

elderly in the range of 30–90% in the Western population [1, 2]. The serum 25(OH)D concentration is related to lifestyle factors such as vitamin D intake and sunlight exposure [3, 4], and the circulating 25(OH)D level serves as an indicator of vitamin D sufficiency [5].

In a previous study in a Japanese population, 4.6% of the subjects had low serum 25(OH)D levels in the peri-/postmenopausal period [6], but women in their twenties had significantly lower serum 25(OH)D concentrations than those in their thirties and older [7], and 40.3% of the subjects had vitamin D insufficiency as college students [8]. Additionally, low serum concentrations of 25(OH)D and high serum concentrations of intact PTH were found to predispose young individuals to low bone mineral density (BMD) [9].

It is reported that the primary dietary sources of vitamin D in food are fish and eggs in Japanese [10], but there is no report on the relationship between 25(OH)D and nutrient intake or other lifestyle factors in Japanese women.

The aim of this study was to clarify the relationship between 25(OH)D concentrations and lifestyle factors, such as nutrient intake, physical activity and duration of exposure to sunshine, in young Japanese women.

## Subjects and methods

### Study participants

The present Kawada-cho Peak Bone Mass Study is a cohort study in young Japanese women in Tokyo, Japan [11]. The participants consisted of healthy female volunteers who were students at the School of Nursing (college-degree four-year course) and the Nursing Vocational School (non-college-degree three-year course) of Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan. We obtained written consent from 348 candidate study subjects who agreed to participate voluntarily. Participants were excluded if they had systemic or metabolic disorders or medications with known effects on bone metabolism and had abnormalities in hormonal regulation or nutritional habits, including menstrual disturbance and eating disorders. Of these, 274 women finally participated in the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Tokyo Women's Medical University School of Medicine.

### Study design

The baseline survey was carried out from December 2003 to February 2004. Each participant completed a questionnaire about background information including age, weight, birth weight, age at menarche, and current menstrual status, along with the questionnaires described below.

### Laboratory assessments

All blood samples were taken when the participants gathered to receive the questionnaires, and to undergo blood chemistry tests for serum calcium, phosphorus, and albumin. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations were determined by the Nichols Advantage Chemiluminescence protein-binding assay (CLPBA) method [12]. Intact PTH was measured as a marker for vitamin D insufficiency by using a two-site immunoradiometric assay (Nichols Institute Diagnostics).

### Bone mineral density measurements

BMD at the lumbar spine (L2–L4) was measured by dual-X ray absorptiometry (DXA) using the QDR-4500 absorptiometer (Hologic Inc, Bedford, MA). The manufacturer's lumbar spine phantom was scanned daily for quality control and to correct for instrument drift. As previously reported, coefficient of variation in our measurements was <0.7% for the day-to-day quality control scans. BMD was reported as grams per square centimeter.

### Lifestyle factors

#### *Assessment of food and nutrient intakes*

Dietary habits during the past month were assessed with a validated, self-administered Diet History Questionnaire (DHQ) [13, 14], which was completed by each participant at home and was checked by  $\geq 2$  dietitians. The DHQ is a 16-page structured questionnaire that consists of the following 7 sections: general dietary behavior, major cooking methods, frequency of consumption of 6 alcoholic beverages as well as their portion sizes, semi-quantitative frequency of intake of 121 selected foods and nonalcoholic beverage items, dietary supplements, frequency of consumption of 19 staple foods (rice, bread, noodles, and other wheat foods) and *miso* (fermented soybean paste) soup as well as their amounts, and open-ended food items consumed regularly ( $\geq 1$  time/week) not listed in the DHQ. The food and beverage items and portion sizes in the DHQ were derived primarily from data in the National Nutrition Survey of Japan and several recipe books on Japanese dishes [15]. Dietary intake of 147 food and beverage items, energy, fat, total carbohydrate, alcohol, and dietary fiber were calculated by using an ad hoc computer algorithm developed for the DHQ, which was based on the Standard Tables of Food Composition in Japan [16].

Information on dietary supplements and data from the open-ended questionnaire items were not used for calculation of dietary intake. Detailed descriptions of the methods used for calculating dietary intake and the validity

of the DHQ were published elsewhere [10, 11]. Spearman's correlation coefficients between the DHQ and the 3rd estimated dietary records were 0.48, 0.48, 0.55, and 0.48, respectively, for energy, protein, fat, and carbohydrate in 47 women [10]. In addition, Pearson's correlation coefficients between the DHQ and the 16th semi-weighted dietary records were 0.32, 0.30, 0.52, 0.46, 0.43, 0.30, and 0.40, respectively, for energy, protein, fat, carbohydrate, calcium, phosphorus, and vitamin D in 92 women, with the Spearman's correlation coefficients being 0.39, 0.65, and 0.32, respectively, for fish, meats, and eggs (unpublished observation, S. Sasaki, 2006). For analysis of intake levels, we used energy-adjusted values, i.e., percentage of energy accounted for by protein, fat, and carbohydrate, and amount per 1000 kcal of energy for other nutrients and foods.

#### Assessment of physical activity

**JALSPAQ** Information about the subjects' participation in exercises, household activities, walking and cycling for transportation, as well as their occupational type were assessed with a self-administered Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study Physical Activity Questionnaire (JALSPAQ). JALSPAQ is a 2-page structured questionnaire that consists of the following five activities and four additional questions: sleep, work related activities, traveling to and from places (walking and cycling), housework (cooking, laundry, cleaning, caring for one's children and elderly), exercise and non-exercise leisure time activities.

