

23. Tanimoto, H.; Fox, T.; Eagles, J.; Satoh, H.; Nazawa, H.; Okiyama.; Morinaga, Y.; Fairweather-Tait, S. Acute effects of poly-gamma-glutamic acid on calcium absorption in postmenopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* **2007**, *26*, 645-649.
24. van der Hee, R.M.; Miret, S.; Slettenaar, M.; Duchateau, G.S.; Rietveld, A.G.; Wikinson, J.E.; Quail, P.J.; Berry, M.J.; Dainty, J.R.; Teucher, B.; Fairweather-Tait, S.J. Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *J. Am. Diet Assoc.* **2009**, *109*, 830-835.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## Original Article

# Hypovitaminosis D and K are highly prevalent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly

Akiko Kuwabara PhD<sup>1</sup>, Masako Himeno MSc<sup>1</sup>, Naoko Tsugawa PhD<sup>2</sup>,  
Maya Kamao MSc<sup>2</sup>, Minori Fujii RD<sup>3</sup>, Nobuko Kawai CSW<sup>3</sup>, Miyuki Fukuda MSc<sup>1</sup>,  
Yoko Ogawa MSc<sup>1</sup>, Shoko Kido PhD<sup>1</sup>, Toshio Okano PhD<sup>2</sup>, Kiyoshi Tanaka MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, Higashiyama, Japan

<sup>2</sup>Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Higashiyama, Japan

<sup>3</sup>Nursing Home Kayu-Shirakawa, Higashiyama, Japan

There have been methodological problems for studying hypovitaminosis D and K in the elderly. First, studies were done either by evaluating food intake or measuring their circulating levels, but rarely by both in Japan. In this paper, vitamin D and K intakes and their circulating levels were simultaneously determined. Second issue is whether hypovitaminosis D and K are independent of general malnutrition, prevalent in the elderly. We tried to statistically discriminate them by principal component analysis (PCA). Fifty institutionalized elderly were evaluated for their circulating 25 hydroxy-vitamin D (25OH-D), intact parathyroid hormone (PTH), phylloquinone (PK), menaquinone-7 (MK-7) levels, and their food intake. Although average vitamin D intake (7.0 µg/day) exceeded the Japanese Adequate Intake (AI) of 5.0 µg/day, average serum 25OH-D concentration was in the hypovitaminosis D range (11.1 ng/mL). Median vitamin K intake was 168 µg/day, approximately 2.5 times as high as AI for vitamin K. Nevertheless, plasma PK and MK-7 concentrations were far lower than those of healthy Japanese elderly over 70 years old. PCA yielded four components; each representing overall nutritional, vitamin K<sub>2</sub>, vitamin D, and vitamin K<sub>1</sub> status, respectively. Since these components are independent of each other, vitamin D- and K-deficiency in these subjects could not be explained by overall malnutrition alone. In summary, institutionalized elderly had a high prevalence of hypovitaminosis D and K, and the simultaneous determination of their circulating level and dietary intake is mandatory in such studies. PCA would yield fruitful results for eliminating the interference by confounders in a cross-sectional study.

**Key Words:** hypovitaminosis D, hypovitaminosis K, principal component analysis, adequate intake, institutionalized elderly

## INTRODUCTION

Vitamin D is of utmost importance in enhancing the intestinal absorption of calcium and phosphorus,<sup>1,2</sup> with its deficiency causing skeletal mineralization defect; rickets and osteomalacia. Recently, it has come to the general attention that inadequate supply of vitamin D, even in its milder form (vitamin D insufficiency), is associated with increased risk of fracture through negative calcium balance, hence secondary hyperparathyroidism.<sup>1,2</sup> Vitamin D insufficiency is also reported to be associated with muscle weakness. Recent clinical studies have indicated that intervention with vitamin D supplementation reduced the incidence of falling in elderly subjects.<sup>3</sup> Clinically important non-vertebral fractures, such as hip and wrist fractures are triggered by falling. Thus, vitamin D insufficiency would render the elderly subjects more prone to fracture through its effects both on the skeleton and muscle. Recently, lower serum level of 25 hydroxy-vitamin D (25OH-D) was reported to be a significant risk factor even for mortality.<sup>4</sup>

Vitamin D insufficiency is quite common in the elderly population,<sup>5,6</sup> and institutionalized elderly are at even higher risk for vitamin D insufficiency.<sup>7-10</sup> Factors hitherto postulated to be responsible include low dietary vitamin D intake,<sup>7,9</sup> reduced dermal capacity to produce vitamin D with aging and minimal sun exposure.<sup>11,12</sup>

In contrast to vitamin D, the skeletal action of vitamin K has called our attention only quite recently. The only biological action of vitamin K has been considered to be its role as the coenzyme of  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX) in the liver, by which additional carboxyl group is introduced into the glutamic acid residue in four of the

**Corresponding Author:** Dr Kiyoshi Tanaka, Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, 35, Imakumano-kitahiyoshicho, Higashiyama 605-8501 Japan.

Tel: +81-75-531-7125; Fax: +81-75-531-7153

Email: tanakak@kyoto-wu.ac.jp

Manuscript received 8 July 2009. Initial review completed 13 October 2009. Revision accepted 23 November 2009.

**Table 1.** Background profiles and results from blood tests of the study subjects

	Total	Male	Female	p value
n	50	15	35	-
Age (y)	87.6±8.0 (88.5)	84.9±7.9 (83.0)	88.7±7.8 (90.0)	0.133
Level of care needed	3.6±1.1 (4.0)	3.3±1.0 (3.0)	3.7±1.2 (4.0)	0.228
Body height (cm)	144.0±11.6 (142.0)	157.0±7.8 (159.0)	138.4±7.8 (139.0)	<0.01
Body weight (kg)	43.6±9.3 (43.2)	50.3±7.9 (49.9)	40.7±8.3 (38.1)	0.001
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	21.0±3.8 (20.1)	20.5±3.4 (19.6)	21.3±4.0 (20.2)	0.476
Serum albumin (g/dL)	3.7±0.4 (3.7)	3.8±0.4 (3.9)	3.6±0.4 (3.6)	0.136
Serum total cholesterol (mg/dL)	184±37 (184)	186±26 (195)	183±41 (183)	0.828
Serum triglyceride (mg/dL)	98±41 (92)	96±47 (75)	98±39 (93)	0.403
Serum aminotransferase (U/L)	22±11 (19)	20±7 (17)	22±12 (19)	0.603
Serum alanine aminotransferase (U/L)	16±10 (13)	16±7 (13)	16±12 (12)	0.235
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	61±20 (60)	67±19 (67)	59±21 (57)	0.208
Serum 25-hydroxyvitamin D (ng/mL)	11.1±3.1 (11.2)	10.3±3.5 (9.3)	11.5±3.0 (11.6)	0.274
Serum parathyroid hormone (pg/mL)	30.8±11.8 (30.0)	29.9±11.1 (31.0)	31.3±12.2 (30.0)	0.736
Plasma phylloquinone (ng/mL)	0.73±0.70 (0.58)	0.62±0.29 (0.60)	0.77±0.82 (0.53)	0.992
Plasma menaquinone-7 (ng/mL)	0.53±0.37 (0.45)	0.59±0.47 (0.47)	0.51±0.32 (0.44)	0.849

Data are expressed as mean±SD with the values in parentheses showing the median.

Comparison of indices between males and females were done by unpaired t test or Mann-Whitney test depending on normality. eGFR; estimated Glomerular Filtration Rate.

