sup>ab</sup>

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められる.

平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（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

#### 4. 若年期および高齢期のビタミン K 栄養の評価ならびに若年期の骨密度に対する ビタミン D および Ca 栄養の相互による影響

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
研究協力者	鎌尾 まや	神戸薬科大学
研究協力者	峯上 卓也	神戸薬科大学
研究協力者	出野 奈穂子	神戸薬科大学

#### 研究要旨

ビタミン K (VK) の不足により、低カルボキシル化プロトロンビン (PIVKA-II) や低カルボキシル化 OC (ucOC) の血中濃度が上昇することが知られている。そのため、血中 PIVKA-II および ucOC 濃度は、ビタミン K の不足マーカーとして利用することができる。昨年度は、若年期の骨における VK 栄養を評価するために新規栄養評価法：曲率解析法を開発し、血中 ucOC 濃度を指標に VK 摂取量のカットオフ値を推定した。この成果をもとに、今年度はこの曲率解析法を高齢者の骨に必要な VK 摂取量の評価に応用した。また、現在の食事摂取基準における VK の目安量は、若年米国人男性 10 人の血液凝固関連指標を用いた研究を根拠として策定されており、日本人の摂取基準策定においては科学的根拠に乏しい。そこで、血中 PIVKA-II 濃度を指標とした血液凝固に必要な VK 摂取量のカットオフ値を算出した。その結果、思春期男女の骨に必要な VK 摂取量は 155～188  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、高齢者では 270  $\mu\text{g}/\text{day}$  と推定された。一方、思春期男女の血液凝固に必要な VK 摂取量は 54～62  $\mu\text{g}/\text{day}$  (約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) と推定された。このことから、血液凝固においては現在の食事摂取基準 (男子：75～80  $\mu\text{g}/\text{day}$ 、女子：60～65  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) の VK 摂取量で充分であるが、骨の健康維持を目的とした場合にはより多くの VK 摂取が必要であり、高齢者は若年者に比べてより多くの VK 摂取が必要と推察された。高齢者については、さらに血中 VK 濃度および血中 ucOC 濃度を用いて曲率解析を行い、VK 不足マーカーおよび臨床骨折予測因子としての血中 ucOC 濃度の意義について検討した。その結果、骨の VK 不足を表す ucOC 濃度のカットオフ値として 4.1～4.4  $\text{ng}/\text{mL}$  が得られた。血中 ucOC 濃度 4.5  $\text{ng}/\text{mL}$  をカットオフ値とし、臨床骨折発生に対する比例ハザード解析、Kaplan-Meier 生存時間解析、ロジ

スティック回帰分析を行った結果、ucOC 濃度 4.5 ng/mL は骨における VK 不足の検出とともに臨床骨折の予測マーカーになり得る可能性が示唆された。

一方、近年、血中 25-ヒドロキシビタミン D (25-OH-D) 濃度の低下とそれに伴う軽度な血中副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度上昇を呈するビタミン D (VD) 不足状態が骨粗鬆症のリスク因子として問題になっている。若年期における最大骨量を維持することが骨粗鬆症予防に重要であるが、我が国では、若年女性の VD 不足を評価するカットオフ値の設定や VD の必要量を策定する為の十分な疫学調査研究がなされていない。また、Ca 摂取量も骨代謝に重要であるものの、我が国で若年女性における両栄養素の栄養状態と骨密度の関係を同時に相互評価した研究はほとんどない。そこで、若年女性の VD および Ca 栄養状態に関する調査ならびに骨密度に対する VD と Ca 栄養の相互による影響について分析した。その結果、目安量 5.5  $\mu$ g/day を満たす割合は 82% と高いものの、目安量以上を摂取する者においても血中 25-OH-D 濃度で不足と判定される対象者が約 62% 存在した。また、血中 25-OH-D 濃度と血中 PTH 濃度の負相関関係から曲率解析法を用いてカットオフ値を評価した結果、20 ng/mL が適当であると判断した。対象者を血中 25-OH-D 濃度 20ng/mL と Ca 摂取量の 4 分位点で 8 群に分類して骨密度を比較した結果、血中 25-OH-D 濃度 20ng/mL 以上かつ Ca 摂取量 649.7 mg/day 以上 (平均約 850 mg/day) を摂取する群において大腿骨近位部骨密度 (Hip BMD) の増加が観察された。また、この群では血中 PTH 濃度が有意に低下し、これが Hip BMD を増加させた理由の一つと考えられた。これらの結果から、若年健常女性の骨密度を高く維持するには、ビタミン D と Ca 栄養を共に高く維持しなければならず、血中 25-OH-D 濃度 20 ng/mL 以上の維持と、Ca 摂取量 850 mg/day 以上の摂取が有効と判断された。