Data on leisure time activities were collected from free-response items. Questions included: (1) exercise duration per session; (2) frequency of sessions per month; and (3) intensity of sessions. Activities were coded with the Compendium of Physical Activity [12, 13], which reflects the type and MET intensity of each activity.

Summary estimates of physical activity energy expenditure were calculated in terms of standard metabolic equivalents (METs) as MET-hours/day. MET values were obtained by multiplying the hours spent on each of the categories evaluated and the products summed to give kilocalories per kilogram per day. Total energy expenditure was estimated as the sum of energy expended in the 5 activity categories. The validity of the JALSPAQ was assessed using a sample of 271 volunteers. The correlation between the 24-h physical activity reported and that reported on the JALSPAQ was 0.36 in men and 0.38 in women. The correlation between the values registered by the uni-axial accelerometer and those reported on the JALSPAQ was 0.38 in men and 0.38 in women.

**Accelerometer** Lifecorder EX, a uniaxial accelerometer (Suzuken Co. Ltd, Nagoya, Japan), measures acceleration

in the vertical direction. The accelerometer was designed to detect movements of the body trunk by being attached to the waist, and to record the number of steps taken and the intensity of physical activity registered on a unique scale of 1–9 at 4-s intervals. Detailed descriptions of the algorithm used for calculating TEE and the validity of the Lifecorder have been published elsewhere [14].

#### Assessment of exposure to sunlight

The estimated duration of exposure to sunlight was calculated based on the following information obtained from the JALSPAQ: time spent on traveling to and from places (i.e., to work, for shopping) and outdoor leisure time activities considered to involve exposure to sunlight.

#### Statistical analysis

Continuous variables were expressed as a mean and SD to describe the status of the participants. To evaluate the relationship between serum 25(OH)D, intact PTH concentrations and the lumbar spine (L2–L4) BMD, Wilcoxon's rank sum test was used. The participants were then divided into four groups by median values for serum 25(OH)D and intact PTH concentrations. All continuous variables of interest (background information, physical activity, and nutrient intake) were analyzed for correlation with serum 25(OH)D concentrations, using Spearman's rank correlation coefficient and stepwise multiple regression analysis. All statistical analyses were performed by using the JMP (Japanese version 5.1.2, SAS Institute, Cary, NC).

#### Results

The participant characteristics are presented in Table 1. The serum calcium concentration was significantly positively correlated with the serum 25(OH)D concentration (Spearman;  $r = 0.23$ ,  $P < 0.001$ ), and was also inversely correlated with the serum intact PTH concentration (Spearman;  $r = -0.21$ ,  $P = 0.001$ ). The serum 25(OH)D and intact PTH concentrations were significantly inversely correlated (Spearman;  $r = -0.17$ ,  $P = 0.006$ , Fig. 1). Other background characteristics (age, birth weight, age at menarche, and BMI) were not correlated with 25(OH)D or intact PTH. Seventy-six participants were found to comprise the group showing the high 25(OH)D ( $\geq$ median of 18.0 ng/mL) and low intact PTH ( $<$ median of 40.3 pg/mL) concentrations, and were considered to combine the most appropriate conditions. The lumbar spine BMD was significantly higher in the high 25(OH)D and low intact PTH group ( $n = 76$ , mean  $\pm$  SD =  $1.02 \pm 0.10$  g/cm<sup>2</sup>) than the other group ( $n = 198$ ,  $0.99 \pm 0.11$  g/cm<sup>2</sup>; Wilcoxon,

**Table 1** Basic characteristics of the participants<sup>a</sup>

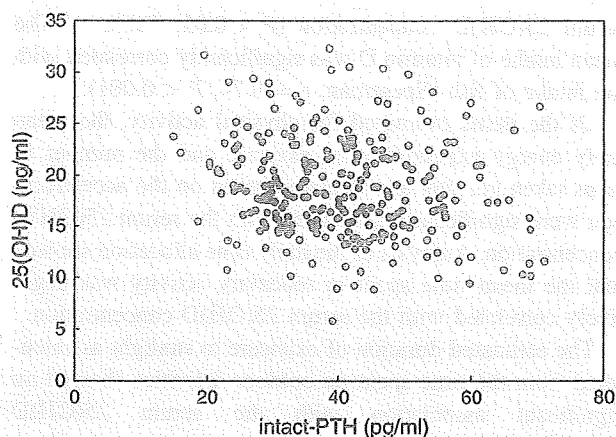
| Item                               | Value          | Range     |
|------------------------------------|----------------|-----------|
| Age (y)                            | 20.6 ± 1.4     | 19–25     |
| Birth weight (g)                   | 3143.2 ± 446.5 | 1800–4800 |
| Age at menarche (y)                | 12.0 ± 1.3     | 9–17      |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )           | 21.2 ± 2.7     | 15.2–31.2 |
| BMD (g/cm <sup>2</sup> )           |                |           |
| Lumbar spine (L2–L4)               | 1.00 ± 0.11    | 0.74–1.30 |
| Total proximal femur               | 0.90 ± 0.10    | 0.63–1.24 |
| Intact parathyroid hormone (pg/mL) | 40.5 ± 11.6    | 15.0–71.1 |
| 25(OH)D (ng/mL)                    | 18.7 ± 4.8     | 5.8–32.3  |

<sup>a</sup> All values are mean ± SD; range in parentheses. *n* = 274 except for birth weight (*n* = 261) and age at menarche (*n* = 272)

BMD bone mineral density, 25(OH)D 25-hydroxyvitamin D

*P* = 0.038). The same results observed in the hip BMD (0.92 ± 0.10 vs. 0.89 ± 0.10 g/cm<sup>2</sup>; *P* = 0.049). Age, BMI, serum phosphorus, serum bone metabolic markers, birth information and age at menarche were not significantly different between the two groups (*P* > 0.05).

