

4. Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22:477–501
5. Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, Ettinger B (1998) Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 339:733–738
6. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, Wong JB (2004) Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. *JAMA* 291:1999–2006
7. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, Gao P, Cantor T, Forette F, Baulieu EE (2001) Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3086–3090
8. Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Wilske J, Lappas G, Rosén T, Lindstedt G, Lundberg PA, Bengtsson BA (1995) Sunlight increases serum 25(OH) vitamin D concentration whereas 1, 25(OH)2D3 is unaffected. Results from a general population study in Goteborg, Sweden (The WHO MONICA Project). *Eur J Clin Nutr* 49:400–407
9. van Dam RM, Snijder MB, Dekker JM, Stehouwer CD, Bouter LM (2007) Potentially modifiable determinants of vitamin D status in an older population in the Netherlands: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 85:755–761
10. Hollis BW (2005) Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135:317–322
11. Nakamura K, Nashimoto M, Hori Y, Yamamoto M (2000) Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and related dietary factors in peri- and postmenopausal Japanese women. *Am J Clin Nutr* 71:1161–1165
12. Nakamura K, Nashimoto M, Matsuyama S, Yamamoto M (2001) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in young adult Japanese women: a cross sectional study. *Nutrition* 17:921–925
13. Nakamura K, Nashimoto M, Tsuchiya Y, Obata A, Miyamishi K, Yamamoto M (2001) Vitamin D insufficiency in Japanese female college students: a preliminary report. *Int J Vitam Nutr Res* 71:302–305
14. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN (2005) Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr* 135:310–316
15. Miyabara Y, Onoe Y, Harada A, Kuroda T, Sasaki S, Ohta H (2007) Effect of physical activity and nutrition on bone mineral density in young Japanese women. *J Bone Miner Metab* 25:414–418
16. Roth HJ, Zahn I, Altkier R, Schmidt H (2001) Validation of the first automated chemiluminescence protein-binding assay for the detection of 25-hydroxycalciferol. *Clin Lab* 47:365–367
17. Sasaki S, Yanagibori R, Amano K (1998) Self-administered diet history questionnaire developed for health education: a relative validation of the test-version by comparison with 3-day diet record in women. *J Epidemiol* 8:203–215
18. Science and Technology Agency (2000) Standard tables of food composition in Japan, 5th edn. Printing Bureau, Ministry of Finance, Tokyo, Japan (in Japanese)
19. Sasaki S, Ushio F, Amano K, Morihara M, Todoriki O, Uehara Y, Toyooka E (2000) Serum biomarker-based validation of a self-administered diet history questionnaire for Japanese subjects. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 46:285–296
20. Ainsworth B, Haskell W, Leon A, Jacobs DR Jr, Montoye HJ, Sallis JF, Paffenbarger RS Jr (1993) Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sports Exerc* 25:71–80
21. Ainsworth B, Haskell W, Whitt M, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS. (2000) Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 32(suppl): S498–S516
22. Kumahara H, Schutz Y, Ayabe M, Yoshioka M, Yoshitake Y, Shiindo M, Ishii K, Tanaka H (2004) The use of uniaxial accelerometry for the assessment of physical-activity-related energy expenditure: a validation study against whole-body indirect calorimetry. *Br J Nutr* 91:235–243
23. Willett AM (2005) Vitamin D status and its relationship with parathyroid hormone and bone mineral status in older adolescents. *Proc Nutr Soc* 64:193–203
24. Holick MF (2003) Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res* 164:3–28
25. Holick MF (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79:362–371
26. Omdahl JL, Garry PJ, Hunsaker LA, Hunt WC, Goodwin JS (1982) Nutritional status in a healthy elderly population: vitamin D. *Am J Clin Nutr* 36:1225–1233
27. Parfitt AM, Gallagher JC, Heaney RP, Johnston CC, Neer R, Whedon GD (1982) Vitamin D and bone health in the elderly. *Am J Clin Nutr* 36:1014–1031
28. Outila TA, Karkkainen MU, Lamberg-Allardt CJ (2001) Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density. *Am J Clin Nutr* 74:206–210
29. Lehtonen-Veromaa MK, Mottonen TT, Nuotio IO, Irtala KM, Leino AE, Viikari JS (2002) Vitamin D and attainment of peak bone mass among peripubertal Finnish girls: a 3-y prospective study. *Am J Clin Nutr* 76:1446–1453
30. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T (2005) Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, May 1;77:3001–3007

特集「ビタミンと高齢者」[II]†

総説

ビタミンDと骨粗鬆症

神戸薬科大学衛生化学研究室*

津川 尚子, 岡野登志夫

Vitamins (Japan), 83 (12), 651-658 (2009)

Vitamin D and Osteoporosis

Naoko Tsugawa, Toshio Okano

Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University,
1-19-1, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan

Vitamin D plays an important role in regulation of calcium homeostasis and bone metabolism. Among vitamin D metabolites, serum 25-hydroxyvitamin D (25-D) concentration is a best indicator to assess the vitamin D status. It is known that a mild decrease of serum 25-D concentration (vitamin D insufficiency) leads to secondary hyperparathyroidism, which has a negative effect on bone metabolism in the elderly. Therefore, vitamin D insufficiency is thought to be one of the risk factors of osteoporosis. Vitamin D insufficiency is commonly observed in the world. In Japan, we have also confirmed that around half of elderly women were in vitamin D insufficient. Recently, several meta-analysis about vitamin D supplementation to prevent fracture and bone loss in elderly people have been reported. In the present review, current epidemiological studies about vitamin D status and prevention of osteoporosis, and requirement of vitamin D to prevent osteoporosis would be discussed.

Key words: vitamin D, 25-hydroxyvitamin D, osteoporosis, insufficiency, fracture

(Received June 19, 2009)

はじめに

我が国において、人口の高齢化に伴う加齢性疾患の増加が深刻な社会問題となっている。その中でも骨粗鬆症による骨折は寝たきり原因の第2位に挙げられている。平成17年度の国民医療費約33兆円のうち大腿骨頸部骨折・椎体骨骨折の治療に関わる医療・介護総費用は約1兆円と推定され¹⁾、骨折発症に至らない骨粗鬆症治療を加算するとさらに膨大な医療費がかかると推定される。また、骨折に引き続く死亡リスクの相対危険度は、大腿

骨頸部骨折で6.7、椎体骨骨折では8.6にも及ぶとされている²⁾。わが国では、日本の総人口の10%弱、すなわち約1,000万人が骨粗鬆症患者と推定され、骨量減少の傾向がある骨粗鬆症予備軍までを含めると2,000万人に達すると考えられる。これらの事実は、現在のわが国における骨粗鬆症予防が個人的にも社会的にも非常に重要な課題であることを強く示唆している。

WHOならびに国際骨粗鬆症財団(International Osteoporosis Foundation: IOF)が挙げる骨粗鬆症のリスクファクターの一つに、ビタミンD(VD)不足がある。VDの栄養不足は

†特集「ビタミンと高齢者」[I]はビタミン83巻7号に掲載

*〒658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1

世界的にもみても高頻度に発生しており、適正な栄養摂取が望まれている³⁾。最近、骨折予防における大規模なVD介入試験が欧米各国で実施され、その有効性が証明されてきている。しかし、わが国では活性型VDの骨粗鬆症治療評価は数多くなされているものの、天然型ビタミンD (Native VD) の骨粗鬆症予防効果を評価する介入試験はほとんど見当たらず、残念ながら諸外国に立ち遅れている状況といえる。本稿ではVD栄養と骨粗鬆症予防における疫学研究ならびに大規模介入試験に焦点を当ててその効果ならびに必要な量について総説したい。

1. 骨粗鬆症の病態生理とビタミンD

骨粗鬆症は発症要因に応じて幾つかの種類に分類されるが、そのうち閉経後の女性および高齢者によくみられる退行期骨粗鬆症が最も多い。退行期骨粗鬆症は骨の病的老化であり、発症年齢に応じて閉経後早期に発症する閉経後骨粗鬆症と老年期(65歳以上)に発症する老人性骨粗鬆症に分類される。閉経後のエストロゲン分泌低下は急速な骨吸収亢進を惹起し、骨から血中へのCa遊離が増加することにより副甲状腺ホルモン(Parathyroid hormone: PTH)産生・分泌が抑制される。PTHの低下は、腎臓における1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25-D)の産生低下を惹起し、小腸・腎臓におけるカルシウム(Ca)吸収の低下によってCaバランスは負に傾くことになる。このような状況が続くと、血中Ca濃度は次第に低下し、PTH分泌亢進を招き、骨吸収はさらに亢進する。老人性骨粗鬆症患者ではVD不足の頻度が高く、VD不足も骨粗鬆症の危険因子として捉えられている⁴⁾⁵⁾。また、骨折予防に対するCaおよびVD補給効果に関する最近のメタ解析では、骨量減少が著しい高齢者ほどCaやVDの補給効果が高いことが示されていることより⁶⁾、VD栄養の改善が骨粗鬆症予防の重要な対策の一つであると考えられる。

2. ビタミンD不足の指標と血中25-ヒドロキシビタミンD濃度

食事性VDあるいは皮膚で生合成されたVDは肝臓で25-ヒドロキシビタミンD(25-D)となり、血中をVD結合タンパク質と結合した状態で安定に循環する。それゆえ、血中25-D濃度はVDの栄養状態を最も良く反映する栄養指標となる。VDの栄養不足、すなわち血中25-D濃度の低下が骨折や骨密度低下に影響することが報告されている⁷⁾⁸⁾。25-Dは受容体結合能が低く直接的にはCa代謝調節作用をほとんど示さないため、血中25-D濃度低下に伴う他の要因変化が骨代謝に影響すると考えられる。その変化のうち、最も重要なものは血中25-D濃度低下に伴う血中PTH濃度の上昇である⁷⁾⁸⁾。血中25-D濃度とPTH濃度が逆相関する理由については明らかではないが、VD不足の評価基準となる血中25-D濃度は、1)軽度のVD不足:25-50 nmol/L(12-20 ng/mL)、2)中程度のVD不足:

12.5-25 nmol/L(5-12 ng/mL)、3)極度のVD不足(VD欠乏):12.5 nmol/L未満(5 ng/mL)の3段階に分けられる。これらの段階での血中PTH濃度の上昇率は、それぞれ15%未満、15-30%、30%以上とされる⁹⁾。一般に、VDが充足した状態での血中25-D濃度は50 nmol/L(20 ng/mL)とされるが、血中PTH濃度を十分に正常化させるに必要な血中25-D濃度はさらに高く、75-80 nmol/L程度であるとの報告もある¹⁰⁾¹¹⁾。