**Table 2.** Daily dietary intakes of the study subjects

	Total	Male	Female	p value
Energy (kcal)	1322±159 (1387)	1374±96 (1416)	1300±175 (1386)	0.160
Protein (g)	51.0±5.8 (53.3)	53.1±3.6 (54.6)	50.2±6.3 (53.5)	0.091
Fat (g)	32.8±3.9 (34.6)	34.2±2.4 (35.3)	32.2±4.3 (34.5)	0.095
Carbohydrates (g)	178±20 (186)	185±12 (189.7)	175±21 (186)	0.093
Calcium (mg)	494±53 (504)	503±50 (506)	490±54 (502)	0.157
Vitamin D (µg)	7.0±1.4 (7.7)	7.4±0.9 (7.8)	6.9±1.5 (7.6)	0.107
Vitamin K (µg)	155±30 (168)	164±19 (172)	151±33 (168)	0.107

Data are expressed as mean±SD with the values in parentheses showing the median. Comparison of indices between male and women were done by unpaired t test or Mann-Whitney test depending on normality.

blood coagulation factors (II, VII, IX, X) to yield  $\gamma$ -glutamic carboxyl (Gla) residue.<sup>13</sup> Other extrahepatic proteins are also  $\gamma$ -carboxylated by GGCX, such as osteocalcin (bone Gla protein; BGP) and matrix gla protein (MGP).<sup>14</sup> Recent evidences suggest that vitamin K deficiency is associated with increased risk of fracture. When subjects were categorized into quartiles according to their vitamin K intake, fracture risk in the lowest quartile was twice as high as that in the highest quartile.<sup>15</sup> The age-adjusted incidence of vertebral fracture was significantly higher in subjects with low plasma phylloquinone levels than those with high plasma levels in Japanese women.<sup>16</sup> In addition, the association of circulating vitamin K level and bone mineral density (BMD) has also been reported. For example, low plasma phylloquinone concentration was associated with low BMD at the femoral neck in men, and lower spine BMD in postmenopausal women without estrogen replacements.<sup>17</sup> High serum concentration of undercarboxylated osteocalcin (ucOC), which is a sensitive indicator of skeletal vitamin K insufficiency, was a significant risk factor of hip fracture independent of BMD.<sup>18,19</sup>

Plasma phylloquinone level is subject to alteration by aging,<sup>20,21</sup> and elderly subjects have been reported to have low plasma phylloquinone concentrations.<sup>22</sup> Of note is the report that elderly nursing home residents generally had a poor dietary vitamin K intake compared to the ambulatory elderly.<sup>23</sup>

Studies on the role of hypovitaminosis D and K in the elderly, especially the institutionalized ones are greatly hampered by the fact that they are also generally malnourished. Arguments against the significance of these vitamins have been made that decreased serum concentrations of these vitamins is merely a reflection of overall malnutrition. In this paper, we have tried to statistically discriminate hypovitaminosis D and K from general malnutrition by using principal component analysis (PCA), which has been employed in clinical nutrition for the analyses of dietary pattern.<sup>24,25</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The study subjects were 50 institutionalized elderly (male 15, female 35) in a nursing home, Kayu-Shirakawa. Exclusion criteria were routine medication that has potential interference with vitamin D or vitamin K status. Detailed information about this study was given and written consent was obtained from the subject or the proxy. The study protocol was approved by the ethical committee in Kyoto Women's University.

### Laboratory data

Blood was obtained after overnight fasting. After centrifugation, serum was kept frozen at -30°C until analysis. Serum concentration of 25OH-D was measured by radioimmunoassay (RIA) (DiaSorin, Stillwater, MN, USA).

Circulating level of intact parathyroid hormone (PTH) was measured by electro chemiluminescent immunoassay (ECLIA) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Plasma vitamin K<sub>1</sub> (phylloquinone; PK), and menaquinone-7 (MK-7) levels were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (LC-APCI-MS/MS) using a HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) and API3000 LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA) with <sup>18</sup>O-labeled vitamin K as the internal standard.<sup>26</sup>

#### *Nutrition intake study*

Since the subjects were institutionalized and their diet was supplied from the institution, their nutrients and energy intake were calculated by multiplying the supplied nutrients on the basis of the Standard Tables of Food Composition in Japan, 5<sup>th</sup> ed. with the average percentage intake in a preceding month by the staff.<sup>27</sup> Percentage intake was assessed for each subject at every meal, and the monthly average percentage intake was calculated. Based on these records, their intake of energy and nutrients was calculated using software (Healthy Maker Pro 501, Mushroom Software Corp, Okayama, Japan).

#### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed with SPSS 15.0J (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan). Comparison of two independent groups was made with Student's t-test or Mann-Whitney test depending on normality. Multiple regression analyses by stepwise method were performed to determine independent factors for circulating levels of vitamin D and K levels. The relationship between various nutritional indices and circulating vitamin D- and K- levels was analyzed with principal component analysis (PCA), which is a statistical method to summarize the various parameters into a small number of summary factors (components). These components are obtained in such a way that the first component is extracted from the initial raw data with the maximal amount of information (eigenvalue), and the second one is extracted from the remaining information. Therefore, each component is mutually independent. Components with the eigenvalue greater than 1 were adopted, as in usual practice.

## **RESULTS**

### *Biochemical markers and circulating concentrations of vitamin D and K*

Baseline characteristics and data from blood examination are shown in Table 1. There was no gender difference in the age and level of care needed, which is a 5-grade score in the long-term care insurance in Japan with a higher number indicating the need for more intensive care. The level of care needed was higher than grade 3 in 78% of subjects. Most of the present subjects required wheelchair for transportation. Body height and body weight were significantly higher in males than in females. Body mass index (BMI), or serum albumin, total cholesterol and triglyceride concentrations did not significantly differ between the two groups. Generally, serum albumin level less than 3.5 g/dL is considered to indicate malnutrition. Serum albumin level was below this value in 26% of sub-

jects. Inasmuch as the advanced age and high level of care needed, nutritional parameters remained within the reference range in most of the subjects. None of the study subjects had severe hepatic or renal dysfunction. There is a general consensus that a serum 25OH-D concentration less than 20 ng/mL indicates hypovitaminosis D.<sup>2</sup> Serum 25OH-D concentration was <10 ng/mL in 40% of subjects, 10-20 ng/mL in 58%, and ≥20 ng/mL in only one subject. None of the subjects had a serum PTH level above the cut-off value (65 pg/mL). Plasma PK and MK-7 concentrations in all of the subjects were 0.73±0.70 ng/mL and 0.53±0.37 ng/mL, respectively. In the present study, serum PK was less than 1 ng/ml and serum MK-7 was less than 1 ng/ml, in 85% and 90% of the subjects, respectively. The interpretation for these values will be given in the "Discussion" section. There were no gender differences in plasma vitamin K levels, serum 25OH-D or PTH.

#### *Nutritional intake in the study subjects*

The nutrients intake in the males and females were not statistically different as shown in Table 2. During the preparation of this paper, Dietary Reference Intake (DRI) for Japanese 2010 (DRI 2010) was released on May 29, 2009.<sup>28</sup> Since this work was done in 2006, however, consideration is made basically according to DRI 2005.<sup>29</sup> The intake of macronutrients such as protein, fat and carbohydrates appeared appropriate for their age and sex. The adequate intakes (AI) for calcium in Japan are 750 mg for men and 650 mg for women over 70 years. The AI for vitamin D is 5 µg/day, and that for vitamin K is 75 µg/day for men and 65 µg/day for women respectively. Although average calcium intakes in both groups were lower than the AI in DRI 2005, the average daily vitamin D intake was 7.0 µg, which is 140% of the AI in DRI 2005. The average daily intake of vitamin K in whole subjects was 155 µg, which is more than twice the AI for each gender. Thus, apparently these subjects had sufficient intakes of vitamin D and K based on AI in DRI 2005.

#### *Multiple regression analyses for the determination of independent factor for circulating vitamin D, K concentrations.*

In multiple regression analyses, vitamin D intake was a significant determinant of serum 25OH-D level, although the R<sup>2</sup> was low. Serum triglyceride level was the only significant predictor for plasma MK-7 concentration, and vitamin K intake and serum triglyceride concentrations significantly contributed to plasma PK level (Table 3).

#### *Principal component analysis (PCA)*

Since institutionalized elderly are generally malnourished, it is quite important to determine whether the low vitamin D - and K -status is independent of overall malnutrition or not. Then PCA was performed with the parameters included for analysis being serum albumin, triglyceride, cholesterol, 25OH-D, PTH levels and plasma PK, MK-7 concentrations. Four components were obtained and explained 82% of the variance. The first component was composite of high albumin, total cholesterol and 25OH-D, and second component consisted of high triglyceride, low

**Table 3.** Multiple regression analyses for the determination of independent factors for circulating vitamin D, K concentrations

	R <sup>2</sup>	p value	Variable	β	p value
Serum 25OH-D	0.095	0.033	Vitamin D intake	0.309	0.033
Plasma PK	0.181	0.011	Vitamin K intake	0.290	0.042
			Triglyceride	0.380	0.009
Plasma MK-7	0.255	<0.001	Triglyceride	0.505	<0.001

Only significant predictors are shown. The abbreviations are β for β coefficient, and p for p value. Independent predictor for serum 25OH-D or plasma PK, MK-7 concentrations was analyzed by multivariate analysis with stepwise regression. Age, level of care needed and serum triglyceride and total cholesterol concentrations were included in all analyses. Vitamin D intake was additionally included in the analysis for plasma 25OH-D concentration. For plasma PK and MK-7, vitamin K intake was additionally included.