Analysis of the values for lifestyle factors is shown in Table . To exclude the influence of intake volume, nutritional intake values were stratified by total consumption



**Fig. 1** The relationship between the serum intact PTH and 25(OH)D concentrations. The serum intact PTH and 25(OH)D concentrations were significantly inversely correlated (Spearman; *r* = -0.17, *P* = 0.006)

calories. The mean daily energy expenditure as calculated from the JALSPAQ questionnaire was 1786.8 ± 300.7 kcal, and was found to be consistent with the accelerometer values.

Of the nutrients examined, vitamin D (including supplements) and fish showed a significant correlation with the

**Table 2** Daily nutrient intake and physical activity

| Item   | Value           | Range         |
|--|-----------------|---------------|
| Energy, and selected nutrient and food intakes assessed by the DHQ |                 |               |
| Energy (kcal/day)  | 1863.4 ± 629.3  | 685.9–6134.3  |
| Proteins (% of energy)   | 13.4 ± 2.4      | 4.3–21.7      |
| Fat (% of energy)  | 28.9 ± 6.0      | 12.8–46.5     |
| Carbohydrates (% of energy)  | 54.5 ± 6.9      | 15.0–80.2     |
| Calcium (mg/1000 kcal)   | 424.1 ± 207.9   | 76.9–1508.1   |
| Vitamin D (µg/1000 kcal)   | 9.9 ± 6.7       | 0.4–46.4      |
| Fish (g/1000 kcal)   | 46.0 ± 36.7     | 0–279.3       |
| Egg (g/1000 kcal)  | 20.0 ± 15.6     | 0–111.2       |
| Physical activity  |                 |               |
| As assessed by the JALSPAQ   |                 |               |
| Total energy expenditure (METs·h/day)                              | 33.3 ± 2.6      | 29.1–48.3     |
| Sleep (h)  | 6.4 ± 1.2       | 4.0–12.0      |
| School curriculum (h)  | 5.1 ± 1.3       | 0–10.7        |
| Traveling to and from places (h)                                   | 1.2 ± 0.8       | 0.2–4.5       |
| Housework (h)  | 0.8 ± 0.7       | 0–3.6         |
| Exercise (h)   | 0.1 ± 0.2       | 0–1.5         |
| Leisure (h)  | 0.4 ± 0.8       | 0–4.9         |
| Sedentary activity (h)   | 10.0 ± 2.1      | 3.1–17.3      |
| As assessed by the accelerometer <sup>a</sup>                      |                 |               |
| Total energy expenditure (kcal/day)                                | 1820.4 ± 171.0  | 1364.0–2300.0 |
| Energy expenditure for exercise (kcal/day)                         | 222.3 ± 75.8    | 56.0–497.0    |
| Steps (steps/day)  | 8839.5 ± 2638.8 | 2273–18022    |
| Exposure to sunlight <sup>b</sup> (h/day)                          | 1.2 ± 0.8       | 0.17–4.5      |

All values are mean ± SD; *n* = 274 except for accelerometer (*n* = 267), daily time allocation (*n* = 273)

DHQ the Diet History Questionnaire, JALSPAQ the Physical Activity Questionnaire by the Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study

<sup>a</sup> Lifecorder EX, a uniaxial accelerometry sensor by Suzuken Co., Ltd

<sup>b</sup> Duration of exposure to sunlight was calculated from the questionnaire responses: amount of time spent on traveling to and from places (i.e., to work, for shopping), outdoor leisure time activities considered as involving exposure to sunlight

serum 25(OH)D concentration ( $P < 0.05$ ; Table 3). The mean intake of vitamin D was significantly correlated with the intake of fish (Spearman;  $r = 0.74$ ,  $P < 0.001$ ).

Of the items examined for physical activity, the mean daily energy expenditure on exercise and the number of steps taken per day as calculated based on the accelerometer were significantly associated with the serum 25(OH)D concentration. Analysis of the daily time allocation showed that the mean time spent in sedentary activity was negatively correlated with the serum 25(OH)D concentration.

The estimated duration of exposure to sunlight as calculated from the time spent on outdoor activities showed no significant association with the serum 25(OH)D concentration.

The vitamin D intake, the steps taken per day and the time spent in sedentary activity were chosen for stepwise

**Table 3** Correlation coefficients ( $r$ ) for serum 25(OH)D levels versus lifestyle factors

| Variable   | $r$   | $P$   |
|--|-------|-------|
| Selected nutrient and food intakes assessed by the DHQ |       |       |
| Calcium (mg/1000 kcal)                                 | 0.11  | 0.077 |
| Vitamin D ( $\mu\text{g}/1000$ kcal)                   | 0.20  | 0.001 |
| Fish (mg/kcal)   | 0.18  | 0.002 |
| Egg (g/1000 kcal)                                      | 0.07  | 0.249 |
| Physical activity                                      |       |       |
| As assessed by the JALSPAQ                             |       |       |
| Total energy expenditure (METs-h/day)                  | 0.08  | 0.164 |
| Sedentary activity (h)                                 | -0.14 | 0.018 |
| As assessed by the accelerometer <sup>a</sup>          |       |       |
| Total energy expenditure (kcal/day)                    | 0.07  | 0.265 |
| Energy expenditure for exercise (kcal/day)             | 0.15  | 0.016 |
| Steps (steps/day)                                      | 0.16  | 0.009 |
| Exposure to sunlight <sup>a</sup> (h/day)              | 0.04  | 0.487 |