一方、骨密度低下や骨折予防に必要な血中25-D濃度として80-100 nmol/L(32-40 ng/mL)が必要であるとの報告がある¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。National Health and Nutrition Examination Survey IIIでは大腿骨頸部の骨密度を上昇させるために80 nmol/L(32 ng/mL)以上の25-Dが必要としている¹⁵⁾。2005年の骨折予防に必要な至適血中25-D濃度に関する専門者会議では、50-80 nmol/L(20-32 ng/mL)の範囲であることが発表された¹⁶⁾。また、VDは筋力や転倒と関係があり、血中25-D濃度50 nmol/L(20 ng/mL)以上で体力試験の結果が50 nmol/L未満の人に比べて有意に高いとの報告がある¹⁷⁾。これら一連の報告を受けて、最近、Lipsら¹⁸⁾はアムステルダムコホートで平均年齢75.6±6.6歳の高齢者1,319名(男性643名、女性676名)を対象に、血中PTH濃度、骨代謝マーカー(オステオカルシン、デオキシピリジノリン)、大腿骨頸部骨密度の変化を指標にVD必要量の閾値をLOESS Plot法で評価している。この方法では、各指標が正常範囲に達する血中25-D濃度をVDの必要量とし、骨代謝マーカーを指標とした場合は40 nmol/L(16 ng/mL)、骨密度を指標とした場合は50 nmol/L(20 ng/mL)、身体転倒を指標とした場合は60 nmol/L(24 ng/mL)である。このPTH濃度は、血中25-D濃度が100 nmol/L(40 ng/mL)以上でもプラトーにならないが、50-100 nmol/L(20-40 ng/mL)の範囲で効果的に血中PTH濃度が低下する。このことから、実用的なVD必要量としては血中25-D濃度が50-100 nmol/L(20-40 ng/mL)で維持される量が適量であろうと推察されている。

3. ビタミンD不足の頻度

世界的にも高齢者のVD不足の頻度は高い。アムステルダムコホート1,319名(65-88歳)では、25 nmol/L(10 ng/mL)未満:11.5%、50 nmol/L(20 ng/mL)未満:48.4%、75 nmol/L(30 ng/mL)未満:52.4%、75 nmol/L(30 ng/mL)以上:17.6%であり、一般的なVD不足の指標50 nmol/L(20 ng/mL)を基準に考えるとオランダの高齢者の約半数はVD不足状態にある¹⁵⁾。日本人女性を対象とした我々の疫学研究から得られた徳常な若年者、高齢者の血中25-D濃度分布を表1に示す。血中25-D濃度の中央値はいずれも50 nmol/L(20 ng/mL)前後で、12-14歳を除くといずれの年代においても半数以上はVD不足といえる¹⁹⁾。

一方、骨粗鬆症を原因とする骨折患者にもVD不足が

高頻度にみられる。大腿骨頸部骨折患者の91.6%が50 nmol/L (20 ng/mL)未満である²⁰⁾、あるいは75%が50 nmol/L (20 ng/mL)未満、かつ68%が30 nmol/L (12 ng/mL)未満であるという²¹⁾。また、椎体骨骨折患者では、39%が30 nmol/L (12 ng/mL)未満であった⁹⁾。血中25-D濃度が25 nmol/L (12 ng/mL)未満のVD不足の頻度は、男性に比べて女性のほうが高い²²⁾ため、女性においては特にVD栄養に注意する必要がある。我々の調査では、施設入居高齢者の血中25-D濃度は特に低く平均12 ng/mL程度であった²³⁾。この対象者に、2005年版食事摂取基準目安量である5 µg/dのVD(実際には食事からの摂取量7.3 µg/dと併せて12.3 µg/dを摂取)と200 mg/dのCaを30日連日補給しても、血中25-D濃度は14.7 ng/mL程度までしか上昇しなかった。また、脆弱性骨折と判断される骨折直後の高齢女性患者の血中25-D濃度を調べたところ、非骨折対照者(n=35)が18.6±6.3 ng/mLであったのに対し、骨折直後の患者(n=72)では9.1±4.6 ng/mLで、全員が50 nmol/L (20 ng/mL)未満であった(p<0.0001)²⁴⁾。

4. ビタミンD介入試験のメタ解析

VD補給が骨折予防に有効であるか否かについては、ビタミンD単独で効果があるとするもの、VDとCaの併用でしか効果がないとするものなど様々な報告がある。

Tangら⁶⁾は、50歳以上を対象にCa単独あるいはCaとVD併用による骨量減少予防効果あるいは骨折予防効果をメタ解析した。この解析では、29の無作為試験(合計n=63,897)を対象としており、そのうち13試験がCa+VD併用試験である。また、この解析にはVD単独服用試験は含まれていない。Ca補給量は200-1,600 mg/dであり、主として1000 mg/dが多くみられる。一方、Caと併用するVD補給量は200-800 IU/dまでの範囲であった。全体を通して、CaあるいはCa+VD補給は骨量減少を有意に低下させ、特に80%以上のコンプライアンスを示す研究を対象とした場合には骨折の相対危険度(Relative risk:

RR)は、0.76と有意に低下する。

Ca単独補給あるいはCa+VD併用による骨折リスク低減効果は、試験開始段階のCa摂取量低値(700 mg/d未満)の対象者のほうが高値の対象者よりも有意に高い。日本人の場合、平均Ca摂取量は500-600 mg/d前後で700 mg/d未満の割合は75%にも上ることから、日本人にとってのCa、VD補給の重要性を再認識させられる結果といえる。一方、血中25-D濃度低値(<25 nmol/L (10 ng/mL))の対象者に対するリスク低減効果はRR=0.86であり、25 nmol/L以上の対象者のRR=0.94に比べて高い効果を示す傾向がみられたが、有意な差を得るには至らなかった(p=0.06)。

Ca補給量1,200 mg/d以上(RR=0.8)の対象者は、それ未満の補給量(RR=0.94)の対象者に比べて効果が有意に高い(p=0.006)。また、VD補給量800 IU/d以上(RR=0.84)の対象者は、800 IU/d未満(RR=0.87)の対象者に比べてリスク低減の差は僅かであるものの有意に効果が高い(p=0.03)。一方、Ca単独補給とCa+VD併用補給における骨折リスク低減効果を比較したところ、Ca単独ではRR=0.9、Ca+VD併用ではRR=0.87となり、VDを併用すると僅かにリスクは低減するもののその差は有意ではなかった(p=0.63)。このことから、彼らはCa補給に加えたVDの併用には効果がないと結論付けている。また、Chochrane libraryレビューにおいても同様にVD単独補給は骨折予防効果を期待できないことが報告されている²⁵⁾。しかし、これらの報告の結論からVD単独補給の骨折予防効果を否定するにはやや問題が残されているようである。Tangら自身が論文の中で指摘しているように、補給剤のコンプライアンスが高い場合(80%以上でRR=0.76)と低い場合(50-69%でRR=0.92-0.96)では明らかにリスク低減効果が異なる。このことから、Ca単独およびVD併用試験におけるコンプライアンスを詳細に検討すべきであるが、これに関する解析が行われていない。また、VD単独補給に関する試験データが不足して

表1 各年代層における日本人女性の血中25-D濃度の分布

年齢区分	n	血中25-D濃度 (nmol/L) 平均±標準偏差	パーセンタイル										血中25-D濃度が 50 nmol/Lを示す パーセンタイル値	
			0	1	5	10	25	50 (中央値)	75	90	95	99		100
12-14歳	197	55.5±14.9	26	27	36	37	44	55	65	75	84	98	101	39%
15-18歳	521	51.7±17.6	14	21	26	31	39	49	63	76	83	98	106	51%
19-29歳	319	46.5±12.7	8	20	27	32	38	45	54	63	68	79	98	63%
30-49歳	28	45.8±14.9	20	21	22	28	39	42	53	70	73	74	74	68%
50-69歳	244	50.1±13.6	17	23	31	36	42	48	57	67	77	92	97	57%
70歳以上	190	48.8±15.0	16	20	28	32	38	48	57	67	74	91	100	57%

文献¹⁹⁾より引用、一部改変

表2 メタ解析の対象となった無作為化比較試験

番号	試験報告者 (発表年)	対象者数	VD 補給量/日と コンプライアンス (%)	年齢 平均 (SD)	調査期間 (月)	血中 25-D 濃度 (nmol/L)	
						平均 (SD) あるいは平均 (範囲)	服用群 n=測定数*
(1)	Lyons <i>et al</i> (2007)	3,440 (2,724 女性, 716 男性)	D ₃ 800 IU (100,000 IU/4 ヶ月) vs プラセボ, 80%	84 (8)	36	80.1 (5 回服用: 20 ヶ月目) フォ ローアップ時 のみ n=102	54 フォロー アップ時
(2)	Flicker <i>et al</i> (2005)	625 (593 女性, 32 男性)	最初 D ₂ 10,000 IU/週, その後 D ₂ 1000 IU + Ca 600 mg vs プラセボ + Ca 600 mg, 77%	83 (8)	24	ND	ND
(3)	Pfeifer <i>et al</i> (2008)	242 (49% 女性)	D ₃ 800 IU + Ca 1000 mg vs プラセボ + Ca 1000 mg, 80%	77 (4)	12+8 フォロー アップ	55.4 (18.4) → 84.5 (18.0) 12 ヶ月目 n=242	53.8 (18.5) 56.6 (20) 12 ヶ月目
(4)	Trivedi <i>et al</i> (2003)	2,686 (2,037 男性, 649 女性)	D ₃ 800 IU (D ₃ 100,000 IU/4 ヶ月) vs プラセボ, 80%	75 (5)	60	74.3 (20.7) 48 ヶ月目 フォローアップ 時のみ n=238	53.4 (21.1) 48 ヶ月目
(5)	Chapuy <i>et al</i> (2002)	583 女性	D ₃ 800 IU + Ca 1200 mg vs プラセボ, 95%	85 (7)	24	21.3 (13.3) → 77.5 (ND) 24 ヶ月目 (棒グラフから) n=583	22.8 (17.3) → 15 (ND) 24 ヶ月目 (棒グラフから)
(6)	Meyer <i>et al</i> (2002)	1,144 (858 女性, 286 男性)	D ₃ 400 IU (タラ肝油) vs D ₃ 除去後のタラ肝油, 95%	85 (7)	24	47.26 → 64.21 12 ヶ月目 n=65	51 (33) → 46 (20) 12 ヶ月目
(7)	Pfeifer <i>et al</i> (2000)	137 女性	D ₃ 800 IU + Ca 1200 mg vs 1200 mg calcium, 96%	74 (1)	2 (補給)+10 (非補給)	25.7 13.6 → 66.1 33.1 2 ヶ月目 n=137	24.6 (12.1) → 42.9 (33.1) 2 ヶ月目
(8)	Dawson-Hughes <i>et al</i> (1997)	389 (213 女性, 176 男性)	D ₃ 700 IU + Ca 500 mg vs プラセボ, 93%	71 (5)	36	76.5 37.0 → 112 36.8 36 ヶ月目 n=313	72 (33.1) → 71.7 (30.5) 36 ヶ月目
(9)	Lips <i>et al</i> (1996)	2,578 (1916 女性, 662 男性)	D ₃ 400 IU vs プラセボ, 85%	80 (6)	36-41	27 19-36 → 62 52-79) 12 ヶ月目 n=270	26 (19-37) → 23 (17-31) 12 ヶ月目
(10)	Chapuy <i>et al</i> (1994)	2,303 女性	D ₃ 800 IU + Ca 1200 mg vs プラセボ, 83%	84 (6)	36	40 (27.5) → 106 (22.5) 18 ヶ月目 n=52	32.5 (22.5) → 27.5 (17.5) 18 ヶ月目
(11)	Grant <i>et al</i> (2005)	5,292 (4,481 女性, 811 男性)	D ₃ 800 IU + Ca 1000 mg, vs D ₃ 800 IU のみ, 47% (24 ヶ月目)	77 (6)	24 ~ 62 median: 45, IQR: 37-52	38 (16) → 62 (19.5) 12 ヶ月目 n=60	38 (16) → 43.6 (16) 12 ヶ月目
(12)	Jackson <i>et al</i> (2006)	22,860 女性, サブグループ 年齢 > 60	D ₃ 400 IU + Ca 1000 mg vs プラセボ (平均 D 摂取量 365IU), 63%	サブグル ープの推 定年齢 65	84 (17)	ND	ND