**Table 4.** Principal component analysis of nutrition indices

	Component 1	Component 2	Component 3	Component 4
Serum Albumin	0.880	0.004	0.047	0.059
Serum triglyceride	0.229	0.734	0.119	0.380
Serum total cholesterol	0.800	0.320	-0.046	-0.060
Serum 25OH-D	0.434	-0.457	-0.658	-0.033
Serum PTH	0.156	-0.273	0.877	-0.090
Plasma PK	-0.014	0.030	-0.071	0.986
Plasma MK-7	0.117	0.832	-0.238	-0.152

Factor loadings to four components after varimax rotation are shown. Loadings greater than 0.35 are shown in bold

Four components thus obtained were considered to represent the following nutritional status; component 1: overall nutritional status, component 2: vitamin K<sub>2</sub> status, component 3: vitamin D status, and component 4: vitamin K<sub>1</sub> status.

25OH-D, and high MK-7. The third component was composite of low 25OH-D and high PTH, and the fourth component was composed of high triglyceride and high PK. The interpretation of each component was made as follows; the first component representing overall nutritional status, the second component, vitamin K<sub>2</sub> status, the third component, vitamin D status, and the fourth component representing vitamin K<sub>1</sub> status (Table 4).

## DISCUSSION

Nutritional status would be adequately assessed by both evaluating the subjects' food intake and measuring their circulating or urinary markers. This principle would hold true especially in the elderly, since they are at high risk for malabsorption or utilization defects of nutrients. Unfortunately in Japan, vitamin D and K status in the elderly has been studied either by evaluating their food intake, as in the annual National Nutrition Survey Japan (NNS-J) or by measuring circulating level of these vitamins,<sup>21,30-33</sup> but rarely by both.<sup>12,34</sup>

Institutionalized elderly have been our special concern, since they are much more susceptible to hypovitaminosis D and K deficiency than the healthy elderly. The NNS-J in 2006 showed that subjects over 70 years of age, including both genders, had the following daily nutrients intakes: energy 1761 kcal, calcium 551 mg, vitamin D 9.0 μg, vitamin K 273 μg,<sup>35</sup> which were higher than those of the subjects in the present study. Gastrointestinal absorption of nutrients in the present study subjects would be impaired also. These considerations led us to simultaneously evaluate both vitamin D and K intakes and its circulating levels in the present study.

Before the interpretation of our data, determination procedure for vitamin K deserves some discussion. There have been discrepancies on the plasma concentration of vitamin K in the previous literature, which is at least partly due to the different determination procedure employed. Recently we have developed a novel procedure for the determination of vitamin K analogs with high sensitivity and specificity, based on high-performance liquid chromatography-tandem mass-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (LC-APCI-MS/MS).<sup>26</sup> With this procedure, plasma concentrations of PK and MK-7 were 0.73±0.70 ng/mL (median 0.58 ng/mL) and 0.53±0.37 ng/mL (median 0.45 ng/mL), respectively in the current study. In our recent study, plasma concentrations for PK and MK-7 were 1.29±1.09 ng/mL (median 0.94 ng/mL) and 4.21±6.81 ng/mL (median 2.14ng/mL), respectively in the healthy Japanese elderly over 70 years old using the same assay procedure.<sup>21</sup> In the same study, lowest concentration of plasma vitamin K level to avoid the elevation of serum ucOC concentration was 2.5 ng/ml for PK and 6.4 ng/ml for MK-7.<sup>21</sup> Since serum ucOC level is a sensitive indicator of skeletal vitamin K insufficiency, these figures can yield a rough estimate of circulating vitamin K levels needed by the skeleton.

The median intake of vitamin K in the current subjects was 168 μg, which was more than twice the AI in DRI 2005. The AI for vitamin K was not altered in DRI 2010. Dietary vitamin K intake has been identified as an important determinant of plasma phylloquinone concentration in previous studies.<sup>36,37</sup> In the present study, vitamin K intake was also significantly associated with plasma PK, but not with plasma MK-7. Since they were not supplied

with fermented soybean; natto, which contains extraordinary amount of MK-7,<sup>38</sup> phyloquinone from green vegetables is likely to be the major contributors to the total vitamin K intake in our subjects. Thus plasma PK alone correlated with total vitamin K intake, adjusted by serum triglyceride. These data strongly suggest that these subjects are vitamin K-deficient in spite of the fact that their dietary intake is far above the AI in according to DRI 2005, and increased vitamin K intake would be effective in improving plasma PK levels in institutionalized elderly in present study.

As in the case of vitamin K, average dietary intake of vitamin D was around 7 µg/day, which is approximately 140% of the AI in subjects in the present study. Nevertheless, the average serum 25OH-D concentration was only 11.1 ng/mL. Thus, most subjects in the present study had hypovitaminosis D in spite of apparently sufficient vitamin D intake.

Although the multiple regression analysis has identified vitamin D intake as the significant contributor to serum 25OH-D concentration, the R<sup>2</sup> value was low, which indicates that the current model could explain only a small portion of variation. Several factors could be responsible for the above results. First, because of walking disability and other physical dysfunction, the chance of sun exposure was minimal in most of the current study subjects, but it was not null. Thus, sun exposure may also partly explain the above results. Unfortunately, however, detailed information about sun exposure was unavailable. Furthermore, ADL itself has been reported to be related to serum 25OH-D levels,<sup>39</sup> on which detailed information is not available in the current study. Secondly, the intestinal absorption of vitamin D is likely to decrease due to factors such as compromised intestinal ability for nutrients absorption and limited fat intake.<sup>40</sup> Nevertheless, oral vitamin D intake seems to be of value in the institutionalized elderly for improving their vitamin D status. Cashman *et al.* reported dose-dependent increase in serum 25OH-D concentration after incremental supplementation with vitamin D<sub>3</sub> in free-living adults over 64 years of age.<sup>41</sup> Although AI for vitamin D slightly increased to 5.5 µg/day in recently issued DRI 2010, the elderly subjects are likely to require much more vitamin D intake to avoid hypovitaminosis D considering the various problems to interfere with absorption and utilization as discussed above. A second issue with regard to the above discussion; disturbed intestinal absorption and limited fat intake, will also apply to the discrepant intake and circulating level of vitamin K.

Although serum 25OH-D level was extremely low, average serum PTH level was within the reference range. Circulating 25OH-D concentrations showed significant negative correlation with serum PTH levels ( $r = -0.293$ ,  $p = 0.041$ ; data not shown), which suggests that the negative feedback regulation of PTH secretion by vitamin D is not impaired in the current population. Kuchuk *et al.* reported that the elevation of serum PTH concentration by vitamin D deficiency is moderate in its magnitude, and usually fell into the reference range.<sup>42</sup> Thus they stressed the importance of serum 25OH-D level, and argued that for bone health maintenance and physical performance in the

elderly, serum 25OH-D concentration above 50-60 nmol/L (20-24 ng/mL) was required.

Although the institutionalized elderly are considered to be generally malnourished,<sup>43-45</sup> nutritional status appeared rather satisfactory in the present study subjects in face of hypovitaminosis D and K. Then we analyzed the relationship between the overall nutrition and circulating levels of vitamin D and K by PCA. The PCA have yielded four components representing: overall nutritional status, vitamin D status, vitamin K<sub>2</sub> status, and vitamin K<sub>1</sub> status respectively. Serum 25OH-D also exhibited some association with the first component, representing the overall nutritional status. One of the reasons for the above results would be that 25OH-D is bound to vitamin D-binding protein (DBP) and albumin during its transport in circulation.<sup>46</sup> Since these components are independent of each other by their definition, these results suggest that hypovitaminosis D and K in the institutionalized elderly do not merely reflect general malnutrition, and have their own role. Confounders are serious challenge in the clinical studies. In the intervention studies, randomization would eliminate the interference by the confounders. It would be less problematic in the case of cohort studies. Adjustment for confounders is quite difficult in the cross-sectional studies like the current one. Multivariate analyses such as PCA would be of help in eliminating the interference by confounders in this type of studies.

In conclusion, institutionalized elderly had high prevalence of hypovitaminosis D and K in spite of their dietary intake exceeding the AI in DRI 2005 in Japan, which suggests that the requirement for these vitamins would be higher in these subjects. Additionally, hypovitaminosis D and K were shown to be independent of general malnutrition by PCA, which would be a useful analytical procedure for eliminating the interference by confounders in cross sectional studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Health and Labor Science Research Grant entitled "Studies on the Dietary Reference Intakes (Recommended Dietary Allowance) for Japanese" from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

#### AUTHOR DISCLOSURES

None of the authors have any conflicts of interest.