Spearman's rank correlation coefficient

DHQ Diet History Questionnaire, JALSPAQ the Physical Activity Questionnaire by the Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study

<sup>a</sup> Duration of exposure to sunlight was calculated from the questionnaire responses: amount of time spent on traveling to and from places (i.e., to work, for shopping), outdoor leisure time activities considered to involve exposure to sunlight

**Table 4** Lifestyle factors showing significant correlation to serum 25(OH)D

| Variable                             | Parameter estimate | Standard estimate | $P$   | $R^2$ | Model $R^2$ |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-------|-------|-------------|
| Vitamin D ( $\mu\text{g}/1000$ kcal) | 0.258              | 3.724             | 0.001 | 0.037 | 0.084       |
| Steps (number/day)                   | 0.000              | 2.147             | 0.010 | 0.024 |             |
| Sedentary activity (h)               | -0.287             | -2.039            | 0.038 | 0.015 |             |

Stepwise multiple regression analysis

multiple regression analysis, with the 25(OH)D concentration as the outcome variable ( $P < 0.05$ ). As a result, each of these factors was found to significantly impact the 25(OH)D concentration (Table 4), while the  $r$  values were small.

## Discussion

Vitamin D and PTH have an important role in controlling the plasma calcium concentration. Any fall in the ionized calcium concentration is detected by the calcium receptor of the parathyroid gland, followed by the secretion of PTH by the parathyroid gland. PTH then activates vitamin D production, which in turn promotes calcium absorption from the intestines, increases bone resorption by the osteoclasts and compensates for the plasma calcium concentration which is accompanied by the reduction of calcium accumulated in the bone [1].

Insufficient intake of vitamin D is known to cause untoward conditions, such as secondary hyperparathyroidism and decreased BMD [2], and vitamin D deficiency is known to be a significant risk factor for osteoporosis and secondary hyperparathyroidism. Vitamin D, as it results from both cutaneous production and from dietary intake, reflects the conditions of daily living. Around 80–90% of (the precursor of) vitamin D is absorbed through the intestines or produced at the skin through exposure to sunlight, becoming a biologically active hormone after hydration [3]. It is thus recommended that hands, face and arms, or arms and legs, be exposed to sunlight for a period equal to 25% of the time required to cause a light pinkness to the skin [25]. Vitamin D intake varies from country to country [14]. The standard value recommended for intake of dietary vitamin D is 5  $\mu\text{g}$  for 15–18-year-olds in Japan.

Serum 25(OH)D concentration is the best clinical indicator of the vitamin D concentration in blood. The serum 25(OH)D concentration is lower in the elderly [26, 27], lower in women than in men [27] and lower in winter than in the other seasons [1, 25]. Low concentrations of 25(OH)D, defined as below 25 nmol/L, lead to an increase in the serum PTH concentration and to increased bone resorption [1]. Insufficiency of 25(OH)D in youth is associated with low BMD of the forearm [28] and hampers acquisition of maximum peak bone mass at the lumbar spine [29]. In addition, it is reported in a study evaluating BMD of the calcaneus that low levels of 25(OH)D may adversely affect bone strength [30].

In this study, we measured serum 25(OH)D levels using Nichols Advantage CLPBA. It detects serum 25(OH)D2 with much less sensitivity than serum 25(OH)D3. In Japan, vitamin D2 preparations are not prescribed for patients and vitamin D2 supplements are less used. Furthermore, we had

reported that the ratio of 25(OH)D<sub>2</sub> to total serum 25(OH)D in Japanese was extremely small [10]. Therefore, there is no doubt that the 25(OH)D<sub>2</sub> levels as measured on the Nichols Advantage did not affect our study results.

We investigated the association between serum 25(OH)D, intact PTH levels and BMD. The serum 25(OH)D concentration is negatively correlated with intact PTH. The low intact PTH and high 25(OH)D group showed higher serum calcium concentrations and BMD than the other group. Background data including age, BMI, serum parameters and birth information were not significantly different between the two groups. High 25(OH)D levels were assumed to control the intact PTH level, and to contribute toward an increase in calcium absorption and, consequently, in BMD.

Analysis of the lifestyle factors showed that exposure to sunlight had no impact on serum 25(OH)D. Previous study reports indicated positive correlation between sunlight exposure and serum 25(OH)D [24, 25]. But this study indicated no correlation between them. We estimated the reasons for this discrepancy as follows. First, the amount of vitamin D synthesis by sunlight reaches the upper limit of normal in Tokyo, at 35° north latitude [26]. Furthermore, Hollis et al. reported that an adequate UVB exposure level (18–20 mJ/cm<sup>2</sup>) in sunlight to induce pre-vitamin D on the epithelium is not generally reached during winter in the northern United States above latitude 40° [27]. Second, the measurement of sunlight exposure time may have some methodological problems. However, our results showing no association between the estimated time of exposure to sunlight and the serum 25(OH)D level did not contradict the positive correlation between sunlight exposure and serum 25(OH)D. Landin-Wilhelmsen et al. have reported that physical activities are often associated with being outdoors, and active individuals should therefore have a better chance of having sun exposure [28]. On the contrary, our study showed that there was no significant correlation between sunlight exposure and serum 25(OH)D levels. We might speculate that our participants may have applied some ultraviolet protection cosmetics when they exercised, though we did not check on it. That's likely the reason why only physical activities correlated with 25(OH)D.