* 服用群とコントロール群を併せた測定数を表す

文献²⁶⁾より引用, 一部改変

いることもVD補給効果を評価するためのメタ解析としては信頼性に乏しい。一方、Tangらは高年齢になるほどCaやVD補給の骨折リスク低減効果が高くなることを示しており(50-69歳RR=0.97, 70-79歳RR=0.89, 80歳以上RR=0.76)、高齢者の骨折予防におけるCaやVD栄養補給の重要性が示されていると判断できる。

これらの報告を受けてBischoff-Ferrariら²⁶⁾はVD補給を中心とした骨折予防効果を評価するため、信頼性の低いオープントライアルを除外した12の無作為化比較試験を対象にメタ解析を行った(表2)。対象者は、平均年齢78歳、42,279名(89%が女性)であり、VD補給量は400 IU/dあるいはそれ以下が3試験、482-770 IU/dが9試験であった。VDとともに500-1200 mg/dのカルシウム(Ca)摂取を行った試験が7試験あり、補給期間は12-84ヶ月を対象としている。これら全ての試験を含めて評価する

と、VD非補給に対するVD補給の非椎体骨折のRRは0.86(95% CI, 0.77-0.96)となり、有意な骨折予防効果が認められた。また、Q-testを用いて各試験間の効果を比較すると、VD補給量によって効果に差があることがわかった(p=0.04)。そこで、低用量400 IU/d未満(すべてコレカルシフェロール)の3つの無作為化比較試験(n=9,014)だけの評価すると、RRは1.02(95% CI, 0.92-1.15; Q-test: p=0.64)となり、この用量では非椎体骨折のリスクを軽減しなかった。一方、400 IU/d以上を補給する9つの高用量試験(482-770 IU/d; n=33,265)の総合的なRRは0.80(95% CI, 0.72-0.89; Q-test: p=0.31)となり、この用量では非椎体骨折リスクを20%低減した。また、メタ回帰分析の結果、VD補給(p=0.003)あるいは血中25-D濃度(p=0.04)が高くなるほど非椎体骨折は有意に減少した(図1)。VD+Ca併用群とプラセボ群を比較した4試験

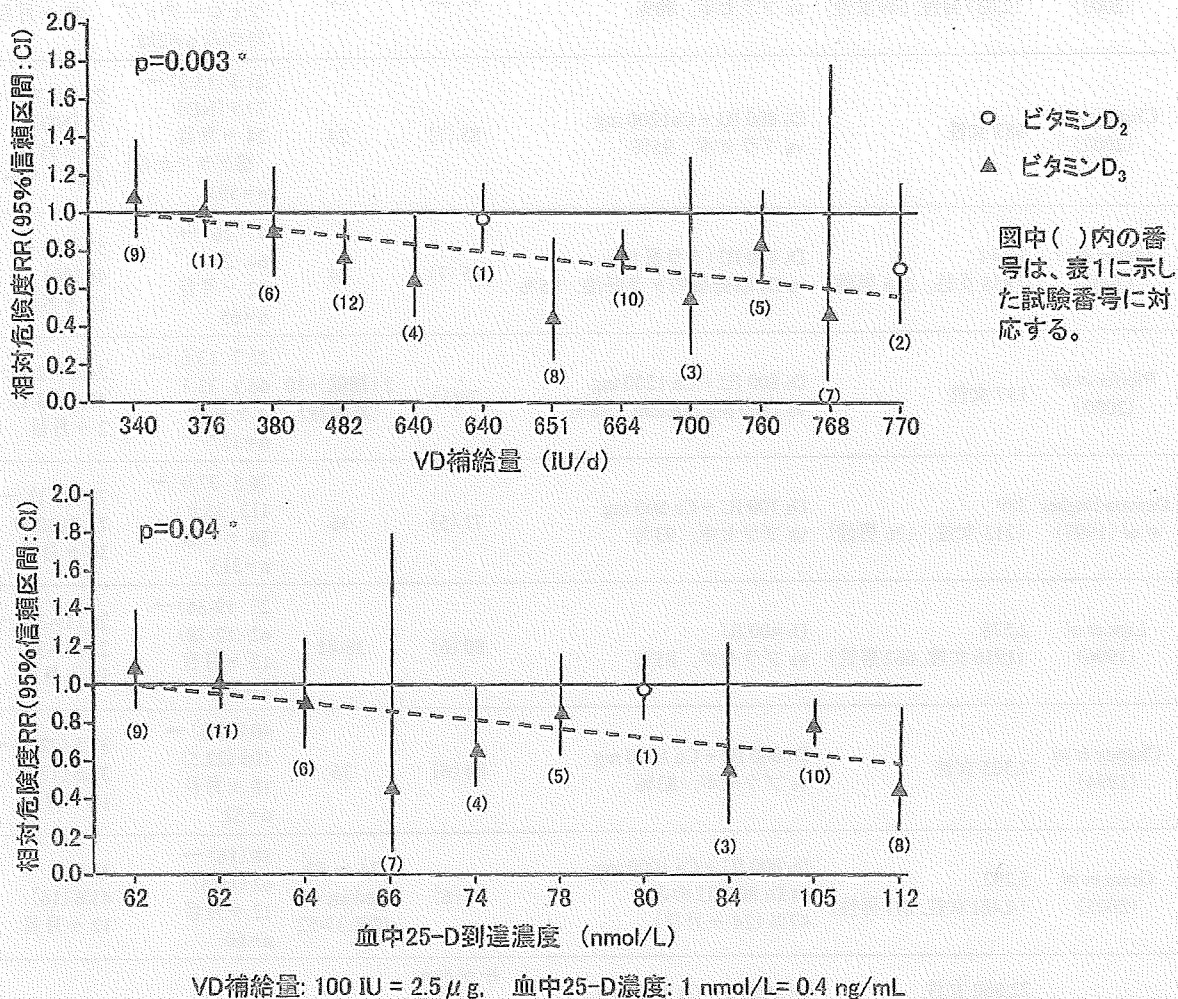


図1. VD補給量あるいは血中25-D到達濃度と非椎体骨折予防効果のメタ回帰分析

^a p値は、メタ回帰分析による相関の有意性を示す。上段、下段ともにp<0.05であることから、VD補給および血中25-D到達濃度の上昇とともに非椎体骨折のリスクが有意に低減することがわかる。

文献²⁶⁾より引用、一部改変

でのリスク低減率は21%であり、VD単独効果を評価した5試験(VD単独群 vs プラセボ群あるいはVD+Ca併用群 vs Ca単独群の比較)でのリスク低減率も先と同等の21%であった。つまりこの結果は、適正なVDを補給すると、Caを追加補給してもVDによる非椎体骨骨折予防効果を増強しないことを示唆している。

一方、大腿骨頸部骨折を対象とした場合、400 IU/d未満ではやはり効果がなかったが、400 IU/d以上(482-770 IU; n=31,872)ではRR=0.82(95% CI. 0.69-0.97, Q-test p=0.18)となり、この用量のVD補給は大腿骨頸部骨折のリスクを18%低減させると推測された。

US Department of Health and Human Services (DHHS) が、2007年夏に閉経後女性あるいは50歳以上の男性を対象に骨折に対するVDの予防効果をメタ解析(二重盲検10試験, オープンスタディ3試験, n=58,712)したところ²⁷⁾、骨折に対するVDのリスク低減効果は認められなかった

(RR 0.90; 95% CI. 0.81-1.02)。これはBoonenら²⁸⁾のメタ解析の結果と同様であるが、これら両メタ解析はオープンスタディを含めたことでVD補給量やコンプライアンスの違いを考慮できず、このことがVD補給効果を“無効”と判定するに至らせた可能性が高い。

Bischoff-Ferrariら²⁹⁾は、2005年にもVDと骨折予防に関するメタ解析を行い、骨折予防に700-800 IU/dのVD補給が必要であることを示唆している。今回の解析では疫学的にハイクオリティな5つの二重盲検試験を加えているが、以前のメタ解析の結果を支持する結果となっている(2005年メタ解析: n=9,820, 2009年メタ解析: n=42,279)。

5. 骨粗鬆症予防に必要なVD摂取量と至適血中25-D濃度

図1に示されるように、VD補給量と血中25-D到達濃度、

表3 骨折予防のための至適血中25-D濃度とその濃度を達成するために必要なVD摂取量

著者	至適血中25-D濃度		至適血中25-D濃度達成に必要なVD摂取量	
	nmol/l	ng/mL	μg/d	IU/d
Lipsら	50	20	10-15	400-600
Holickら	75	30	25	1,000
Heaneyら	80	32	40	1,600
Meunierら	75	30	20	800
Viethら	70	28	25	1,000
Dawson-Hughesら	80	32	25	1,000

文献³⁰⁾より引用, 一部改変

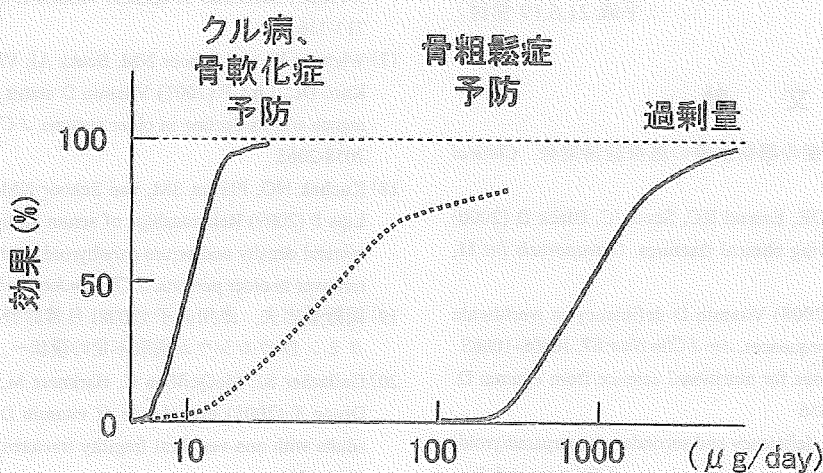


図2. VD摂取量と骨疾患の予防における相対的な用量反応曲線

クル病、骨軟化症の予防に比べて骨粗鬆症予防に必要なVD摂取量が多い、しかし、その量は過剰量に比べると十分に低い。VDによって骨粗鬆症が完全に予防されることはなく、効果は100%に至らない。(10 μg/d=400 IU/d)