#### REFERENCES

1. Bilezikian JP, Silverberg SJ. The role of parathyroid hormone and vitamin D in the pathogenesis of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. Osteoporosis 2nd ed. San Diego CA: Academic Press; 2001. pp.71-84.
2. Lips P. How to define normal values for serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D? An overview. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FG, editors. Vitamin D 2nd ed. San Diego CA: Academic Press; 2005. pp. 1019-28.
3. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB, Bazemore MG, Zee RY, et al. Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. JAMA. 2004;291:1999-2006.
4. Kuroda T, Shiraki M, Tanaka S, Ohta H. Contributions of 25-hydroxyvitamin D, co-morbidities and bone mass to mortality in Japanese postmenopausal women. Bone. 2009; 44:168-72.

5. Eastell R, Lawrence Riggs B. Vitamin D and osteoporosis. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FG, editors. *Vitamin D* 2nd ed. San Diego CA: Academic Press; 2005. pp.1101-20.
6. Nakamura K, Nishiwaki T, Ueno K, Yamamoto M. Age-related decrease in serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in the frail elderly: a longitudinal study. *J Bone Miner Metab.* 2007;25:232-6.
7. Lips P, van Ginkel FC, Jongen MJ, Rubertus F, van der Vijgh WJ, Netelenbos JC. Determinants of vitamin D status in patients with hip fracture and in elderly control subjects. *Am J Clin Nutr.* 1987;46:1005-10.
8. Lips P, Wiersinga A, van Ginkel FC, Jongen MJ, Netelenbos JC, Hackeng WH, et al. The effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and parathyroid function in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:644-50.
9. Suominen M, Laine T, Routasalo P, Pitkala KH, Rasanen L. Nutrient content of served food, nutrient intake and nutritional status of residents with dementia in a finnish nursing home. *J Nutr Health Aging.* 2004;8:234-8.
10. Przybelski R, Agrawal S, Krueger D, Engelke JA, Walbrun F, Binkley N. Rapid correction of low vitamin D status in nursing home residents. *Osteoporos Int.* 2008;19:1621-8.
11. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet.* 1989;2:1104-5.
12. Nashimoto M, Nakamura K, Matsuyama S, Hatakeyama M, Yamamoto M. Hypovitaminosis D and hyperparathyroidism in physically inactive elderly Japanese living in nursing homes: relationship with age, sunlight exposure and activities of daily living. *Aging Clin Exp Res.* 2002;14:5-12.
13. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J.* 1990; 266:625-36.
14. Booth SL. Skeletal functions of vitamin K-dependent proteins: not just for clotting anymore. *Nutr Rev.* 1997;55:282-4.
15. 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.
16. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, et al. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:79-85.
17. 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.
18. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Serum undercarboxylated osteocalcin and the risk of hip fracture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:717-8.
19. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Bréart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:719-24.
20. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr.* 1996;63:566-73.
21. 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.
22. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr.* 1989;50:100-8.
23. Tse SL, Chan TY, Wu DM, Cheung AY, Kwok TC. Deficient dietary vitamin K intake among elderly nursing home residents in Hong Kong. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2002;11:62-5.
24. Northstone K, Ness AR, Emmett PM, Rogers IS. Adjusting for energy intake in dietary pattern investigations using principal components analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62: 931-8.
25. Kesse-Guyot E, Bertrais S, Péneau S, Estaquio C, Dauchet L, Vergnaud AC, et al. Dietary patterns and their sociodemographic and behavioural correlates in French middle-aged adults from the SU.VI.MAX cohort. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63:521-9.
26. Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T. Suhara Y, Kamao M, et al. Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77:757-63.
27. Resources Council, Science and Technology Agency, Japan. *Standard Tables of Food Composition in Japan*, 5th ed. Tokyo: Printing Bureau, Ministry of Finance; 2000. 2009/11/4 [cited 2000/11/22]; Available from: <http://www.mext.go.jp/english/news/2000/11/001150.htm#top>. (in Japanese).
28. Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan. *Dietary reference intakes for Japanese 2010*. Tokyo: Daiichi-Shuppan; 2010. 2009/11/4 [cited 2009/5/29]; Available from: <http://www.bm.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0529-4.html>. (in Japanese).
29. Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan. *Dietary reference intakes for Japanese 2005*. Tokyo: Daiichi-Shuppan; 2005. 2009/11/4 [cited 2004/11/22]; Available from: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>. (in Japanese).
30. Nakamura K, Nashimoto M, Yamamoto M. Summer/winter differences in the serum 25-hydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone levels of Japanese women. *Int J Biometeorol.* 2000;44:186-9.
31. Nakamura K, Nashimoto M, Hori Y, Yamamoto M. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and related dietary factors in peri- and postmenopausal Japanese women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1161-5.
32. Nakamura K, Nashimoto M, Yamamoto M. Are the serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in winter associated with forearm bone mineral density in healthy elderly Japanese women? *Int J Vit Nutr Res.* 2001;71:25-9.
33. Kaneki M, Hodges SJ, Hosoi T, Fujiwara S, Lyons A, Crean SJ, et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition.* 2001;17:315-21.
34. Nakamura K, Tsugawa N, Saito T, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Hyodo K, et al. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone.* 2008;42:271-7.
35. Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan. *The National Nutrition Survey 2006*. Tokyo: Daiichi-Shuppan; 2009. 2009/11/4 [cited 2008/04]; Available from: <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2.html>. (in Japanese).
36. McKeown NM, Jacques PF, Gundberg CM, Peterson JW, Tucker KL, Kiel DP, et al. Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *J Nutr.* 2002;132:1329-34.
37. Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB Sr, et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63:458-64.
38. Ikeda H, Doi Y. A vitamin-K2-binding factor secreted from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 1990;28:219-24.
39. Nakamura K, Nishiwaki T, Ueno K, Yamamoto M. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and activities of daily living in

- noninstitutionalized elderly Japanese requiring care. *J Bone Miner Metab.* 2005;23:488-94.
40. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, et al. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporos Int.* 2009;20:935-42.
41. Cashman KD, Wallace JM, Horigan G, Hill TR, Barnes MS, Lucey AJ, et al. Estimation of the dietary requirement for vitamin D in free-living adults  $\geq 64$  y of age. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1366-74.
42. Kuchuk NO, Pluijm SM, van Schoor NM, Looman CW, Smit JH, Lips P. 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.* 2009;94:1244-50.
43. Visvanathan R. Under-nutrition in older people: a serious and growing global problem! *Visvanathan R. J Postgrad Med.* 2003;49:352-60.
44. Kagansky N, Berner Y, Koren-Morag N, Perelman L, Knobler H, Levy S. Poor nutritional habits are predictors of poor outcome in very old hospitalized patients. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:784-91.
45. Vellas B, Lauque S, Andrieu S, Nourhashemi F, Rolland Y, Baumgartner R, et al. Nutrition assessment in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001;4:5-8.
46. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:954-9.



## Original Article

## Hypovitaminosis D and K are highly prevalent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly

Akiko Kuwabara PhD<sup>1</sup>, Masako Himeno MSc<sup>1</sup>, Naoko Tsugawa PhD<sup>2</sup>,  
Maya Kamao MSc<sup>2</sup>, Minoru Fujii RD<sup>3</sup>, Nobuko Kawai CSW<sup>3</sup>, Miyuki Fukuda MSc<sup>1</sup>,  
Yoko Ogawa MSc<sup>1</sup>, Shoko Kido PhD<sup>1</sup>, Toshio Okano PhD<sup>2</sup>, Kiyoshi Tanaka MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University, Higashiyama, Japan

<sup>2</sup>Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Higashiyama, Japan

<sup>3</sup>Nursing Home Kayu-Shirakawa, Higashiyama, Japan

### 居住機構中的老年人有高盛行率的維生素 D 及維生素 K 缺乏症且與整體的營養不良無相關

研究老年人的維生素 D 及維生素 K 缺乏症有許多方法學上的問題。首先，大多研究是藉由評估食物的攝取或是測量血中的濃度來進行的，但在日本很少同時利用這兩種方法。在本篇文章中，維生素 D 及維生素 K 的攝取以及老年人的血中濃度是同步測量的。第二個議題是維生素 D 及維生素 K 缺乏症是否與盛行於老年人的一般營養不良情形相關。我們試著藉由統計的主成份分析方法去分辨。評估 50 位機構中的老年人血中的 25-羥化維生素 D、副甲狀腺素、維生素 K<sub>1</sub>、維生素 K<sub>2</sub> 濃度，以及食物攝取。雖然平均維生素 D 攝取量(每天 7 克)超過日本所訂定的足夠攝取量(每天 5 克)，但平均血清中 25-羥化維生素 D 濃度(11.1 ng/mL)卻屬維生素 D 缺乏的範圍。維生素 K 攝取量的中位數為每天 168 克，這幾乎是維生素 K 的足夠攝取量的 2.5 倍。但是，血漿中維生素 K<sub>1</sub> 及維生素 K<sub>2</sub> 濃度是遠低於 70 歲以上健康的日本老人。應用主成份分析法，結果產生 4 個成份，分別代表整體營養狀況、維生素 K<sub>2</sub>、維生素 D 及維生素 K<sub>1</sub> 的營養狀況。既然每個成份都各自獨立，則這些老人的維生素 D 及維生素 K 缺乏不能用整體營養不良加以解釋。總之，在這些機構中的老年人具有高盛行率的維生素 D 及維生素 K 缺乏；爾後這類研究應該同時測量血中濃度及飲食攝取。主成份分析法，可排除橫斷性研究中其他干擾因子的作用，而得到有效的結果。