Dietary intake of vitamin D (including supplements) and fish had an impact on serum 25(OH)D (Table 1). The participants consumed 56.9 ± 45.4 g of fish per day, which was found to be significantly correlated with vitamin D. The steps taken per day or energy expenditure on exercise had a positive impact, while the time spent in sedentary activity (watching TV, playing computer games) had a negative impact on serum 25(OH)D, suggesting that physical activity acted in an additive manner with vitamin D intake in Japanese young women. Although there have been reports showing correlation between physical activity and serum 25(OH)D [29, 30], the present study was too small

to draw any conclusion in this regard. Calcium is the most abundant of minerals available in the human body, of which 99% is found in bone with the rest in blood and muscle. Vitamin D participates in the contraction of muscle and is known to maintain myodynamia by transporting calcium from bone to muscle when it is calcium-deficient. Moreover, Kwon et al. reported that concomitant low serum albumin and vitamin D levels are associated with decreased muscle strength and balancing capability in elderly people [31].

The present study had several limitations. First, this cohort study was confined in geographical coverage to Tokyo only. Therefore, the distribution of the research parameter sunlight exposure could have been narrow. Second, participants were only students or nurses by occupation, possibly suggesting a similar lifestyle pattern among the participants. And third, since sunlight exposure was estimated from the JALSPAQ, the use of ultraviolet protection cosmetics was not able to be ruled out.

However, this is the first report investigating the association between the impact of lifestyle factors and serum 25(OH)D levels in Japanese young women which appears to partially explain the correlation between the steps taken per day and the serum 25(OH)D level. Further research is needed to verify the reported correlation between physical activity and serum 25(OH)D.

In conclusion, the serum 25(OH)D concentration was positively affected by dietary vitamin D or fish intake and the mean steps taken per day or energy expenditure on exercise, and was negatively affected by the time spent in sedentary activity. These findings may suggest that lifestyle modification at an early age may contribute to preventing osteoporosis or frailty in later years.

**Acknowledgments** This work was partly supported by a Grant-in-aid from Japan Osteoporosis Foundation. The authors thank Dr. Hiroya Okano, Dr. Ken Ishitani and Dr. Yuko Miyabara for their help in maintaining the Peak Bone Mass Study as well as for their data collection and stimulating discussions.

## References

- Holick MF (1995) Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61:638S–645S
- Working Group on the Nutritional Status of the Population of the Committee on Medical Aspects of the Food Nutrition Policy: subgroup on the Nutritional Aspects of Bone Health. 49 Nutrition and bone health: with particular reference to calcium and vitamin D. Report of the Subgroup on Bone Health (1998) *Rep Health Soc Subj*. The Stationary Office, London, iii–xvii, p 1–24
- Sahota O, Munday MK, 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

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, Miyanishi 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, Alkier 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, Shindo 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, Irjala 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, Sahara 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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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

世界的にも高頻度に発生しており、適正な栄養摂取が望まれている<sup>3)</sup>。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<sup>4)5)</sup>。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<sup>6)</sup>、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<sup>4)5)</sup>。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<sup>7)8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>10)11)</sup>。

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<sup>12)13)14)</sup>。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<sup>15)</sup>。2005年の骨折予防に必要な至遠血中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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>。これら一連の報告を受けて、最近、Lipsら<sup>18)</sup>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)、身体能力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)で維持される量が必要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<sup>18)</sup>。日本人女性を対象とした我々の疫学研究から得られた通常の若年者、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歳を除くいずれの年代においても半数以上はVD不足といえる<sup>19)</sup>。

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<sup>20)</sup>、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<sup>21)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>22)</sup>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<sup>23)</sup>。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)<sup>24)</sup>。