## 1. 若年期および高齢期のビタミンK 栄養の評価

### A. 目的

ビタミンK (VK) は、VK 依存性タンパク質 (VKDP) のグルタミン酸残基を  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸へ変換する酵素の補因子として働く。代表的な VKDP として、血液凝固系にかかわる血液凝固因子第 II, VII, IX および X 因子、骨組織で発現するオステオカルシン (OC) があり、これらは Gla 化されることにより血液凝固や骨形成を促進するように働く。VK が欠乏すると出血などの明確な血液凝固異常の症状があらわれるが、軽度の欠乏、すなわち不足状態では低カルボキシル化プロトロンビン (PIVKA-II) と低カルボキシル化 OC (ucOC) 濃度が上昇するため、これらは VK の不足マーカーとして利用できる。

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のに必要な 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 60~65  $\mu\text{g}/\text{日}$  が目安量として設定されている。この策定値の根拠となる研究は、VK 制限食摂取時の血中フィロキノン(PK)濃度と尿中 PIVKA-II 濃度を回復させるに必要な VK 摂取量を介入試験で確認したものであるが、わずか 10 人の若年米国人男性 (年齢 28.3  $\pm$  3.2 歳) を対象者に検討された研究である<sup>1)</sup>。Suttie らが報告したこの研究では、平均体重 72 kg の対象者では 82  $\mu\text{g}/\text{day}$  程度の VK 摂取量 (約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/day) が必要であるとされ、日本人の目安量はこれを根拠として体重換算されている。現在のところ、日本人を対象とした VK 必要量に関する研究はなく、日

本人の摂取基準策定の科学的根拠に乏しいのが現状である。また、上記のように VK 目安量は VK の血液凝固作用を指標として策定されているが、VK 栄養の骨密度増加や骨折予防における役割も重要である<sup>2-4)</sup>。血中の PIVKA-II と 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>5,6)</sup>。このため、昨年度は ucOC 濃度を指標とした VK 摂取量の必要量を評価する新規栄養評価法:曲率解析法を開発し、思春期男女を対象に検討した。その結果、155~188  $\mu\text{g}/\text{日}$  の VK 摂取量が必要であることを確認した。そこで、今年度は同対象者を用いて血中 PIVKA-II 濃度を指標に日本人における血液凝固に必要な VK 摂取量を評価した。また、われわれは OC の Gla 化に必要な血中 VK 濃度が加齢と共に高くなることを報告した<sup>7)</sup> が、これに伴って高齢者では若年者より多くの VK 摂取量を必要とする可能性が示唆される。そこで、今回、高齢者の VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の調査を行い、曲率解析法により骨に必要な VK 摂取量を算出した。

一方、骨における VK 不足マーカーである ucOC の血中濃度は、それ自身が骨折の予測マーカーとなり得る可能性が示唆されている。そこで、高齢者を対象に臨床骨折 (長管骨骨折と症状を伴う脊椎骨折) の発生を endpoint として、観察開始時腰椎骨密度、既存骨折、血中 ucOC 濃度、血中 VK 濃度 (n = 190)、体格等との関連を検討した。

### B. 方法

<対象者>

若年期: 中学 1 年 (12~13 歳)、高校 3 年

(17~18歳)の男女および青年期女性(19~29歳)のうち特定の疾患をもたない健康者1,199人を対象とした。対象者の内訳は、中学1年男子166人女子176人、高校3年男子185人女子217人、青年期女性455人である。高齢期：VK摂取量のカットオフ値の評価は、通院閉経後女性182人(平均年齢65.5 ± 9.8歳)を対象とした。一方、VK不足マーカーおよび臨床骨折予測因子としての血中ucOC濃度の意義に関する検討では、平均年齢64.4 ± 9.4歳の閉経後通院女性436人を対象とした。いずれも、ワルファリン、VK製剤、ビスフォスフォネート製剤、ステロイド、女性ホルモン、その他、骨代謝およびVK栄養に関連する薬剤を服用するものは除外した。

#### <測定項目>

VK摂取量：思春期男女および高齢期女性については上西らが報告した食事摂取頻度調査票(food frequency questionnaire：FFQ)<sup>8)</sup>を用い、青年期女性は佐々木らが報告した食事歴法質問票(diet history questionnaire：DHQ)<sup>9)</sup>を用いて算出した。両法ともに過去1ヶ月間の食習慣をアンケートによって調べ、栄養素や食品群別摂取量を換算するものである。