**關鍵字：**維生素 D 缺乏、維生素 K 缺乏、主成份分析、足夠攝取量、機構中的老年人

## 特集「日本人の食事摂取基準(2010年版)」

## 日本人の微量ミネラルの食事摂取基準 (2010)

関西大学化学生命工学部食品工学研究室

吉田 宗弘

Vitamins (Japan), 84 (5・6), 240-245 (2010)

## Dietary Reference Intakes of Trace Minerals for Japanese (2010)

Munehiro Yoshida

Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

**Key words:** Japanese, dietary reference intake, iron, zinc, copper, manganese, iodine, selenium, chromium, molybdenum

## はじめに

日本人の食事摂取基準 2010 年版におけるミネラルの区分は、「多量ミネラル(ナトリウム, カリウム, カルシウム, マグネシウム, リン)」と「微量ミネラル(鉄, 亜鉛, 銅, マンガン, ヨウ素, セレン, クロム, モリブデン)」である。本稿では「微量ミネラル」に関して, その呼称, 範囲, 順序を決めた経緯を概説し, 次いで各微量ミネラルの食事摂取基準策定の根拠と今後の課題について述べる。なお, 各微量ミネラルの食事摂取基準の詳細は, 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書<sup>1)</sup>もしくは他誌に記載されている解説<sup>2)</sup>を参照していただきたい。

## 1. 呼称, 範囲, 順序

食事摂取基準 2005 年版では鉄以下の 8 元素を「微量元素」と呼んでいた。これは trace elements を邦訳したものであり, 学術的には誤りでない。しかし, 医学・生物学分野における微量元素には, 水銀やカドミウムなど, ヒトにおける非必須元素も含まれている。食事摂取基準で扱う無機元素は栄養上必須のものに限定していることから, 栄養学分野で馴染み深い「ミネラル」という用語を「元素」と置き換え, 「微量ミネラル」という呼称を採用した。また, これに合わせて, ナトリウム, カリウム, カルシウム, マグネシウム, リンについても, 「多量ミネラル」としてまとめることとした。

摂取基準で扱う微量ミネラルの範囲についても食事摂

取基準策定検討会ミネラルワーキンググループにおいて検討した。とくにフッ素について, う歯予防の観点から食事摂取基準を策定することの是非を検討した。しかし, フッ素はヒトにおいて欠乏症は認められておらず栄養学上の必須元素ではない。しかも, う歯予防の効果を得るに必要と推定される摂取量は日常の食事から摂取できる量を大幅に超えている。これらの理由により, フッ素は食事摂取基準が扱う微量ミネラルの範囲には含めないこととした。

報告書におけるミネラルの掲載順序についても検討した。当初は原子番号, アルファベット, アイウエオなど, 機械的に順序を決める案が有力であったが<sup>3)</sup>, 現実の献立作成での優先度, および食品成分表や国民健康・栄養調査における掲載順序を考慮し, 微量ミネラルに関しては, 鉄, 亜鉛, 銅, マンガン, ヨウ素, セレン, クロム, モリブデンの順にすることとした。今後, 栄養学のテキストにおいて, 微量ミネラルという呼称とこの順序が定着することを期待している。

## 2. 鉄の食事摂取基準

鉄の食事摂取基準を付録(p249 参照)に示した。鉄の食事摂取基準は, 2005 年版と同様に, 米国/カナダの食事摂取基準(以下, 米国と略記)<sup>3)</sup>でも採用されている要因加算法にもとづいて策定した。別の方法, とくに集団データ解析法についても検討したが, 日本人では, 鉄欠乏の指標とされる血清フェリチン濃度が食事からの鉄摂取量

以外の要因に依存して変動することが報告されていることから<sup>4)</sup>、今回の策定においても要因加算法を採用することとした。

要因加算法における要因とは、基本的損失(大半は消化管排泄)、月経血への損失、成長に伴う蓄積(大半は血液量増加によるヘモグロビンの増加)、妊娠・授乳に伴う需要増加、および消化管吸収率である。すなわち、鉄の推定平均必要量は、「(基本的損失+経血損失(思春期以降の閉経前女性のみ)+妊娠・授乳に伴う需要増加(妊娠・授乳期のみ)+成長に伴う蓄積(成長期のみ))÷消化管吸収率」の式を用いて算定し、推奨量は推定平均必要量に1.2(成長期は1.4)を乗じて策定した。いずれの要因についても、鉄栄養が健全と推定されるヒトを対象とした内外の研究から妥当と思われる数値を採用した。2005年版と比較した場合、妊婦付加量以外は、基準体位の変化に伴う軽微な変更が生じたのみである。ただし、経血損失量と消化管吸収率に関しては、以下に述べるように、日本人を対象とした詳細な研究が今後必要と思われる。

今回の策定では、18歳以上の経血量として37 mL/回、月経周期31日を採用した<sup>5)</sup>。しかし、これらの数値の根拠となる日本人の経血量についての研究は、きわめて例数が少なく、かつ対象としているのはいずれも小地域の特定集団である<sup>6)7)</sup>。しかも中には1960年代に実施されたものもある。半世紀前と現在とでは女性の体位も変化し、かつ生活環境が大きく異なっていることから、現代女性を対象とした大規模な経血に関する調査が行われることを期待する。

同様に、鉄の消化管吸収率についても日本人を対象にした研究が見当たらないため、欧米の研究にもとづきFAO/WHOが指示している15%を用いた<sup>8)</sup>。しかし、食事の鉄の吸収率は、鉄の形態、共存成分、鉄摂取量に伴い変化することから、日本人が日常的な献立を摂取した場合の数値を求める必要がある。

妊娠中の鉄付加量は、妊娠に伴う鉄需要増加(胎児・胎盤・臍帯への鉄蓄積と妊娠に伴う循環血液量増加)をもとに算定できる。2005年版においてはWHOの需要量増加推定値<sup>9)</sup>を採用したが、2010年版では日本人の体格をもとに循環血液量増加を少なく見積もったので付加量は小さな数値になった。それでも妊娠中期以降(18~29歳)の付加量を加えた推定平均必要量と推奨量は、それぞれ17.5 mg/日と21.0 mg/日となり、一般的な献立からは達成が困難な数値となる。しかし、現実には、妊娠女性の貧血有病率は一般女性よりもわずかに高い程度である<sup>10)</sup>。この矛盾は、おそらく妊娠中の鉄需要増加に伴う鉄吸収率の増加がきわめて大きいことに起因していると推定できる。そこで、日本人の妊娠女性の鉄吸収率を40%<sup>11)</sup>と高めに見積もった場合の妊娠中期以降の付加量を推定平均必要量8.0 mg/日、推奨量9.5 mg/日と試算した。この試算値にもとづけば、妊娠中期以降(18~29歳)の鉄摂

取の付加量を加えた推定平均必要量と推奨量は、それぞれ13.0 mg/日と15.5 mg/日となる。吸収率40%の科学的根拠が低いと、これらの試算値は、食事摂取基準としては採用できなかったが、妊娠女性の鉄摂取の現実的な目標といえるだろう。

なお耐容上限量に関しては、新規な報告が見当たらないため2005年版同様に、FAO/WHOの暫定耐容最大1日摂取量0.8 mg/kg<sup>12)</sup>にもとづき策定した。ヒトを対象にして上限量策定に有用な実験を行うことは倫理的に難しい。しかし、多種多様な鉄サプリメントや鉄強化食品が市販されていることから、鉄を大量摂取している症例が存在している可能性は高い。このような症例は、健康障害が認められなくても、上限量策定にとっては有用であることから、積極的に報告されることを希望するものである。