文献³⁰⁾より引用, 一部改変

骨折予防効果の関係から、25-Dの血中到達濃度が高いほど有意な予防効果が期待できることがわかる。また、骨折予防における至適血中25-D濃度とその維持に必要なVD補給量を表3に示す¹⁶⁾。これらの補給量は、日本におけるVDの食事摂取基準値(目安量5 μ g/d=200 IU/d)からは随分かけ離れた値である。米国・カナダの食事摂取基準では、51-70歳は10 μ g/d(=400 IU/d)71歳以上は15 μ g/d(=600 IU/d)が設定されている。また、IOFでは骨粗鬆症予防のために50歳までは400-800 IU/dを、50歳以上は800-1000 IU/dを推奨している。つまり、クル病や骨軟化症といったVD欠乏症の予防に必要なVD摂取量と、骨粗鬆症予防(特に骨折予防)に必要なVD摂取量は、図2³⁰⁾に示されるような関係となり、特に高齢者の骨粗鬆症予防にはVD補給によるVD栄養の改善が必要と考えられる。

おわりに

我が国では本稿で述べられたようなVDの無作為化比較試験はほとんど実施されていない。最近、我々はVD不足の施設入居高齢者にVD 800 IU/d, Ca 200 mg/dを1ヶ月間補給するVD介入試験を行ったが³¹⁾、その結果、補給前の血中25-D濃度24.3 \pm 7.0 nmol/L (9.7 \pm 2.8 ng/mL)が補給後48.3 \pm 10.3 nmol/L (19.3 \pm 4.1 ng/mL)に有意に上昇したものの、約半数は50 nmol/L (20 ng/mL)に到達しなかった。この研究では骨折予防効果を評価していないが、少なくともこの補給量では骨折予防には不十分であると思われる。今後、日本人を対象とした長期のVD介入試験を実施し、骨粗鬆症や骨折予防における日本人のVD必要量を明らかにしていくことが重要である。

(平成21.6.19 受付)

文 献

- 1) 原田 敦(2007) 骨粗鬆症の薬物治療の医療経済効果. *Clinical Calcium* 7, 1029-1034
- 2) Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D (2000) Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporosis Int* 11, 556-561
- 3) Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87, 1080S-1086S
- 4) Heaney RP (1999) Lessons for nutritional science from vitamin D. *Am J Clin Nutr* 69, 842-856
- 5) Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22, 477-501
- 6) Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A (2007) Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 370, 657-666
- 7) Arabi A, Baddoura R, Awada H, Salamoun M, Ayoub G, El-Hajj Fuleihan G (2006) Hypovitaminosis D osteopathy: Is it mediated through PTH, lean mass, or is it a direct effect?. *Bone* 39, 268-275
- 8) Sahota O, Mundy ML, San P, Godber IM, Lawson N, Hosking DJ (2004) The relationship between vitamin D and parathyroid hormone: calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone* 35, 312-319
- 9) Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22, 477-501
- 10) Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ (1997) Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 7, 439-443
- 11) Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, Ragi-Eis S, Chandler J (2006) The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med* 260, 245-254
- 12) Holick MF (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80, 1678S-1688S
- 13) Vieth R, Ladak Y, Walfish PG (2003) Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 185-191
- 14) Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzner JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp AE (2005) Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3215-3224
- 15) Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B (2004) Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 116, 634-639
- 16) Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R (2005) Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 16, 713-716
- 17) Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2058-2065
- 18) Kuchuk NO, Pluijm SM, van Schoor NM, Looman CW, Smit JH, Lips P (2009) Relationships of serum 25-hydroxyvitamin D to bone mineral density and serum parathyroid hormone and markers of bone turnover in older persons. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1244-1250
- 19) 岡野登志夫, 津川尚子(2008) 日常診療に潜む骨折危険性～ビタミンD-カルシウム摂取不足の現状～. *治療学* 42, 873-876
- 20) Gallacher SJ, McQuillan C, Harkness M, Finlay F, Gallagher AP, Dixon T (2005) Prevalence of vitamin D inadequacy in Scottish adults with non-vertebral fragility fractures. *Curr Med Res Opin* 21, 1355-1361
- 21) Sahota O, Gaynor K, Harwood RH, Hosking DJ (2001) Hypovitaminosis D and 'functional hypoparathyroidism' -the NoNoF (Nottingham Neck of Femur) study. *Age Ageing* 30, 467-472
- 22) Hirani V, Primates P (2005) Vitamin D concentrations among people aged 65 years and over living in private households and institutions in England: population survey. *Age Ageing* 34, 485-491
- 23) Hirano M, Tsugawa N, Kuwabara A, Fujii M, Kawai N, Kato Y, Ki-

- hara N, Toyoda T, Kishimoto M, Ogawa Y, Kido S, Noike T, Okano T, Tanaka K (2009) Effect of vitamin D supplementation in the institutionalized elderly. *J Bone Miner Metab*, in press
- 24) Nakano T, Tsugawa N, Tanaka K, Kanao M, Kuwabara A, Okano T (2005) Deficiency of Vitamin D and K is highly prevalent in patients with hip fracture. *J Bone and Miner Res* 20, S377
- 25) Avenell A, Gillespie WJ, Gillespie LD, O'Connell DL (2005) Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3, Art. No.: CD000227. DOI: 10.1002/14651858.CD000227.pub2
- 26) Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, Thoma A, Kiel DP, Henschkowski J (2009) Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 169, 551-561
- 27) Agency for Healthcare Research and Quality. Effectiveness and Safety of Vitamin D in Relation to Bone Health, <http://www.ahrq.gov/Clinic/tp/vitadtp.htm>
- 28) Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HA, Vanderschueren D, Haentjens P (2007) Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin d supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1415-1423
- 29) Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B (2005) Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 293, 2257-2264
- 30) Vieth R (2005) The role of vitamin D in the prevention of osteoporosis. *Ann Med* 37, 278-285
- 31) 桑原晶子, 津川尚子, 藤井美野里, 小島暎子, 高橋香, 小村一誠, 加川鈴子, 井上章, 野池利彰, 三原公雄, 木戸詔子, 田中清, 岡野登志夫 (2009) 後期高齢者を対象としたビタミン D₃ 介入によるビタミン D 栄養状態の検討. *ビタミン* 83, S187

思春期のビタミン K 栄養評価

— 曲率解析法を応用した新規評価法の開発 —

津川尚子¹⁾・高瀬友貴¹⁾・峯上卓也¹⁾・土井綾子¹⁾・小池さやか¹⁾
鎌尾まや¹⁾・上西一弘²⁾・石田裕美³⁾・岡野登志夫¹⁾

はじめに

ビタミン K (VK) は、血液凝固因子や骨基質タンパク質であるオステオカルシン (OC) などの VK 依存性タンパク質を Gla 化 (グルタミン酸残基 γ 位のカルボキシル化) する酵素 γ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子としてはたらく。VK 栄養の低下により VK 依存性タンパク質の Gla 化が不十分になると、PIVKA-II や低カルボキシル化 OC (ucOC) の血中濃度が上昇する。血中 ucOC 濃度は VK 摂取量および血中 VK 濃度と逆相関し、高齢者では OC の Gla 化に必要な VK 量は加齢とともに増加する¹⁾。一方、VK 摂取量および血中 VK 濃度の低下は、閉経後女性の大腿骨頸部骨折や大腿骨、椎体の低 BMD のリスクを増大することが報告されており²⁻⁹⁾、われわれも日本人高齢女性において血中 VK 濃度の低下が椎体骨折に関連することを報告した¹⁰⁾。このように高齢者にとって VK 栄養は骨折予防に重要であるが、思春期や若年期の骨における VK 栄養についてはほとんど評価されていないのが現状である。その原因の一つは、VK 作用の特徴としての骨質改善効果を評価するために必要な脆弱性骨折が若年者では評価できないことにある。血中 ucOC 濃度は、成長期、若年期の骨の VK 不足のマーカーとなりうるが、VK 摂取量と ucOC 濃度の関係から VK 不足のカットオフ値を導き出す方法は確立されていない。そこで、血中 ucOC 濃度を指標として思春期の骨における VK 栄養を

評価するために、VK 摂取量と ucOC 濃度間に成立する負相関の対数回帰式に曲率解析を適用した新規栄養評価方法を確立し、VK 必要量の算定を試みた。

1 対象と方法

1) 対象者

12~18 歳 (中学 1 年: 男子 166 名, 女子 176 名, 高校 1 年: 男子 194 名, 女子 247 名, 高校 3 年: 男子 183 名, 女子 217 名) の健常思春期男女 1,183 名。血中 ucOC および PIVKA-II 濃度を電気化学発光免疫法で測定し、VK 摂取量は食事摂取頻度調査により算出した。また、新規栄養評価法の有用性を評価するために、19~29 歳の若年成人女性 316 名の血中 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) 濃度および血中副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度を測定し、ビタミン D (VD) 栄養の評価もあわせて行った。

2) 解析法

VK 摂取量のカットオフ値を評価する方法には、従来 VD 栄養の評価に用いられた 2 群比較法¹¹⁾と曲率を適用した新規栄養評価法の 2 法を用いた。以下、解析方法を説明する。

【2 群比較法】 集団をある VK 摂取量で高摂取群と低摂取群に分け、両群の ucOC 濃度を Student's *t*-test で検定し、平均に最も差が生じる境界値 (*p* 値が最小あるいは *t* 値の絶対値が最大) をカットオフ値とした。