#### 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<sup>9)</sup>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<sup>25)</sup>。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<br>(nmol/L)<br>平均±標準偏差 | パーセンタイル |    |    |    |    |             |    |    |    |    | 血中25-D濃度が<br>50 nmol/Lを示す<br>パーセンタイル値 |     |
|--------|-----|---------------------------------|---------|----|----|----|----|-------------|----|----|----|----|---------------------------------------|-----|
|        |     |                                 | 0       | 1  | 5  | 10 | 25 | 50<br>(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<sup>19)</sup>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<br>(発表年)                       | 対象者数                            | VD 補給量/日と<br>コンプライアンス (%)  | 年齢<br>平均 (SD)             | 調査期間<br>(月)                          | 血中 25-D 濃度 (nmol/L)                                       |  |
|------|--------------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|---|--|
|      |                                      |                                 |  |                           |                                      | 平均 (SD) あるいは平均 (範囲)                                       | 服用群<br>n=測定数*                                  |
| (1)  | Lyons <i>et al</i><br>(2007)         | 3,440<br>(2,724 女性, 716 男性)     | D <sub>3</sub> 800 IU (100,000 IU/4 ヶ月)<br>vs プラセボ, 80%  | 84 (8)                    | 36                                   | 80.1 (5 回服用:<br>20 ヶ月目) フォ<br>ローアップ時<br>のみ n=102          | 54 フォロー<br>アップ時                                |
| (2)  | Flicker <i>et al</i><br>(2005)       | 625<br>(593 女性, 32 男性)          | 最初 D <sub>2</sub> 10,000 IU/週, その後 D <sub>2</sub><br>1000 IU + Ca 600 mg<br>vs プラセボ + Ca 600 mg, 77% | 83 (8)                    | 24                                   | ND  | ND   |
| (3)  | Pfeifer <i>et al</i><br>(2008)       | 242<br>(49% 女性)                 | D <sub>3</sub> 800 IU + Ca 1000 mg<br>vs プラセボ + Ca 1000 mg, 80%                                      | 77 (4)                    | 12+8<br>フォロー<br>アップ                  | 55.4 (18.4) →<br>84.5 (18.0)<br>12 ヶ月目<br>n=242           | 53.8 (18.5)<br>56.6 (20)<br>12 ヶ月目             |
| (4)  | Trivedi <i>et al</i><br>(2003)       | 2,686<br>(2,037 男性, 649 女性)     | D <sub>3</sub> 800 IU (D <sub>3</sub> 100,000 IU/4 ヶ月)<br>vs プラセボ, 80%                               | 75 (5)                    | 60                                   | 74.3 (20.7)<br>48 ヶ月目<br>フォローアップ<br>時のみ n=238             | 53.4 (21.1)<br>48 ヶ月目                          |
| (5)  | Chapuy <i>et al</i><br>(2002)        | 583 女性                          | D <sub>3</sub> 800 IU + Ca 1200 mg<br>vs プラセボ, 95%   | 85 (7)                    | 24                                   | 21.3 (13.3) →<br>77.5 (ND)<br>24 ヶ月目<br>(棒グラフから)<br>n=583 | 22.8 (17.3) →<br>15 (ND)<br>24 ヶ月目<br>(棒グラフから) |
| (6)  | Meyer <i>et al</i><br>(2002)         | 1,144<br>(858 女性, 286 男性)       | D <sub>3</sub> 400 IU (タラ肝油)<br>vs D <sub>3</sub> 除去後のタラ肝油, 95%                                      | 85 (7)                    | 24                                   | 47 26 <sup>1</sup> →<br>64 21<br>12 ヶ月目<br>n=65           | 51 (33) →<br>46 (20)<br>12 ヶ月目                 |
| (7)  | Pfeifer <i>et al</i><br>(2000)       | 137 女性                          | D <sub>3</sub> 800 IU + Ca 1200 mg<br>vs 1200 mg calcium, 96%  | 74 (1)                    | 2 (補給)+10<br>(非補給)                   | 25.7 13.6 →<br>66.1 33.1<br>2 ヶ月目<br>n=137                | 24.6 (12.1) →<br>42.9 (33.1)<br>2 ヶ月目          |
| (8)  | Dawson-Hughes<br><i>et al</i> (1997) | 389<br>(213 女性, 176 男性)         | D <sub>3</sub> 700 IU + Ca 500 mg<br>vs プラセボ, 93%  | 71 (5)                    | 36                                   | 76.5 37.0 →<br>112 36.8<br>36 ヶ月目<br>n=313                | 72 (33.1) →<br>71.7 (30.5)<br>36 ヶ月目           |
| (9)  | Lips <i>et al</i><br>(1996)          | 2,578<br>(1916 女性, 662 男性)      | D <sub>3</sub> 400 IU<br>vs プラセボ, 85%  | 80 (6)                    | 36-41                                | 27 19-36 →<br>62 52-79)<br>12 ヶ月目<br>n=270                | 26 (19-37) →<br>23 (17-31)<br>12 ヶ月目           |
| (10) | Chapuy <i>et al</i><br>(1994)        | 2,303 女性                        | D <sub>3</sub> 800 IU + Ca 1200 mg<br>vs プラセボ, 83%   | 84 (6)                    | 36                                   | 40 (27.5) →<br>106 (22.5)<br>18 ヶ月目<br>n=52               | 32.5 (22.5) →<br>27.5 (17.5)<br>18 ヶ月目         |
| (11) | Grant <i>et al</i><br>(2005)         | 5,292<br>(4,481 女性, 811 男性)     | D <sub>3</sub> 800 IU + Ca 1000 mg,<br>vs D <sub>3</sub> 800 IU のみ,<br>47% (24 ヶ月目)                  | 77 (6)                    | 24 ~ 62<br>median: 45,<br>IQR: 37-52 | 38 (16) →<br>62 (19.5)<br>12 ヶ月目<br>n=60                  | 38 (16) →<br>43.6 (16)<br>12 ヶ月目               |
| (12) | Jackson <i>et al</i><br>(2006)       | 22,860 女性,<br>サブグループ<br>年齢 > 60 | D <sub>3</sub> 400 IU + Ca 1000 mg<br>vs プラセボ (平均 D 摂取量<br>365IU), 63%                               | サブグル<br>ープの推<br>定年齢<br>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<sup>26)</sup>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<sup>26)</sup>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ラショナルを除外した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400IU/dあるいはそれ以下が3試験、482-770IU/dが9試験であった。VDとともに500-1200mg/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400IU/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、400IU/d以上を補給する9つの高用量試験(482-770IU/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