### 3. 亜鉛の食事摂取基準

亜鉛の食事摂取基準を付録(p249参照)に示した。亜鉛の食事摂取基準も2005年版と同様に、米国<sup>13)</sup>でも採用されている要因加算法で求めた。すなわち、「総排泄量=腸管内因性排泄量+尿中排泄量+体表消失量+精液または月経血への損失量」と考え、総排泄量に見合う真の吸収量を与える摂取量を「真の吸収量=1.113×摂取量<sup>0.5462</sup>」の式より算定し、男性11.18 mg/日、女性10.03 mg/日という数値を得た。要因中でもっとも寄与の大きい腸管内因性排泄量を求める関係式は男性を対象とした英米の複数の研究から得られるが、これらの研究における対象者の体重は特定できなかった。そこで、この腸管内因性排泄量は米国人男性の基準体位である76 kgの人に対するものであると考え、最終的に得られた上記摂取量を76 kgの人に対する推定平均必要量とした。そして18歳以上は体重比の0.75乗、12~17歳は体重比の0.75乗と成長因子を用いて外挿し、性・年齢階級別の推定平均必要量を策定した。1~11歳に関しては、日本人小児を対象とした出納試験における平衡維持量<sup>14)</sup>と米国人の値から推定した小児の体表損失量にもとづいて推定平均必要量を策定した。推奨量は推定平均必要量に1.2を乗じて求めた。2005年版では総排泄量を求めるための要因の一部に体重の小さい日本人の数値を用いていた。このため2010年版において、とくに成人の数値は男女ともに2005年版に比較して大きな数値になった。

以上から明らかなように、亜鉛の食事摂取基準策定の根拠となっている研究は、そのほとんどが欧米のものである。最大の寄与要因である腸管内因性排泄量に関して、日本人を対象にして安定同位体を用いた研究が待たれる。

亜鉛の耐容上限量は、鉄と同様に新規な報告が見当たらないため、2005年版において採用した米国の成人女性を対象とした研究から得られる最低健康障害発現量60 mg/日<sup>15)</sup>と不確実性因子1.5にもとづいて策定した。ただし各年齢階級への外挿においては、2005年版とは異な

り、男女ともに年齢階級別基準体重の 61 kg (米国成人女性の基準体重) に対する比を用いた。このため 2010 年版の耐容上限量は、男性において 2005 年版よりも大きな数値になった。亜鉛サプリメントや亜鉛強化食品が市販されていることから、今後は亜鉛大量摂取の症例を積極的に報告することが必要といえる。

#### 4. 銅の食事摂取基準

銅の食事摂取基準を付録 (p249 参照) に示した。銅の摂取基準は、銅の栄養状態を示すバイオマーカー (血漿銅濃度、血漿スーパーオキシドジスムターゼ活性など) の値が低下しない最小の摂取量 (0.72 mg/日)<sup>16)17)</sup> にもとづき策定した。この方法は 2005 年版と同じであり、米国<sup>18)</sup> も採用している。したがって 2010 年版の数値は、2005 年版に比較して基準体位の変化に伴う軽微な変更のみである。2005 年版発表直後は、推奨量が 6 次改定栄養所要量の約半分の数値になったため、相当な論議を呼んだが、この 5 年の間に上記 0.72 mg/日を推定平均必要量策定の基準値にすることを支持する報告<sup>19)</sup> が提出されており、今後もよほどのことがない限り、大きな変更はないと思われる。耐容上限量に関しても、新規な報告が見当たらないため、2005 年版をそのまま踏襲した。

#### 5. マンガンの食事摂取基準

マンガンの食事摂取基準を付録 (p249 参照) に示した。マンガンの食事摂取基準に関しては、2005 年版と同様に、日本人のマンガン摂取量にもとづいて目安量を設定するにとどめた。これは、短期間の出納実験から求められるマンガンの平衡維持量の信頼性を米国同様に低いと判断しているためである。日本人のマンガン摂取量に関する報告も増えていないので、2005 年版と同様に、複数の報告値に基づいて成人日本人の平均的なマンガン摂取量を 3.7 mg/日と見積もった<sup>20)</sup>。そして、エネルギー摂取量の性差を考慮し、男性 4.0 mg/日、女性 3.5 mg/日を 18 歳以上の目安量とした。なお、国民健康・栄養調査の元データと食品成分表に付記されている食品中マンガン濃度にもとづいて成人の性・年齢階級別マンガン摂取量を試算したところ、上記目安量は、日本人のマンガン摂取量の中央値にほぼ一致していた。マンガンは穀物をはじめとする植物性食品に多く含有されている。このため日本人のマンガン摂取量は米国人の約 1.5 倍である。したがって日本人のマンガン摂取の目安量も米国の目安量<sup>21)</sup> の約 1.5 倍となっている。

以上のように、マンガンは、微量ミネラル中で唯一、推定平均必要量と推奨量が策定できなかった。マンガンは、欠乏症もほとんど認められず、研究者の関心を引きにくい微量栄養素かもしれない。しかし、推定平均必要量策定に根拠を与える質の高い研究が国内の研究者によって行われることを期待している。

#### 6. ヨウ素の食事摂取基準

ヨウ素の食事摂取基準を付録 (p249 参照) に示した。ヨウ素の食事摂取基準は、2005 年版に比較して、推定平均必要量と推奨量は数値の丸め方に伴う軽微な変更であったのに対して、耐容上限量は大きな変更が加わった。ここでは耐容上限量について述べる。

米国<sup>22)</sup> では、健康人 (ヨウ素摂取量約 300  $\mu$ g/日) へ 1500  $\mu$ g/日のヨウ素を負荷した場合に甲状腺機能低下が起こること<sup>23)</sup> から、上限量を 1100  $\mu$ g/日としている。2005 年版では、一般的な日本人のヨウ素摂取は最大で 3000  $\mu$ g/日と推定できるが<sup>24)25)</sup>、ヨウ素の過剰摂取に起因する甲状腺機能低下が認められないこと、および北海道住民を対象にした研究<sup>26)</sup> から甲状腺機能低下が生じるヨウ素摂取量は 10 mg/日であると判断できることから、上限量を 3000  $\mu$ g/日としていた。しかし、最近に行われた、中国<sup>27)</sup>、およびアフリカ<sup>28)</sup> における研究は、継続的な 1500  $\mu$ g/日程度のヨウ素摂取が甲状腺腫の有病率を上昇させることを示しており、日本人のヨウ素摂取と甲状腺機能の関連について再検討する必要があると判断された。

まず、日本人のヨウ素摂取量を尿中ヨウ素排泄量<sup>29)</sup>、および昆布の消費量<sup>30)</sup> の両面から検討し、日本人のヨウ素摂取量は、日常的には 500  $\mu$ g/日未満であるが、間欠的に海藻類を大量に摂取するために平均的には約 1500  $\mu$ g/日になると推定した。次に、2005 年版において上限量策定の根拠とした北海道住民を対象とした疫学研究<sup>26)31)</sup> を再検討し、成人日本人におけるヨウ素の健康障害非発現量を 3300  $\mu$ g/日と推定した。そして、諸外国で行われているヨウ素過剰障害に関する研究に配慮し、安全性を高める観点から不確実性因子を 1.5 と見積もり、18 歳以上の耐容上限量を 2005 年版よりも 800  $\mu$ g/日小さい 2200  $\mu$ g/日とした。

一方、ヨウ素摂取が約 750  $\mu$ g/日である北海道の小学生において甲状腺容積の有意な増大が認められており、小児ではヨウ素摂取が 500  $\mu$ g/日を超えると有害な影響が生じると考えられている<sup>32)</sup>。これにもとづき、6~11 歳の耐容上限量を 500  $\mu$ g/日とし、他の性・年齢階級にはこの値と成人の値から体重比で外挿した数値を適用した。また、ヨウ素過剰摂取と推定される乳児のヨウ素摂取量<sup>33)</sup> にもとづき、乳児の耐容上限量は 250  $\mu$ g/日とした。なお、これらの 18 歳未満に対するヨウ素の耐容上限量は 2010 年版において初めて策定したものである。

ヨウ素の耐容上限量の策定において痛感したことは、日本人のヨウ素摂取量を推定している論文が意外に少ないということであった。日本人が本当に米国の耐容上限量を上回るヨウ素を摂取しているのであれば、なぜ過剰障害が起こらないのかを真剣に検討すべきである。その場合、ゴイトロゲン (造甲状腺腫物質) として知られるイソフラボン含有する大豆製品がヨウ素の影響をどの程

度修飾しているかも検討課題と思う。国内におけるヨウ素の医学・生物学的研究の多くは、内分泌学や小児科学の臨床系研究者に委ねられている。これらの研究者と分析学者、および栄養学者が一同に会して、ヨウ素の耐容上限量について議論することが必要と感じている。