Key words : Vitamin K, Adolescents, Osteocalcin

¹⁾ 神戸薬科大学衛生化学研究室, ²⁾ 女子栄養大学栄養生理学研究室, ³⁾ 女子栄養大学給食・栄養管理栄養学研究室

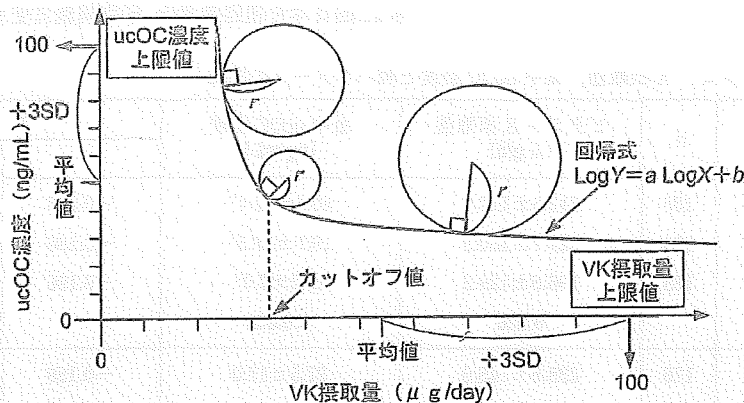


図1 曲率解析法を応用した新規栄養評価法の概念図

【曲率解析法を応用した新規栄養評価法】 曲率とは曲線のカーブの度合いを表すパラメータで、曲線に接する円の半径の逆数 $1/r$ をいう。すなわち、カーブが急であるほど接する円は小さくなり、曲率 $1/r$ は大きくなる。本法では、非線形回帰式の曲率が最大となる点、すなわち VK 栄養の低下による血中 ucOC 濃度上昇の変化率が最大となる点をカットオフ値として評価した。解析の手順は、まず学年・性別ごとに VK 摂取量と血中 ucOC 濃度間の相関関係を確認し、有意な負相関を認められた群につき Passing-Bablok 法を応用して VK 摂取量 (X)、血中 ucOC 濃度 (Y) の回帰式 $\log Y = a \log X + b$ を求めた。また、回帰式を求める際は VK 摂取量と血中 ucOC 濃度のそれぞれの平均値 + 3SD を上限値とし、個々の値の上限値を 100 とする 100 分率に換算して回帰式を求めた。このようにして得られた対数回帰式の曲率を求め、曲率が最大値となる X_1 (VK 摂取量) を求めた。曲率解析法を応用した新規栄養評価法の概念図を図 1 に示す。

2 結 果

1) 対象者背景

思春期男女の VK 摂取量および血中 ucOC 濃度を表 1 に示す。VK 摂取量は約 190~230 $\mu\text{g}/\text{d}$ の範囲にあり、学年・性による特徴的な変化はみられなかった。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、男子の血中 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設定し、骨の VK 栄養を評価することは困難と判断された。また、VK 摂取量と血中 ucOC 濃度は、年齢・性別を問わず有意な負の相関関係を示したことから、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可能と判断した。

2) 2 群比較法

2 群比較法で各学年の VK 摂取量のカットオフ値を評価した。VK 摂取量 100~450 $\mu\text{g}/\text{d}$ までの範囲で、対象者を高摂取群、低摂取群に分けて評価した結果、男子では中学 1 年: 300 $\mu\text{g}/\text{d}$ 、高校 1 年: 100 $\mu\text{g}/\text{d}$ 、高校 3 年: 300 $\mu\text{g}/\text{d}$ となり、女子では中学 1 年: 250 $\mu\text{g}/\text{d}$ 、高校 1 年: 150 $\mu\text{g}/\text{d}$ 、高校 3 年: 400 $\mu\text{g}/\text{d}$ となり、性別・年齢に無関係に評価値は大きくばらついた。

3) 曲率解析法

VK 栄養評価を行うに先立ち、新規栄養評価法の有用性を検証するために、まず若年女性の VD 栄養評価を行った。VD の栄養指標である血中 25(OH)D 濃度の低下が血中 PTH 濃度上昇を惹起するために、両者は負相関関係にあることが知られている。この関係をもとに評価した一般的な VD 不足のカットオフ値は 20ng/mL となっている¹²⁾。今回、19~29 歳の若年女性の VD 不足カットオフ値を曲率解析で評価した結果、20ng/mL に近似

表 1 思春期のビタミン K 摂取量, 血中 ucOC 濃度と両パラメータの相関

		n	ビタミン K 摂取量 ($\mu\text{g}/\text{d}$)	血中 ucOC 濃度 (ng/mL)	相 関	
					r	p
男子	中学 1 年	166	212.5 \pm 122.2	40.4 \pm 22.4 ^a	-0.248	0.001
	高校 1 年	194	227.7 \pm 180.3	19.7 \pm 13.5 ^a	-0.186	0.011
	高校 3 年	183	196.6 \pm 129.2	12.2 \pm 7.0 ^a	-0.196	0.009
	p [#]		0.226	<0.001		
女性	中学 1 年	176	228.5 \pm 145.0	27.5 \pm 17.0	-0.159	0.036
	高校 1 年	247	193.9 \pm 135.4	9.5 \pm 5.5	-0.297	<0.001
	高校 3 年	217	209.7 \pm 128.5	6.5 \pm 3.5	-0.198	0.004
	p [#]		0.036	<0.001		

^a: 男女間の有意差 $p < 0.05$ (Student's *t*-test), [#]: 学年間比較 (ANOVA)

した 19.8ng/mL が得られた。このことより、曲率を応用した新規栄養評価法が有用であると判断し、VK 栄養評価を行った。その結果、男子では中学 1 年: 170 $\mu\text{g}/\text{d}$, 高校 1 年: 178 $\mu\text{g}/\text{d}$, 高校 3 年: 154 $\mu\text{g}/\text{d}$ となり、女子では中学 1 年: 188 $\mu\text{g}/\text{d}$, 高校 1 年: 155 $\mu\text{g}/\text{d}$, 高校 3 年: 162 $\mu\text{g}/\text{d}$ となった。2 群比較法でみられたような性別・年齢によるばらつきはほとんどなく、カットオフ値は約 150~190 $\mu\text{g}/\text{d}$ の範囲に集約した。

さらに、高校 3 年生男子 78 名について血中 PIVKA-II 濃度を指標に同様の解析を行った。VK 摂取量と PIVKA-II 濃度の間には有意な負相関関係が得られた ($r = -0.3132$, $p < 0.01$) ことから曲率解析法に適用した結果、62 $\mu\text{g}/\text{d}$ ($= 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) のカットオフ値が得られた。

3 考 察

これまで評価が困難であった若年者の骨における VK 栄養を評価するために、曲率解析法を応用した新規栄養評価法を開発した。新規栄養評価法を VK 栄養に適用するにあたり、これまでに多数報告されている VD 栄養の解析を行うことで新規栄養評価法の有用性を検証した。若年女性において血中 25(OH)D 濃度と血中 PTH 濃度を指標とした VD 栄養を評価した結果、従来の VD 不足のカットオフ値 20ng/mL に非常に近似する 19.8

ng/mL を得ることができた。また、血液凝固の観点から PIVKA-II 濃度と VK 摂取量を用いて VK 栄養を評価した結果、体重 kg あたり約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ のカットオフ値が得られた。これは、Suttie らの報告にほぼ一致するものであった¹³⁾。血液凝固に必要な VK 摂取量として Suttie らが報告した 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ の摂取量は、現在施行されている「日本人の食事摂取基準 2005 年版」策定の根拠となるものである。彼らは、平均年齢 28.3 \pm 3.2 歳の男性 10 名を対象に、通常の VK 摂取時 (77 \pm 29 $\mu\text{g}/\text{d}$ = 1.04 \pm 0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) と VK 制限食摂取時 (37 \pm 24 $\mu\text{g}/\text{d}$ = 0.50 \pm 0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) の血液凝固時間と尿中 Gla 化プロトロンビン量を比較した。その結果、両指標ともに VK 摂取制限時に有意に低下したが、その後 50 あるいは 500 $\mu\text{g}/\text{d}$ の VK を補給すると通常の VK 摂取時と同程度に回復した。その後、さらに 1mg/d の VK を補給したが血中 VK 濃度は上昇するものの血液凝固時間と尿中 Gla 化プロトロンビン量はそれ以上の有意な変化を示さなかった。このことから、血液凝固に必要な VK 摂取量は約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ であると推定された。しかし、この研究では対象者が少ないことと対象者の VK 摂取量に連続性がないことがやや問題として残される。一方、今回の研究では対象者を増やし、連続的な VK 摂取量と血中 PIVKA-II 濃度の関係から曲率解析を行って評価した結果、や

はり約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ という必要量が得られた。このことは、2005年版の食事摂取基準の根拠が再確認できたと同時に、新規栄養評価法が有用であることを示す結果と考えられた。

新規に開発した栄養評価法は、従来VD栄養評価に用いられた2群比較法に比べて評価値のばらつきが少なく、VK栄養の評価に適していると判断された。VD栄養評価では、これまで2群比較法だけでなく非線形回帰式 $Y = a + b \times \text{EXP}(cX)$ の $3/c$ からPTH濃度が十分低下するプラト一値を求める方法^{14,15}や25(OH)D濃度で分けた2群の回帰式の符号が変化するポイントを求める fit multiple split model¹⁶、などが用いられている。しかし、これらの方法も適用範囲が狭く、血中25(OH)D濃度とPTH濃度に有意な負相関関係が成立する場合でも明確なカットオフ値が求められない場合がある¹⁷。一方、今回開発した曲率解析法は、比較したい2変量間に有意な相関関係があり、対数の非線形回帰式が得られる場合は、VD栄養をはじめ広い適用範囲でカットオフ値を求めることができる。

新規栄養評価法による血中 ucOC 濃度を指標にした骨のVK必要量は約 $150 \sim 190 \mu\text{g}/\text{d}$ と推定され、血液凝固に必要な量よりも3~4倍高い可能性があることが示唆された。骨におけるVK必要量が血液凝固に必要な量よりも多いことを示唆する結果は、Booth¹⁸、Binkleyら¹⁹によっても報告されている。彼らは、血中 ucOC 濃度を十分に低下させるために必要なVK摂取量は約 $500 \mu\text{g}/\text{d}$ であると推定している。今回われわれが推定したカットオフ値はBooth、Binkleyらの報告に比べて低いものであったが、この原因として以前の報告がVK摂取制限後の介入試験であるのに対して、今回は横断的観察研究であることなど研究手法の違いが一因ではないかと考えられた。今回、同一対象者において血中 PIVKA-II と ucOC 濃度を同一の解析法で検討した結果、血液凝固に必要なVK摂取量は食事摂取基準2005年版の策定根拠にほぼ一致する $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ($64 \mu\text{g}/\text{d}$) であったのに対して、骨に対する必要量は $150 \sim 190 \mu\text{g}/\text{d}$ であったことから、骨の健康維持には

2005年版の食事摂取基準(思春期男子: $75 \sim 80 \mu\text{g}/\text{d}$ 、思春期女子: $60 \sim 65 \mu\text{g}/\text{d}$) より多くのVK摂取が必要である可能性が強く示唆された。今後は曲率解析を応用した新規栄養評価法をさまざまな年代に適用し、日本人全体のVK栄養を見直していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr* 2006;83:380-6.
- 2) Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, 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.
- 3) 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.
- 4) Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR, et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003;77:512-6.
- 5) Booth SL, Broe KE, Peterson JW, Cheng DM, Dawson-Hughes B, Gundberg CM, et al. Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4904-9.
- 6) Hart JP, Catterall A, Dodds RA, Klenerman L, Shearer MJ, Bitensky L, et al. Circulating vitamin K₁ levels in fractured neck of femur. *Lancet* 1984;2:283.
- 7) Hart JP, Shearer MJ, Klenerman L, Catterall A, Reeve J, Sambrook PN, et al. Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K₁ in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:1268-9.
- 8) Bitensky L, Hart JP, Catterall A, Hodges SJ, Pilkington MJ, Chayen J. Circulating vitamin K levels in patients with fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70:663-4.
- 9) Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K, Delmas PD. Circulating levels of vitamins K₁ and K₂ decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 1993;8:1241-5.