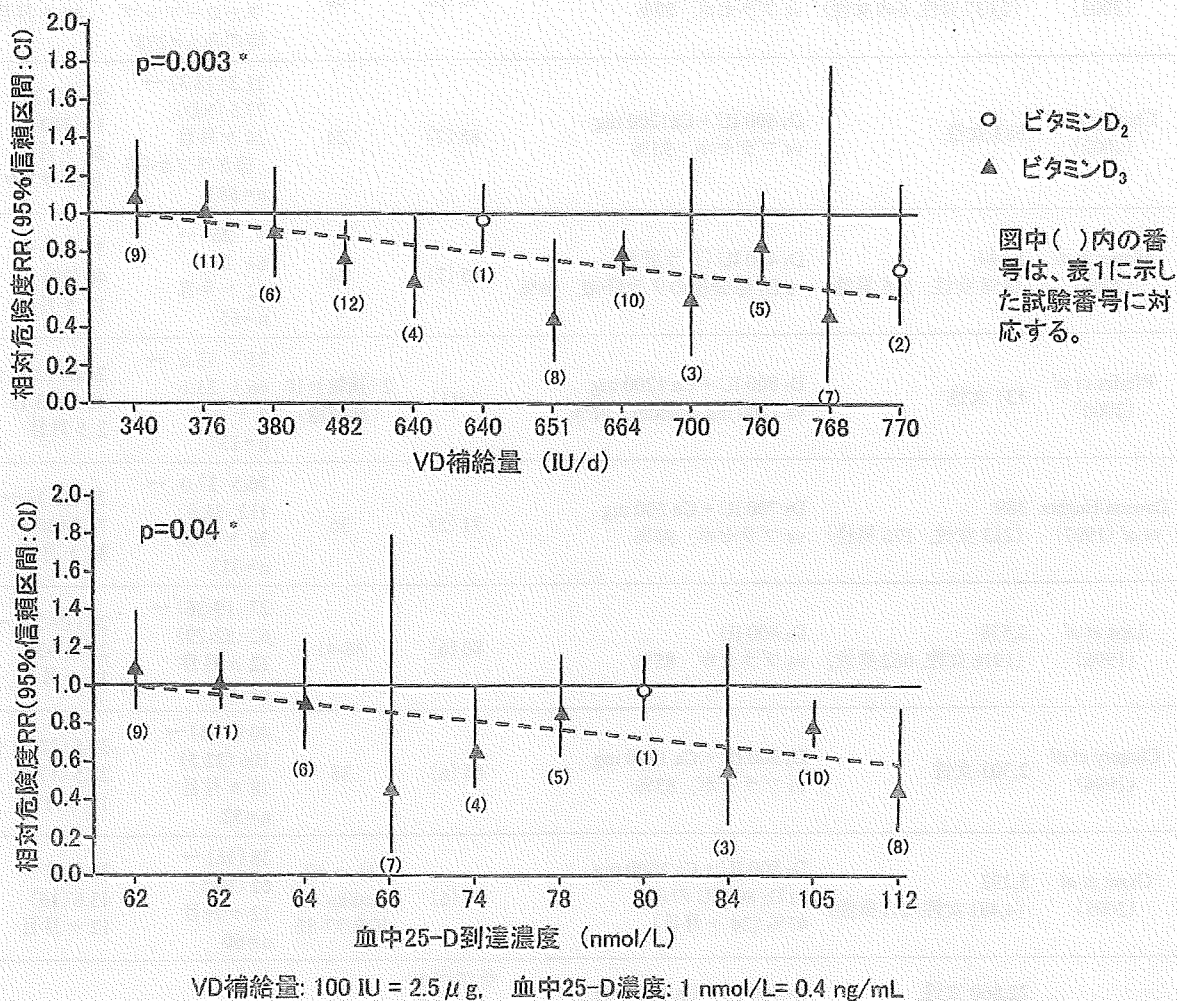


図1. VD補給量あるいは血中25-D到達濃度と非椎体骨折予防効果のメタ回帰分析

\*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<sup>26)</sup>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<sup>29)</sup>, 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<sup>28)</sup>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<sup>29)</sup>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<sup>30)</sup>より引用, 一部改変

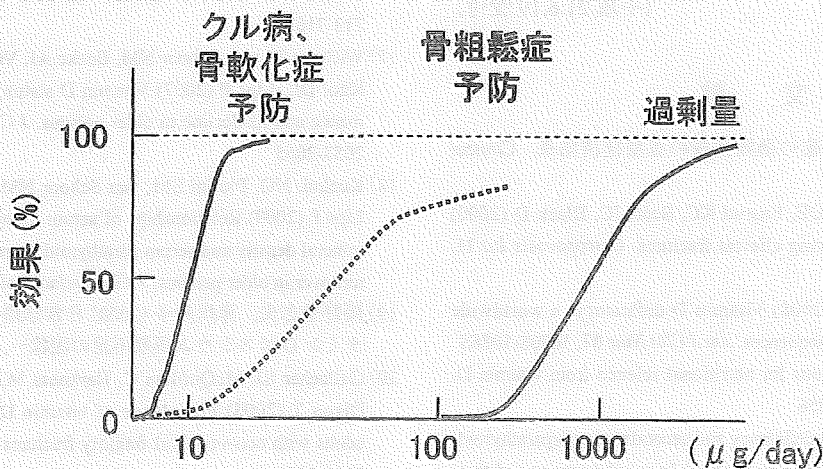


図2. VD摂取量と骨疾患の予防における相対的な用量反応曲線  
 クル病, 骨軟化症の予防に比べて骨粗鬆症予防に必要なVD摂取量が多い。しかし, その量は過剰量に比べると十分に低い。VDによって骨粗鬆症が完全に予防されることはなく, 効果は100%に至らない。(10 μg/d=400 IU/d)