## 7. セレンの食事摂取基準

セレンの食事摂取基準を付録(p249参照)に示した。セレンの推定平均必要量は、2005年版と同様に、克山病のようなセレン欠乏症を予防するのに必要なセレン摂取量という観点から、血漿の含セレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)の活性が飽和値の3分の2の値を示すときのセレン摂取量にもとづき策定した。この考え方は、セレン欠乏症の予防には血漿GPX活性が飽和値の3分の2の値で十分とするWHOの報告<sup>34)</sup>にもとづくものである。米国<sup>35)</sup>などでは、推定平均必要量を血漿GPX活性をちょうど飽和させるセレン摂取量としているため、わが国の策定値は、欧米に比べると低い水準にある。

一方、セレンの耐容上限量は、2005年版に大きな変更を加えた。2005年版では、米国<sup>35)</sup>と同様に、慢性セレン中毒症状を指標にしたセレンの健康障害非発現量(13.3 $\mu$ g/kg/日)<sup>36)</sup>と不確実性因子2を用いて上限量を設定していた。しかし、2010年版では、米国において、血清セレン濃度が121.6 $\mu$ g/L(セレン摂取量84 $\mu$ g/日に相当)以上の集団に200 $\mu$ g/日のセレンをセレン酵母サプリメントとして投与すると2型糖尿病の発生率が有意に上昇したと報告されたことから<sup>37)</sup>、セレン摂取量が100 $\mu$ g/日に近い人が200 $\mu$ g/日のセレンをサプリメントから付加的に摂取し続けることは健康に対して好ましくない影響を与える可能性があるとして判断した。そこで、性・年齢階級別体重が最大である30～49歳男性(基準体重68.5kg)の耐容上限量を300 $\mu$ g/日とし、他の年齢階級には300 $\mu$ g/68.5kg/日=4.4 $\mu$ g/kg/日を適用した。なお、この4.4 $\mu$ g/kg/日という数値は、慢性セレン中毒を指標にした場合の健康障害非発現量に不確実性因子3を適用したのと結果的に同じであるので、2010年版の耐容上限量は2005年版のほぼ3分の2の値となった。

低セレン摂取がいくつかのがんの発生リスクを高めるという報告は多い。これらの研究の多くは、対象者を血清セレン濃度などを指標に複数の集団に分割し、がんの発生リスクを集団間で比較している。しかし、セレン摂取とがん発生率に有意な関連が認められるのは、対象者全体のセレン栄養状態が低いときのみである<sup>38)</sup>。たとえば、有意な関連ありとする一報告<sup>39)</sup>では、もつとも高いセレン栄養状態である集団の血清セレン濃度は78 $\mu$ g/L(セレン摂取量54 $\mu$ g/日に相当)以上であるのに対して、関連なしとする別の報告<sup>40)</sup>でもつとも低いセレン栄養状態である集団の血清セレン濃度は99 $\mu$ g/L(セレン摂取量69 $\mu$ g/日に相当)未満である。これらの研究結果にも

とづき、がん予防に適切なセレン摂取量を目分量として定めることも検討したが、科学的証拠が小さく、時期尚早と判断した。

## 8. クロムの食事摂取基準

クロムの食事摂取基準を付録(p249参照)に示した。米国ではクロムの食事摂取基準として、クロム摂取量にもとづいて目安量を策定している<sup>41)</sup>。しかし、わが国では、食品中クロムに関して信頼性の高い分析値の報告が少なく、クロム摂取量を正確に見積もることが不可能である。このため、2010年版においても、2005年版と同様に、外国の高齢者を対象とした出納実験<sup>42)43)</sup>の結果にもとづき、推定平均必要量を策定した。したがって、2010年版の推定平均必要量と推奨量は、2005年版に基準体位の変化に伴う軽微な変更が加わっただけである。

糖尿病患者に200～1000 $\mu$ g/日のクロムサプリメントを投与すると症状の改善が認められる。しかし、健康な人へのクロムサプリメント投与が健康にとって好ましい影響を与えることは認められていない<sup>44)</sup>。一方、200～1000 $\mu$ g/日のクロムサプリメント継続摂取による副作用の報告が散発的に認められるが<sup>45)</sup>、いずれも同時に服用していた医薬品やサプリメント類の影響を否定できない。以上より、クロム摂取と健康障害との量・反応関係に関する研究は不十分と判断し、2005年版と同様にクロムの耐容上限量設定は見合わせた。しかし、このことが200～1000 $\mu$ g/日のクロム摂取が無害であることを保証するものではないことを強調したい。

なお、乳児の目安量に関して、日本人の母乳中濃度に関する報告<sup>46)</sup>が新たに提出されたため、2010年版において初めてこれを策定した。

## 9. モリブデンの食事摂取基準

モリブデンの食事摂取基準を付録(p249参照)に示した。モリブデンの食事摂取基準は、2005年版に比較して、推定平均必要量と推奨量は基準値から各性・年齢層への外挿法の統一に伴う軽微な変更であったのに対して、耐容上限量は大きな変更が加わった。ここでは耐容上限量について述べる。

2005年版ではアルメニアで発生した事例<sup>47)</sup>にもとづいて、モリブデンの耐容上限量を5 $\mu$ g/kg/日(体重60kgのヒトで300 $\mu$ g/日)としていた。しかし、この事例報告には多くの問題点があり、記載されている所見にモリブデンが関わることは疑わしいと判断した。一方、日本人のモリブデン摂取量を150～350 $\mu$ g/日と見積もる報告<sup>48)49)</sup>が提出され、日本人にモリブデン過剰摂取に伴う健康障害の報告がないことから、2005年版の上限量は厳し過ぎるという指摘もなされていた。欧米の食事摂取基準<sup>50)51)</sup>では、ラットにおけるモリブデンの健康障害非発現量(900 $\mu$ g/kg/日<sup>52)</sup>)にもとづいて上限量を策定している。そこで

2010年版では、ラットの健康障害非発現量にヨーロッパ食品科学委員会<sup>51)</sup>が用いている不確実性因子100を適用し、9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (体重60kgのヒトで540 $\mu\text{g}/\text{日}$ )をモリブデンの耐容上限量の基準値とした。米国における出納実験<sup>52)</sup>からは、ヒトにおけるモリブデンの健康障害非発現量を18 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と解釈できるため、上記の9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ はヒトの健康障害非発現量に不確実性因子2を適用したことにもなる。

なお、乳児の目安量に関して、クロムと同様に日本人の母乳中濃度に関する報告<sup>46)54)</sup>が新たに提出されたため、2010年版において初めてこれを策定した。

### おわりに

以上、微量ミネラルの食事摂取基準策定の根拠と今後の課題について、成人の平均推定必要量と耐容上限量を中心に解説した。いずれのミネラルに関しても、2005年版に比較して策定根拠はより明快になったものと判断している。2015年版に向けては、本文でふれたことに加えて、離乳食からの微量ミネラル摂取量、サプリメントやミネラル強化食品摂取による大量摂取者の把握なども必要と思われる。食事摂取基準策定に必要な情報を得るための研究は地味であり、脚光を浴びることは少ない。しかし、栄養学が定量的な学問であり、その目的が人々に「何を」「どれだけ」「どのようにして」食べるのがよいかを示すことにあると信じている立場からは、より多くの栄養学研究者が食事摂取基準に注目し、その策定に活用できる研究に取り組まれることを期待している。