- 10) Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T. Low plasma phyloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* 2008;26:79-85.
- 11) 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* 2002;31:626-30.
- 12) Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001;22:477-501.
- 13) Suttie JW, Mummah-Schendel LL, Shah DV, Lyle BJ, Greger JL. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am J Clin Nutr* 1988;47:475-80.
- 14) Guillemant J, Taupin P, Le HT, Taright N, Allemandou A, Pérès G, et al. Vitamin D status during puberty in French healthy male adolescents. *Osteoporos Int* 1999;10:222-5.
- 15) Outila TA, Kärkkäinen MU, Lamberg-Allardt CJ. Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density. *Am J Clin Nutr* 2001;74:206-10.
- 16) Harkness L, Cromer B. Low levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with elevated parathyroid hormone in healthy adolescent females. *Osteoporos Int* 2005;16:109-13.
- 17) Hill TR, Cotter AA, Mitchell S, Boreham CA, Dubitzky W, Murray L, et al. Vitamin D status and parathyroid hormone relationship in adolescents and its association with bone health parameters: analysis of the Northern Ireland Young Heart's Project. *Osteoporos Int* 2009;May 13. Epub ahead of print.
- 18) Booth SL, Martini L, Peterson JW, Saltzman E, Dallal GE, Wood RJ. Dietary phyloquinone depletion and repletion in older women. *J Nutr* 2003;133:2565-9.
- 19) Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TN, Engelke JA, Chappell RJ, Suttie JW. A high phyloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1055-60.

A Novel Evaluation Method Using Curvature Analysis for Vitamin K Status in Adolescents

Naoko Tsugawa, *et al.*

Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, *etc.*

Low vitamin K status is associated with low BMD at the hip and spine in pre- and postmenopausal women. We have reported that vitamin K status is associated with vertebral fracture in Japanese postmenopausal and elderly women. However, reports related to the association between vitamin K status and bone health in young people is limited. Fracture incidence is not a useful measure to evaluate vitamin K status for bone health in young people because fracture is rare in youth. Therefore, we attempted to establish a new evaluation method for vitamin K status in adolescents by a curvature analysis using serum concentration of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) as a sensitive marker of vitamin K insufficiency and deficiency in bone and vitamin K intake. A total of 1,183 adolescents (aged 12-13 yrs, 15-16 yrs, and 17-18 yrs) had enrolled in this study. They were defined as normal based on health history and questionnaire. Serum ucOC concentration was measured with the electro chemiluminescence immunoassay. Vitamin K intake was evaluated by food frequency questionnaire. Serum ucOC concentration was significantly and negatively correlated with vitamin K intake in every age and gender, although age and gender differences were observed in ucOC concentration. To evaluate

vitamin K status, curvature analysis was performed in formula of non-linear regression which was obtained from vitamin K intake and ucOC concentration, and vitamin K intake which reached a maximal curvature was evaluated as a cut-off value of vitamin K insufficiency in bone. As the results, 155~188 μ g/day of vitamin K intakes were obtained as cut-off values. Adequate intake of the Dietary Reference Intakes in Japan is 75~80 μ g/d or 60~65 μ g/d in male or female adolescents, respectively, and these values were set with parameters of blood coagulation. Our findings suggest that the requirement of vitamin K in bone would be higher than that in blood coagulation.

Vitamin K Content of Foods and Dietary Vitamin K Intake in Japanese Young Women

Maya KAMAO¹, Yoshitomo SUHARA¹, Naoko TSUGAWA¹, Masako UWANO¹, Noriko YAMAGUCHI¹, Kazuhiro UENISHI², Hiromi ISHIDA³, Satoshi SASAKI⁴ and Toshio OKANO^{1,*}

¹Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658-8558, Japan

²Laboratory of Physiological Nutrition, and ³Laboratory of Administrative Dietetics, Kagawa Nutrition University, Sakado 350-0288, Japan

⁴Nutritional Epidemiology Program, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162-8636, Japan

(Received March 26, 2007)

Summary Several reports indicate an important role for vitamin K in bone health as well as blood coagulation. However, the current Adequate Intakes (AI) might not be sufficient for the maintenance of bone health. To obtain a closer estimate of dietary intake of phylloquinone (PK) and menaquinones (MKs), PK, MK-4 and MK-7 contents in food samples (58 food items) were determined by an improved high-performance liquid chromatography method. Next, we assessed dietary vitamin K intake in young women living in eastern Japan using vitamin K contents measured here and the Standard Tables of Food Composition in Japan. PK was widely distributed in green vegetables and algae, and high amounts were found in spinach and broccoli (raw, 498 and 307 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ wet weight, respectively). Although MK-4 was widely distributed in animal products, overall MK-4 content was lower than PK. MK-7 was observed characteristically in fermented soybean products such as natto (939 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). The mean total vitamin K intake of all subjects (using data from this study and Japanese food composition tables) was about 230 $\mu\text{g}/\text{d}$ and 94% of participants met the AI of vitamin K for women aged 18-29 y in Japan, 60 $\mu\text{g}/\text{d}$. The contributions of PK, MK-4 and MK-7 to total vitamin K intake were 67.7, 7.3 and 24.9%, respectively. PK from vegetables and algae and MK-7 from pulses (including fermented soybean foods) were the major contributors to the total vitamin K intake of young women living in eastern Japan.

Key Words vitamin K, phylloquinone, menaquinone, content of foods, dietary intake

In nature, there are two major forms of vitamin K. Vitamin K₁ (phylloquinone, PK) is produced by plants and algae, and the vitamin K₂ series (menaquinones, MKs) are derived from bacteria and animals. MKs comprise a family of molecules distinguished from PK by unsaturated side-chains of isoprenoid units varying in length from 1 to 14 repeats (1). PK is widely distributed in green leafy vegetables and vegetable oils. In contrast, MKs are found in animal products, including chicken egg yolk, butter and cheeses (2, 3). Fermented soybean products also contain substantial amounts of MK-7 and may be of nutritional importance for populations consuming this class of foods, such as Japanese (4).

The role of vitamin K is a cofactor for an enzyme that converts specific glutamyl residues in several proteins such as plasma clotting factors II (prothrombin), VII, IX and X to γ -carboxyl glutamyl (Gla) residues. These vitamin K-dependent proteins play crucial roles in blood coagulation. In addition, several reports indicate an important role for vitamin K in bone health. Three vitamin K-dependent proteins, osteocalcin, matrix Gla pro-

tein and protein-S have been identified as bone-matrix components produced by osteoblasts (5-7). The administration of vitamin K results in increased bone-mineral density (BMD) and reduced bone resorption in humans (8, 9). In epidemiological studies, low dietary vitamin K intake was associated with an increased incidence of hip fracture (10, 11).

The available data estimated by diet records in Europe and the US suggest that the PK intake of many individuals is failing to meet the current guideline in the UK, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/d and Adequate Intakes (AI) in the US, 120 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adult men and 90 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adult women. It was reported that average values for dietary vitamin K intake was around 60-70 $\mu\text{g}/\text{d}$ in British and American studies (12, 13). In Japan, AI of vitamin K is set at 75 μg for adult men, 60 μg for women aged 18-29 y, and 65 μg for women 30 y and over as a probable sufficient quantity for the maintenance of normal blood clotting. However, recent epidemiological studies indicate that the current guideline based on the maintenance of plasma prothrombin concentration might not be sufficient for the maintenance of bone health (14). In addition, the assessment of dietary intake of both PK and MKs is incomplete. In par-

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: t-okano@kobepharm-u.ac.jp

ticular, current available data on MK content of foods are thought to be insufficient to estimate dietary vitamin K intake in regions where people habitually eat fermented foods. Recently, we have developed an improved assay method for vitamin K in human plasma using two kinds of high-performance liquid chromatography (HPLC) systems optimized for the determination of MK-4 and less polar derivatives, PK and MK-7 (15). We applied this technique to measure PK and MKs in food samples. Dietary intakes of PK, MK-4 and MK-7 in Japanese young women were also estimated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents. PK, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 and MK-10 were kindly provided by Eisai Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The vitamin K analogs, 2-methyl-3-hexadecyl-1,4-naphthoquinone (I.S.-C16) and 2-methyl-3-nonadecyl-1,4-naphthoquinone (I.S.-C19) were synthesized in our laboratory as described previously (15). HPLC-grade solvents and reagents for chemical synthesis were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan).

Measurement of vitamin K content of foods. Several examples of cereals, pulses, vegetables, algae, fish and shellfish, meat, eggs, milk and dairy products, fats and oils, beverages, seasonings, spices and dressings which are eaten on a daily basis in Japan (Table 1) were selected for analysis of vitamin K. They were purchased from retail stores representing the three major food chains in the Kobe area in 2004 and 2005. There were six subsamples weighing 0.1–0.5 kg of each food item, and three of them were prepared to present analysis. For general food items, homogenized edible samples (1–5 g) with internal standard solution (I.S.-C16 and I.S.-C19, 0.5 µg/100 µL ethanol each) and 1 g of sea sand were pestled in 10 mL of acetone three times, filtered, and extracted with 40 mL of diethyl ether twice. After dehydration with Na₂SO₄, the ether layer was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved with 5 mL of hexane, and passed through a Sep-Pak Vac silica cartridge (6 cc, 1 g, Waters, Milford, MA, USA) washed with 20 mL of hexane. Vitamin K was eluted with 10 mL of hexane-diethyl ether (97:3). The eluate was evaporated under reduced pressure, and the residue was dissolved with 1.0–2.5 mL of ethanol. Aliquots (40 µL) were subjected to two kinds of HPLC. For oil and fat products, samples (1.0–2.5 g) with internal standard solution were dissolved with 5 mL of hexane. The mixture was shaken for 5 min before centrifuging at 3,000 rpm for 5 min, and 4.5 mL of the hexane layer was purified by silica-gel cartridge and then subjected to HPLC.