血中PIVKA-II濃度：全自動電気化学発光免疫測定装置ピコルミ III [三光純薬社製]を用いて測定した。本法は、抗PIVKA-II抗体結合ビーズを固相とし、電気的変化で発光するルテニウム(Ru)錯体を標識した抗プロトンビポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ法による電気化学発光免疫測定法(Electro-chemiluminescence immunoassay：ECLIA)を原理としている<sup>10)</sup>。

血中ucOC濃度：全自動電気化学発光免疫測定装置ピコルミ III [三光純薬社製]を用い

て測定した。本法は、抗ucOC抗体結合ビーズを固相とし、電気的変化で発光するRu錯体を標識したRu標識抗OC抗体を用いたサンドイッチ法によるECLIAを原理としている<sup>11)</sup>。

血中VK濃度：LC-APCI/MS/MS法<sup>12)</sup>により、閉経後高齢女性436人の血中PK濃度、メナキノン-7(MK-7)濃度を測定した。

#### <統計解析>

曲率解析法によるカットオフ値の算出<sup>13)</sup>：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+3SD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評価した。

血中ucOC濃度の臨床骨折の予知における意義：曲率解析で求められたVK不足を表す血中ucOC濃度が、臨床骨折の予知に役立つか否かを比例ハザード、生存時間解析、およびロジスティック回帰分析で評価した。

#### C. 結果

曲率解析法によるカットオフ値の算出：若年期の対象者のVK摂取量、血中PIVKA-II濃度および血中ucOC濃度を示す(表1)。VK摂取量の平均値は、全年代ともに食事摂取基準(2010年版)を満たしていた。血中PIVKA-II濃度は、高校3年女子で低いものの、男女ともに年齢に関係した一定の傾向はみられな

かった。血中 ucOC 濃度は男女とも年齢の上昇に伴い、有意に低下した。また、男子の血中 ucOC 濃度は女子よりも有意に高かった。血中 PIVKA-II 濃度と VK 摂取量との関係を表 2 に示す。VK 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度は、高校 3 年生男女では有意に負相関したが、中学 1 年生男女および青年期女性において有意な関係を示さなかった。表 1 より、この時期の血中 PIVKA-II 濃度は年齢に応じた変化がほとんどないため、男子では中学 1 年生と高校 3 年生を併せた集団、女子では中学 1 年生と高校 3 年生を併せた集団、およびそれに青年期女性を加えた集団を設定し相関関係を調べた。その結果、いずれにおいても有意な負相関関係が認められた。次に、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度の関係を示す (表 3)。VK 摂取量と血中 ucOC 濃度は、いずれの年齢グループにおいても有意な負相関関係を示した。VK 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度に有意な相関関係のあったグループに対して得られた回帰式を曲率解析法に適用し、血中 PIVKA-II 濃度を指標とする VK 摂取量のカットオフ値を算出した (図 1, 表 4)。その結果、VK 摂取量のカットオフ値は 52~62  $\mu\text{g}/\text{day}$  となった。同様の方法で血中 ucOC 濃度を指標とする VK 摂取量のカットオフ値を算出した結果、153~221  $\mu\text{g}/\text{day}$  となった (図 2, 表 5)。さらに、高齢期女性の血中 ucOC 濃度と VK 摂取量について同様の検討を加えた (図 3, 表 6)。高齢期女性の VK 摂取量と血中 ucOC 濃度は有意な負相関関係を示し、この関係から求められた VK 摂取量のカットオフ値は 269  $\mu\text{g}/\text{day}$  であった。

血中 ucOC 濃度の臨床骨折の予知における意義：対象者の背景データを表 7 に示す。臨床骨折患者の年齢、血中 ucOC 濃度は非骨折

者に比べて有意に高く、観察開始時の  $L_{2-4}$  BMD および血中フィロキノン (PK) 濃度は有意に低いことを確認した。次に、臨床骨折に対する独立影響因子を検討するために年齢、血中 ucOC 濃度、 $L_{2-4}$  BMD を予測因子として重回帰分析を行った結果、血中 ucOC 濃度は臨床骨折に対する独立影響因子として検出された (表 8)。次に、血中 VK (PK および MK-7) 濃度と血中 ucOC 濃度に有意な負の相関関係が認められたことより、両者の関係を示す回帰式をもとに曲率解析法を用いて血中 ucOC 濃度のカットオフ値を求めた結果、血中 PK 濃度、MK-7 濃度、PK + MK-7 濃度と血中 ucOC 濃度の関係から求められる VK 不足を表す血中 ucOC 濃度のカットオフ値は 4.1~4.4  $\text{ng}/\text{mL}$  と推定された (表 9)。この結果を考慮して、血清 ucOC 濃度 4.5  $\text{ng}/\text{mL}$  を VK 不足のカットオフ値と設定し、4.5  $\text{ng}/\text{mL}$  以上の H-ucOC 群とそれ以下の L-ucOC 群で臨床骨折発生率を比較した。その結果、H-ucOC 群と L-ucOC 群の骨折発生率はそれぞれ 22.9%、13.1%であり、骨折発生における H-ucOC 群の相対危険度は 1.75 (95% CI, 1.147-2.670) であった。また、H-ucOC 群の年齢は L-ucOC 群よりも有意に高いため、年齢調整後の相対危険度を算出したところ、1.74 (95% CI: 1.655-1.833) となり、やはり H-ucOC 群の骨折リスクは有意に高いことを確認した。次に、イベント発生時間を考慮し、血中 ucOC 濃度 (L 群, H 群)、年齢、腰椎骨密度、既存骨折を予測因子とした比例ハザード解析を行った結果、H-ucOC 群では有意に臨床骨折発生リスクが高まることが確認された ( $p = 0.0188$ )。Kaplan-Meier 生存時間解析では、Logrank 検定 ( $p = 0.0033$ ) および Wilcoxon 検定 ( $p = 0.0116$ ) のいずれにおい