文献<sup>30)</sup>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<sup>16)</sup>。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 $\mu$ 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 $\mu$ g/d(=400 IU/d)71歳以上は15 $\mu$ 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2<sup>30)</sup>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<sup>31)</sup>、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 MK, 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. *Osteoporosis 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, Katzer 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. *Osteoporosis 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, Primatesta 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) Himeno 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, Kamao M, Kuvabara 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 WI, 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, 小島康子, 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D, 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<sup>1)</sup>・高瀬友貴<sup>1)</sup>・峯上卓也<sup>1)</sup>・土井綾子<sup>1)</sup>・小池さやか<sup>1)</sup>  
鎌尾まや<sup>1)</sup>・上西一弘<sup>2)</sup>・石田裕美<sup>3)</sup>・岡野登志夫<sup>1)</sup>

### 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 $\gamma$ 位のカルボキシル化)する酵素 $\gamma$ -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<sup>1)</sup>。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<sup>2-9)</sup>、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<sup>10)</sup>。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の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)の健康思春期男女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<sup>11)</sup>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( $\mu$ 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

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

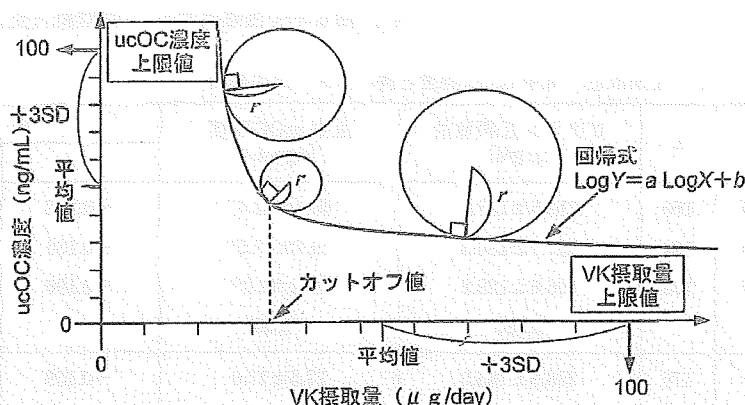


図1 曲率解析法を応用した新規栄養評価法の概念図

【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  $190 \sim 230 \mu\text{g/d}$  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  $100 \sim 450 \mu\text{g/d}$  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： $300 \mu\text{g/d}$ 、高校 1 年： $100 \mu\text{g/d}$ 、高校 3 年： $300 \mu\text{g/d}$  となり、女子では中学 1 年： $250 \mu\text{g/d}$ 、高校 1 年： $150 \mu\text{g/d}$ 、高校 3 年： $400 \mu\text{g/d}$  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  $20\text{ng/mL}$  となっている<sup>19)</sup>。今回、 $19 \sim 29$  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、 $20\text{ng/mL}$  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<br>( $\mu\text{g/d}$ ) | 血中 ucOC 濃度<br>( $\text{ng/mL}$ ) | 相 関    |        |
|----|----------------|-----|-----------------------------------|----------------------------------|--------|--------|
|    |                |     |                                   |                                  | r      | p      |
| 男子 | 中学 1 年         | 166 | 212.5 $\pm$ 122.2                 | 40.4 $\pm$ 22.4*                 | -0.248 | 0.001  |
|    | 高校 1 年         | 194 | 227.7 $\pm$ 180.3                 | 19.7 $\pm$ 13.5*                 | -0.186 | 0.011  |
|    | 高校 3 年         | 183 | 196.6 $\pm$ 129.2                 | 12.2 $\pm$ 7.0*                  | -0.196 | 0.009  |
|    | p <sup>#</sup> |     | 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 <sup>#</sup> |     | 0.036                             | <0.001                           |        |        |

\*: 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  $\mu\text{g/d}$ , 高校 1 年: 178  $\mu\text{g/d}$ , 高校 3 年: 154  $\mu\text{g/d}$  となり、女子では中学 1 年: 188  $\mu\text{g/d}$ , 高校 1 年: 155  $\mu\text{g/d}$ , 高校 3 年: 162  $\mu\text{g/d}$  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  $\mu\text{g/d}$  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 濃度を指標と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  $\mu\text{g/d}$  ( $=1.0 \mu\text{g/kg/d}$ ) 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  $\mu\text{g/kg/d}$  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<sup>13)</sup>。血液凝固に必要な VK 摂取量として Suttie らが報告した 1  $\mu\text{g/kg/d}$  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  $\mu\text{g/d}$   $=1.04\pm 0.35 \mu\text{g/kg/d}$ ) と VK 制限食摂取時 (37 $\pm$ 24  $\mu\text{g/d}$   $=0.50\pm 0.31 \mu\text{g/kg/d}$ ) 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  $\mu\text{g/d}$  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  $\mu\text{g/kg/d}$  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<sup>14,15)</sup>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 model<sup>16)</sup>、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<sup>17)</sup>。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、Booth<sup>18)</sup>、Binkleyら<sup>19)</sup>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 K<sub>1</sub> 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 K<sub>1</sub> 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 K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub> 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  $\mu$ g/day of vitamin K intakes were obtained as cut-off values. Adequate intake of the Dietary Reference Intakes in Japan is 75~80  $\mu$ g/d or 60~65  $\mu$ 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.