The HPLC system consisted of an LC-10AD_{VP} pump (Shimadzu, Kyoto, Japan), an SIL-10AD_{VP} auto injector (Shimadzu), a CTO-10AD_{VP} column oven (Shimadzu) set to 35°C, and an RF-10A_{XL} fluorescence detector (Shimadzu) set to an excitation wavelength of 320 nm (System 1) or 240 nm (System 2) and an emission wavelength of 430 nm. The data acquired by a C-R8A chromatopac (Shimadzu) were processed by CLASS-

Table 1. Vitamin K contents of several food items.¹

Food item	PK (µg/100 g)	MK-4 (µg/100 g)	MK-7 (µg/100 g)
Cereals			
Rice grain, brown rice	0.3±0.0	N.D.	N.D.
Rice grain, white rice	0.1±0.0	N.D.	N.D.
Cooked rice, brown rice	0.2±0.0	N.D.	N.D.
Cooked rice, white rice	0.01±0.0	N.D.	N.D.
Pulses			
Cotton tofu (hard type)	12±3	0.04±0.1	N.D.
Silken tofu (soft type)	12±3	0.01±0.0	N.D.
Deep-fried bean curd	62±40	N.D.	N.D.
Natto (fermented soybeans)	45±20	2±3	939±753
Hikidwari natto (chopped natto)	23±2	N.D.	827±194
Black bean natto	50±45	N.D.	796±93
Vegetables			
Kidney beans, raw	57±14	N.D.	N.D.
Sugar peas, raw	49±3	N.D.	N.D.
Cabbages, raw	127±20	1±1	N.D.
Cabbages, boiled	180±20	0.4±0.0	N.D.
Cucumber, raw	64±18	1±1	N.D.
Komatuna, raw	319±64	N.D.	N.D.
Komatuna, boiled	425±107	N.D.	N.D.
Perilla, raw	1,007±123	N.D.	N.D.
Garland chrysanthemum, raw	230±39	N.D.	N.D.
Garland chrysanthemum, boiled	627±86	3±3	N.D.
Broccoli, raw	307±121	N.D.	N.D.
Broccoli, boiled	280±100	N.D.	N.D.
Spinach, raw	498±155	N.D.	N.D.
Spinach, boiled	525±72	N.D.	N.D.
Black gram sprouts, raw	20±5	0.6±0.1	N.D.
Black gram sprouts, boiled	22±6	0.4±0.2	N.D.
Lettuce, raw	78±17	N.D.	N.D.
Red leaf lettuce, raw	166±8	N.D.	N.D.
Algae			
Roasted and seasoned laver, dried	413±78	N.D.	N.D.
Hijiki, dried	175±38	N.D.	N.D.
Wakame, seaweed, dried	1,293±231	N.D.	N.D.
Fish and shellfish			
Horse mackerel, raw	0.3±0.3	0.6±0.1	N.D.
Mackerel, raw	1±1	1±0.2	N.D.
Meat			
Beef, chuck, raw	0.6±0.1	15±7	N.D.
Pork, thigh, raw	N.D.	6±2	N.D.
Chicken, thigh, raw	N.D.	27±15	N.D.
Eggs			
Hen's eggs, whole egg, raw	0.6±0.3	7±3	N.D.
Hen's eggs, egg white, raw	N.D.	1±1	N.D.
Hen's eggs, egg yolk, raw	7±3	64±31	N.D.
Milk and dairy products			
Whole milk	1±0.4	2±0.3	N.D.
Cream	1±1	8±3	N.D.
Yogurt, plain (whole milk type)	0.3±0.2	1±0.1	0.1±0.2
Processed cheese	2±1	5±2	0.3±0.1
Fats and oils			
Olive oil	63±11	0.4±0.1	N.D.
Soybean oil	234±48	N.D.	N.D.
Vegetable oil, mixed	164±97	N.D.	1±1
Rapeseed oil	92±25	N.D.	3±2
Beef tallow	1±0.3	4±1	N.D.
Butter	2±1	21±7	N.D.
Margarine	67±68	0.3±0.6	0.1±0.1
Beverages			
Green powdered tea	3,049±195	N.D.	N.D.
Natural leaf tea, tea leaves	1,876±118	N.D.	N.D.
Natural leaf tea, brewed	0.1±0.1	N.D.	N.D.
Black tea, tea leaves	1,036±91	N.D.	N.D.
Black tea, brewed	0.1±0.0	N.D.	N.D.
Seasonings, spices and dressing			
Mayonnaise (whole egg type)	197±17	17±14	N.D.
Mayonnaise (egg yolk type)	189±19	38±32	N.D.
Curry powder	93±23	1±2	6±3

¹ Values are means±SD, n=3. Food items were categorized based on the 5th revised and enlarged edition of the Standard Tables of Food Composition in Japan. N.D., not detectable.

PR10 software (Shimadzu). Separations were performed on a CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6×250 mm, 5 μm, Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan). An RC-10 platinum-reduction column (4.0×15 mm, Irica, Kyoto, Japan) was located between the HPLC column and the fluorescence detector. For determination of MK-4, the mobile phase was a 95:5 (v/v) mixture of methanol and water (System 1). For determination of PK and MK-7, the mobile phase was a 95:5 (v/v) mixture of methanol and ethanol (System 2). The flow-rate was 1.0 mL/min in both systems.

Dietary vitamin K intake assessment. Healthy Japanese young women aged 20–23 y (mean 21.2 y, $n=125$) who were enrolled at Kagawa Nutrition University in Saitama Prefecture, eastern Japan, voluntarily participated in this study during 2003. Informed consent was obtained from each subject. The subjects consumed self-selected foods, and food intake over 3 d including a weekend and two weekdays was recorded by weight. The vitamin K intake was calculated from the vitamin K content of foods measured in this study (Table 1). For the vitamin K content of foods which were not measured objects in this study, the fifth revised and enlarged edition of the Standard Tables of Food Composition in Japan was used (16). In such cases, vitamin K content of foods of plant origin and animal products was calculated as PK and MK-4, respectively. MK-4-equivalent content of MK-7 was used to calculate MK-7 intake in consideration of the difference of molecular weight:

$$\text{MK-4-equivalent content of MK-7} = \frac{C \times 444.7}{649.0}$$

where C is the content of MK-7, 444.7 is the molecular weight of MK-4, and 649.0 is the molecular weight of MK-7.

RESULTS

HPLC analysis of extracts from food samples

First, the extracts from food samples without internal standards were subjected to HPLC. PK and MK-4 were detected in many food items. MK-7 was detected in fermented soybean products mainly. MK-5, MK-6 and MK-8 were detected in several kinds of fermented soybeans, natto, in the range of 2 to 34 μg/100 g. MK-6, MK-8 and MK-9 were observed in processed cheese in the range of 0.5 to 7 μg/100 g. MK-10 was not detected in the food items tested here. Thus, it was decided to measure PK, MK-4 and MK-7 in this study. Figure 1 shows the chromatographic profiles of authentic standards (Fig. 1A and D), extract from egg yolk with or without post-column reduction (Fig. 1B and C) and extract from fermented soybeans, natto, with or without post-column reduction (Fig. 1E and F). MK-4, I.S.-C16, PK, I.S.-C19 and MK-7 were successfully isolated from other substances in foods, and were not detected without post-column reduction. The values obtained by HPLC with fluorescence detection agreed with those obtained by the LC-APCI/MS/MS method using some of the same food samples (17) (data not shown).

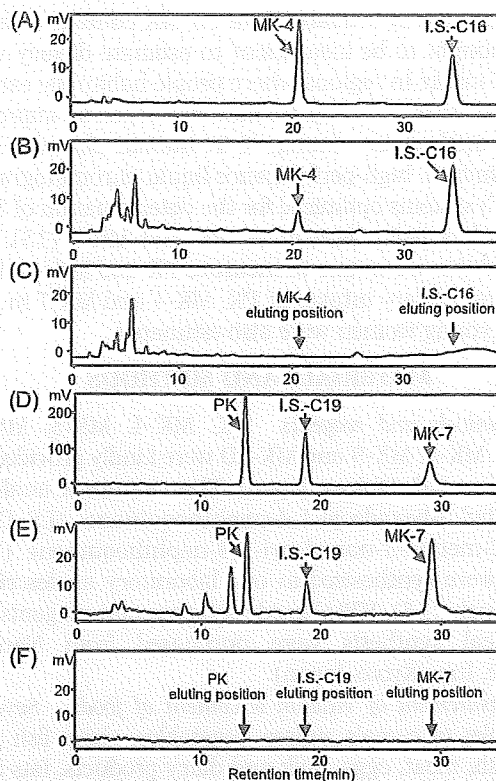


Fig. 1. Chromatograms of authentic standards and extract from egg yolk and fermented soybeans. (A) Authentic standards of MK-4 and I.S.-C16; (B) extract from egg yolk with post-column reduction; (C) extract from egg yolk without post-column reduction; (D) Authentic standards of MK-4, PK, I.S.-C19 and MK-7; (E) extract from fermented soybeans, natto, with post-column reduction; (F) extract from fermented soybeans, natto, without post-column reduction.

PK content of foods

Table 1 shows the PK, MK-4 and MK-7 content of various food items. We subdivided common Japanese foods into 11 categories based on the Standard Tables of Food Composition in Japan. High amounts of PK were found in vegetables such as komatsuna (cruciferous vegetables, *Brassica campestris* var. *peruviridis*, raw, 319 μg/100 g), perilla (raw, 1,007 μg/100 g), garland chrysanthemum (raw, 230 μg/100 g), broccoli (raw, 307 μg/100 g) and spinach (raw, 498 μg/100 g). Boiled cabbage, komatsuna, garland chrysanthemum and spinach contained more PK per 100 g than raw ones. High amounts of PK were also found in algae such as roasted and seasoned laver (dried, 413 μg/100 g), hijiki (*Hizikia fusiform*, dried, 175 μg/100 g) and wakame, seaweed (dried, 1,293 μg/100 g), vegetable fats and oils such as soybean oil (234 μg/100 g) and mixed vegetable oil (164 μg/100 g), and teas such as green powdered tea (3,049 μg/100 g). Although tea leaves of natural leaf tea and black tea contained high amounts of PK (1,876 and 1,036 μg/100 g, respectively), little PK was found in the brew (0.1 μg/100 g). Considerable amounts of PK were also detected in seasonings, spices and dressings such as mayonnaise (whole egg type, 197 μg/100 g).

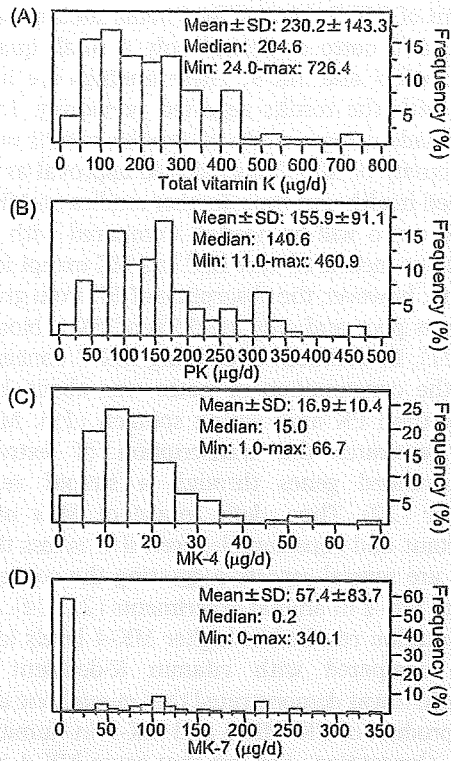


Fig. 2. Distribution of daily intakes of vitamin K and of their derivatives in Japanese young women (n=125). (A) Total vitamin K; (B) PK; (C) MK-4; (D) MK-4-equivalent MK-7.