でも有意差が認められた(図4)。このことから、血中 ucOC 濃度 4.5 ng/mL は比較的短期から長期に渡っての骨折発生の予測因子となりえると判断された。また、ロジスティック回帰分析を行い、集団の骨折発生率が25%に到達すると予想される年齢を推定した結果、L-ucOC群では80.2歳であるのに対して、H-ucOC群では69.1歳となった。

#### D. 考察

対象者の平均 VK 摂取量は、197～271 $\mu$ g/day であり、日本人の食事摂取基準(2010年版)の60～75 $\mu$ g/day を満たしていた。VK不足の指標となる血中 PIVKA-II 濃度を調べた結果、高校3年女子では低いものの、年齢による大きな差はみられなかった。そこで、次に曲率解析法を用いて血中 PIVKA-II 濃度を VK 不足指標としてカットオフ値を検討した結果、52～62 $\mu$ g/day が得られ、日本人の食事摂取基準(2010年版)のVK目安量よりもやや低かった。また、この値を体重換算すると、約1 $\mu$ g/kg/day となり、Suttieらが報告した若年米国人男性の介入試験の結果<sup>1)</sup>とほぼ一致するものであった。このことから、食事摂取基準の策定値は血液凝固に関しては十分な量であることが示唆された。一方、血中 ucOC 濃度を指標とした場合のカットオフ値は思春期で153～188 $\mu$ g/day であり、青年期女性では221 $\mu$ g/day とやや高い結果となった。さらに、高齢女性では270 $\mu$ g/day とさらに高い摂取量が得られ加齢と共に骨におけるVK必要量が増す可能性が考えられた。また、これらの値は、血中 PIVKA-II 濃度を指標とするよりも高値であった。高齢者の骨折を指標とした疫学研究から、骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン

(2006年版)では、骨粗鬆症治療のVK摂取量を250～300 $\mu$ g/dayとし、また血中 ucOC 濃度を指標としたVK制限食によるVK不足からの回復には、450 $\mu$ g/day以上必要であることが報告されている<sup>14)</sup>。Boothらは、Framingham Osteoporosis Study のコホート研究において平均254 $\mu$ g/dayのVK摂取群の骨折リスクは、平均56 $\mu$ g/dayのVK摂取群に比べて約1/3に有意に低くなることを報告しており<sup>15)</sup>、今回の高齢者のカットオフ値もこれに近似する結果となった。これらの結果は、骨に必要なVK摂取量は血液凝固に必要な量よりも多く、思春期から若年期で約200 $\mu$ g/day、高齢期では250～300 $\mu$ g/day程度の摂取が必要であることを示唆する結果であった。一方、VK不足を表す血中 ucOC 濃度が高齢者の臨床骨折を予測できるか否かを検討した。VK不足を表す血中 ucOC 濃度は4.1～4.4 ng/mLと推定されたことから、これらを包括するucOCのカットオフ値として4.5 ng/mLと設定し、前向き研究により検討した結果、年齢補正による相対危険度、比例ハザード、生存時間解析、およびロジスティック回帰分析いずれにおいても血中 ucOC 濃度4.5 ng/mL以上の対象者は臨床骨折のリスクが高いことが示された。先のVK摂取量のカットオフ値を求めた高齢期女性の対象集団において、VK摂取量のカットオフ値270 $\mu$ g/dayを摂取したときの血中 ucOC 濃度を逆算したところ、4.1 ng/mLが得られ、血中濃度から推定されたucOC濃度とほぼ一致した。これらのことから、臨床骨折予防においても270 $\mu$ g/day以上のVK摂取量が必要であることが示唆された。