MK content of foods

MK-4 was widely distributed in fish, meat, eggs, milk and dairy products, and seasonings, spices and dressings; however, overall MK-4 content was lower than PK. Relatively high amounts of MK-4 were found in chicken meat (raw, 27 µg/100 g), the egg yolk of hen's eggs (raw, 64 µg/100 g), and mayonnaise (egg yolk type, 38 µg/100 g). MK-7 was observed characteristically in fermented soybean foods such as natto (939 µg/100 g), Hikiwari natto (chopped natto, 827 µg/100 g), and black soybean natto (796 µg/100 g). The food items measured here had little MK-7 except for natto.

Dietary vitamin K intake assessment

First, we assessed dietary vitamin K intake in young women living in eastern Japan aged 20–23 y (n=125). Mean intake of total vitamin K was estimated at 230.2±143.3 µg/d and 94% of participants met the AI of vitamin K for women aged 18–29 in Japan, 60 µg/d (Fig. 2A). Mean daily intakes of PK, MK-4 and MK-4-equivalent MK-7 were estimated at 155.9±91.1, 16.9±10.4 and 57.4±83.7 µg/d, respectively (Fig. 2B, C and D). The contributions of PK, MK-4 and MK-7 to total vitamin K intake were 67.7, 7.3 and 24.9%, respectively. The percentage contribution of each food group to total vitamin K intake is shown in Fig. 3A. Vegetables and pulses including fermented soybean products were the main sources of vitamin K in young women living in eastern Japan and accounted for 78.3% of total vitamin K intake. The percentage contribution of each food group to PK, MK-4 and MK-7 intakes are shown in Fig.

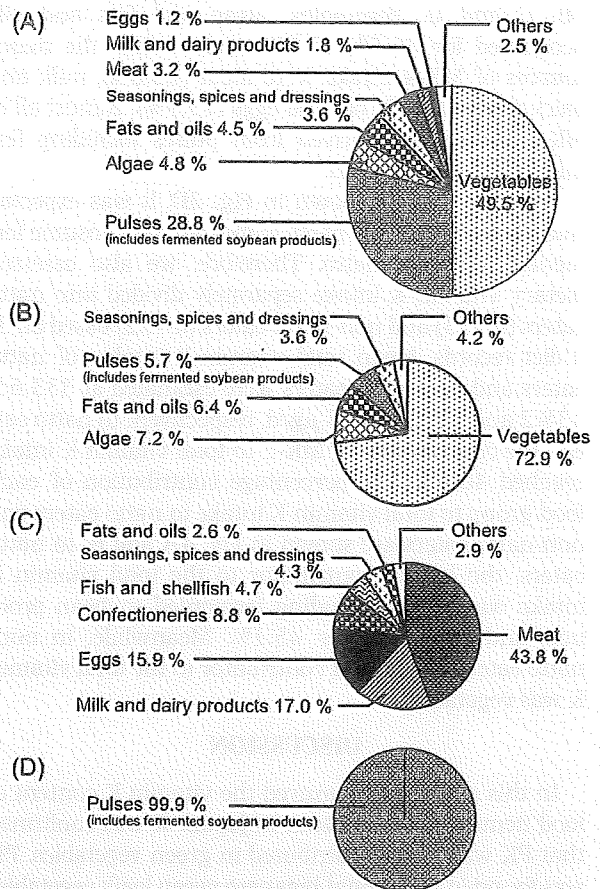


Fig. 3. Percentage contribution of each food group to vitamin K intake in young Japanese women (n=125). (A) Total vitamin K; (B) PK; (C) MK-4; (D) MK-7. Food items were categorized based on the 5th revised and enlarged edition of the Standard Tables of Food Composition in Japan.

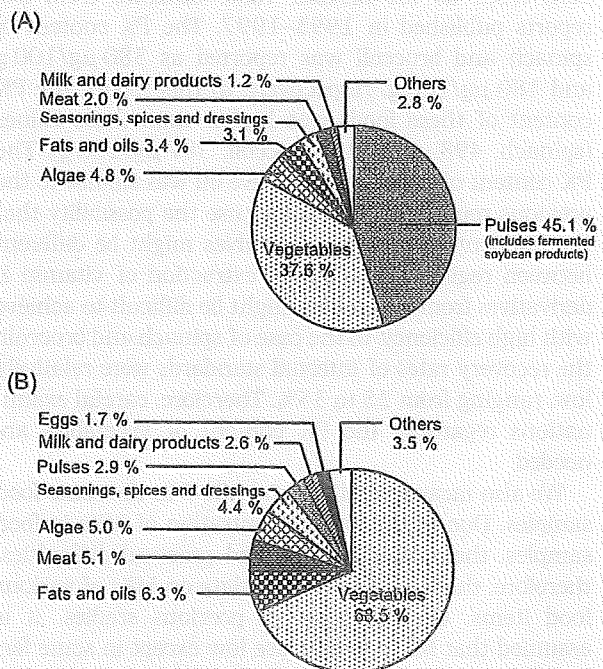


Fig. 4. Comparison of percentage contribution of each food group to total vitamin K intake between natto eaters (n=53) and non-natto eaters (n=72). (A) Natto eaters; (B) non-natto eaters.

3B, C and D. Vegetables, algae and fats and oils accounted for 86.5% of PK intake, while the major sources of MK-4 intake were meat (43.8%), milk and dairy products (17.0%) and eggs (15.9%). Almost all of MK-7 intake was derived from pulses including fermented soybeans, natto.

From the results shown in Fig. 2D, it was expected that about half of the participants did not consume fermented soybean, natto. Therefore, we also assessed dietary vitamin K intake separately divided into natto eaters ($n=53$) and non-natto eaters ($n=72$) based on 3-d diet records. Mean total vitamin K intakes of natto eaters and non-natto eaters were estimated at 333.6 ± 138.2 and 154.1 ± 87.8 $\mu\text{g}/\text{d}$, respectively. In natto eaters, the contribution of MK-7 to total vitamin K intake reached 40.6%. The percentage contribution of each food group to total vitamin K intake in natto eaters and non-natto eaters are shown in Fig. 4A and B. In natto eaters, the largest contributor to the total vitamin K intake was pulses including fermented soybean products and accounted for 45.1%. Meanwhile, in non-natto eaters, the largest contributor to the total vitamin K was vegetables.

DISCUSSION

In this paper, we measured the vitamin K content of food items habitually eaten in Japan. It was confirmed that PK was widely distributed in green vegetables. PK was found in traditional Japanese green leafy vegetables such as komatsuna and garland chrysanthemum as well as spinach and broccoli. High amounts of PK were also found in algae and green powdered tea, which are also frequently consumed in Japan. In a review article, Booth and Suttie (18) reported the PK content of common foods as the median value obtained from five reports published in 1993–1997. The PK content of spinach and broccoli was reported as 380 $\mu\text{g}/100$ g and 180 $\mu\text{g}/100$ g, respectively. In this report, the PK content of these foods was higher than these values (spinach, 498 $\mu\text{g}/100$ g; broccoli, 307 $\mu\text{g}/100$ g). The PK content of cabbages and olive oil was similar to the previous report. These results raise the possibility that the PK content in some vegetables might be different between regions. In addition, extraction of vitamin K derivatives from vegetables might be difficult to achieve with high efficiency. In the case of spinach and broccoli, the recovery rates of internal standards were relatively low, ranging from 25 to 35%. Therefore, careful examinations regarding the PK content of vegetables are needed.

We also measured MK-4 and MK-7 in the same food samples. Due to the low concentration of MKs in food samples, their detection has had practical difficulties; therefore, there are few reliable data on MKs of various food items. On the basis of previous studies, it is assumed that MK contents are low except in some fermented soybean products and cheeses (4, 19). We presented here that many animal products contained a relatively small amount of MK-4 and several forms of fermented soybean foods, natto, contained a high

amount of MK-7. Limited food items such as processed cheese and natto contained only a small quantity of MK-6, MK-8 and MK-9. These findings are in agreement with the results reported previously. In Japan, natto made using a strain of *Bacillus subtilis* with high productivity of MK-7 has received approval as food for specified health use; thus, further studies on MK-7 content of natto will be needed. Compared with PK, the food items measured here had less MK except for MK-7 in natto; however, the absorption of PK from green vegetables is poor and only 10–15% of PK is bioavailable (20, 21). In addition, circulating MK-7 concentration after the consumption of natto was about 10 times higher than PK after eating spinach (19). Moreover, MK-4 activates the transcription of extracellular matrix-related genes through a steroid xenobiotic receptor (22). Thus, daily intake of MKs might be important and considerable, even if it is less than PK. There are several reports suggesting the conversion of PK into MK-4 in animal experiments (23, 24). PK supplementation resulted in higher MK-4 levels in tissues when compared with vitamin K-deficient values. Recently, it was demonstrated that menadione is a catabolic product of PK, MK-4 and MK-7 in humans (25). These observations suggest that some MK-4 in tissue results from the uptake and prenylation of menadione.

Next, we assessed dietary vitamin K intake in young women living in Saitama Prefecture, eastern Japan. The dietary total vitamin K intake calculated based on the vitamin K content of foods measured in this study and the fifth revised and enlarged edition of Standard Tables of Food Composition in Japan was about 230 $\mu\text{g}/\text{d}$. We also demonstrated that vitamin K intake from vegetables and pulses including fermented soybeans accounted for about 80% of total vitamin K intake. The Standard Tables of Food Composition in Japan contains information on all vitamins except biotin. The vitamin K content of each food is listed as the total content of PK and MK-4 except MK-7 in natto. Kimura et al. (26) also carried out a survey of vitamin K intake in Japanese young women and reported that daily intake of vitamin K calculated by food records and the fifth revised edition of the Standard Tables of Food Composition in Japan was 191 ± 156 $\mu\text{g}/\text{d}$. This result is similar to ours and both values met the AI of vitamin K for women aged 18–29 y in Japan, 60 $\mu\text{g}/\text{d}$. By vitamin K derivatives, PK, which accounted for 67.7% of the total vitamin K intake, is considered to be the primary dietary source of vitamin K, as in Europe and the US. The PK intake calculated in this study (155.9 ± 91.1 $\mu\text{g}/\text{d}$) was higher than the average level in previous reports. The mean dietary PK intake estimated for healthy young and middle aged people range from 68 to 111 $\mu\text{g}/\text{d}$ in Europe and the US (13, 27, 28). The MK-4 intake calculated in this study (16.9 ± 10.4 $\mu\text{g}/\text{d}$) was also higher than in the previous report. Geleijnse et al. (29) reported that the mean MK-4 intakes estimated for older Dutch men and women were 7.7 ± 3.4 and 6.3 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{d}$, respectively. MK-4-equivalent MK-7 intake derived from natto consumption was comparable to the AI value, $57.4 \pm$