### 文 献

- 厚生労働省(2009)日本人の食事摂取基準[2010年版], pp. 218-267, 第一出版, 東京
- 吉田宗弘(2009)微量ミネラル. 臨床栄養 115, 553-564.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Iron" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 290-393, National Academies Press, Washington D.C.
- Asakura K, Sasaki S, Murakami K, Takahashi Y, Uenishi K, Yamakawa M, Nishiwaki Y, Kikuchi Y, Takebayashi T (2009) Iron intake does not significantly correlate with iron deficiency among young Japanese women: a cross-sectional study. *Public Health Nutr* 12, 1373-1383
- Yokoi K (2003) Numerical methods for estimating iron requirements from population data. *Biol Trace Elem Res* 95, 155-172
- 矢野知佐子, 富安俊子, 穴井孝信(2005)正常月経周期日数とその変動範囲に関する調査. 母性衛生 45, 496-502
- 野上保治(1966)経血量に関する研究. 日本不妊学会雑誌 11, 189-203.
- FAO/WHO (1988) Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub> (FAO Food and Nutrition Series No. 23), pp. 33-50, FAO/WHO, Rome
- Bothwell TH, Charlton RW (1981) Iron deficiency in women. pp. 7-9, The Nutrition Foundation, Washington D.C
- Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, Ishida H, Abe S (2003) Nutritional status of pregnant and lactating women in Japan: A comparison with non-pregnant/non-lactating controls in the National Nutrition Survey. *J Obstet Gynaecol Res* 29, 96-103
- Kamei A, Uenishi K, Ishida M, Suzuki H (2001) Iron intake and absorption in pregnant and lactating women. *Ann Nutr Metab* 45 (Suppl), 44-45.
- FAO/WHO (1983) Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-seventh report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (WHO Technical Report Series, No. 696). FAO/WHO, Rome
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Zinc" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 442-501, National Academies Press, Washington D.C
- 鈴木和春, 五島孜郎, 菅家祐輔(1983)小児期における亜鉛および銅出納について, 日本栄養・食糧学会誌 36, 231-237
- Fosmire G (1990) Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 51, 225-227
- Turnlund JR, Keen CL, Smith RG (1990) Copper status and urinary and salivary copper in young men at three levels of dietary copper. *Am J Clin Nutr* 51, 658-664
- Turnlund JR, Scott KC, Peiffer GL, Jang AM, Keyes WR, Keen CL, Sakanashi TM (1997) Copper status of young men consuming a low-copper diet. *Am J Clin Nutr* 65, 72-78
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Copper" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 224-257, National Academies Press, Washington D.C
- Araya M, Olivares M, Pizarro F, González M, Speisky H, Uauy R (2003) Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure. *Am J Clin Nutr* 77, 646-650.
- 白石久二雄(1994)微量元素の摂取量. 臨床栄養 84, 381-389
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Manganese" in 'Dietary reference intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 394-419, National Academies Press, Washington D.C
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Iodine" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 258-289, National Academies Press, Washington D.C
- Gardner DF, Centor RE, Utiger RD (1988) Effects of low dose oral iodine supplementation on thyroid function in normal men. *Clin Endocrinol* 28, 283-288
- Suzuki M, Tamura T (1985) Iodine intake of Japanese male university students: Urinary iodine excretion of sedentary and physically active students and sweat iodine excretion during exercise. *J Nutr Sci*

- Vitaminol* 31, 409-415
- 25) Katamine S, Mamiya Y, Sekimoto K, Hoshino N, Totsuka K, Naruse U, Watabe A, Sugiyama R, Suzuki M (1986) Iodine content of various meals currently consumed by urban Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol* 32, 487-495
- 26) Konno N, Makita H, Yuri K, Iizuka N, Kawasaki K (1994) Association between dietary iodine intake and prevalence of subclinical hypothyroidism in the coastal regions of Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 393-397
- 27) Zhao J, Wang P, Shang L, Sullivan KM, van der Haar F, Maberly G (2000) Endemic goiter associated with high iodine intake. *Am J Public Health* 90, 1633-1635
- 28) Seal AJ, Creeke PI, Gnat D, Abdalla F, Mirghani Z (2006) Excess dietary iodine intake in long-term African refugees. *Public Health Nutr* 9, 35-39
- 29) Fuse Y, Saito N, Tsuchiya T, Shishiba Y, Irie M (2007) Smaller thyroid gland volume with high urinary iodine excretion in Japanese schoolchildren: Normative reference values in an iodine-sufficient area and comparison with the WHO/ICCIDD reference. *Thyroid* 17, 145-155
- 30) Nagataki S (2008) The average of dietary iodine intake due to the ingestion of seaweed is 1.2 mg/day in Japan. *Thyroid* 18, 667-668
- 31) 今野則道, 飯塚徳男, 川崎君王, 田口英雄, 三浦錦一, 田口静子, 村上茂樹, 萩原康司, 野田靖子, 鶴川純男(1994) 北海道在住成人における甲状腺疾患の疫学的調査-ヨード摂取量と甲状腺機能との関係-. 北海道医誌 69, 614-626
- 32) Zimmermann MB, Ito Y, Hess SY, Fujieda K, Molinari L (2005) High thyroid volume in children with excess dietary iodine intake. *Am J Clin Nutr* 81, 840-844
- 33) Nishiyama S, Mikeda T, Okada T, Nakamura K, Kotani T, Hishinuma A (2004) Transient hypothyroidism or persistent hyperthyrotropinemia in neonates born to mothers with excessive iodine intake. *Thyroid* 14, 1077-1083
- 34) WHO/FAO/IAEA (1996) "Selenium" in 'Trace elements in human nutrition and health' pp. 105-122, WHO, Geneva
- 35) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Selenium" in 'Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids' pp. 284-324, National Academy Press, Washington D. C
- 36) Yang G-Q, Zhou R-H (1994) Further observations on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 8, 159-165
- 37) Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME (2007) Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 147, 217-223
- 38) Zhuo H, Smith AH, Steinmaus C (2004) Selenium and lung cancer: A quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 771-778
- 39) Knekt P, Aromaa A, Maatela J, Alfthan G, Aaran RK, Hakama M, Hakulinen T, Peto R, Teppo L (1990) Serum selenium and subsequent risk of cancer among Finnish men and women. *J Natl Cancer Inst* 82, 864-868
- 40) Kabuto M, Imai H, Yonezawa C, Neriishi K, Akiba S, Kato H, Suzuki T, Land CE, Blot WJ(1994) Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 465-469
- 41) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Chromium" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc' pp. 197-223, National Academy Press, Washington D. C.
- 42) Bunker VW, Lawson MS, Delves HT, Clayton BE (1984) The uptake and excretion of chromium by the elderly. *Am J Clin Nutr* 39, 797-802
- 43) Offenbacher EG, Spencer H, Dowling HJ, Pi-Sunyer FX (1986) Metabolic chromium balances in men. *Am J Clin Nutr* 44, 77-82
- 44) Balk EM, Lau J, Tatsioni A, Pittas AG, Lichtenstein AH (2007) Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: A systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes Care* 30, 2134-2163
- 45) Lamson DW, Plaza SM (2002) The safety and efficacy of high-dose chromium. *Altern Med Rev* 7, 218-235
- 46) Yoshida M, Takada A, Hirose J, Endō M, Fukuwatari T, Shibata K (2008) Molybdenum and chromium concentrations in breast milk from Japanese women. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2247-2250
- 47) Kovalsky VV, Yarovaya GA, Shmavonyan DM (1961) The change in purine metabolism of humans and animals under the conditions of molybdenum biogeochemical provinces. *Zh Obshch Biol* 22, 179-191
- 48) Hattori H, Ashida A, Itō C, Yoshida M (2004) Determination of molybdenum in foods and human milk, and an estimation of average molybdenum intake in the Japanese population. *J Nutr Sci Vitaminol* 50, 404-409
- 49) Yoshida M, Hattori H, Ōta S, Yoshihara K, Kodama N, Yoshitake Y, Nishimuta M (2006) Molybdenum balance in healthy young Japanese women. *J Trace Elem Med Biol* 20, 245-252
- 50) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2001) "Molybdenum" in 'Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc' pp. 420-441, National Academy Press, Washington D. C
- 51) Scientific Committee on Food (2000) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Molybdenum. European Commission, Brussels, download from [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80h\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80h_en.pdf)
- 52) Fungwe TV, Buddingh F, Demick DS, Lox CD, Yang MT, Yang SP (1990) The role of dietary molybdenum on estrous activity, fertility, reproduction and molybdenum and copper enzyme activities of female rats. *Nutr Res* 10, 515-524
- 53) Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL (1995) Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum. *Am J Clin Nutr* 62, 790-796
- 54) 吉田宗弘, 伊藤智恵, 服部浩之, 芦田茜, 米久保明得, 西牟田守 (2004) 日本における母乳および調整粉乳中のモリブデン濃度と乳児のモリブデン摂取量. 微量栄養素研究 21, 59-64.

## ビタミン D による骨折予防効果の意義：医療経済の視点から

### Fracture Prevention by Vitamin D: from the Perspectives of Health Economy

ビタミン研究において、基礎研究、疫学・臨床研究は、お互いに合い補いあう関係であろうが、もう一つの研究分野は、社会におけるビタミンの役割である。しかし、このような研究はわが国では従来ほぼ皆無なので紹介したい。ほとんどの読者にとって、ふだん聞きなれない用語・概念がでてくることや一部に私見が入っている点にご容赦願いたい。なお、筆者は骨粗鬆症を主な研究分野としており、以下ビタミン D による骨折抑制を例として述べる。

本稿における骨折の記述は、大腿骨近位部骨折が主となるので、最初に簡単に説明しておく。この骨折はいわゆる「足の付け根」が折れるもので、高齢者に多い。受傷後 1 年以内の死亡率が高いだけでなく、死亡をまぬがれても、生活レベルが低下するため、要介護の原因となる例も少なくない。このことは患者本人にとって、大きな不幸であることは言うまでもないが、医療費・介護に要する費用も莫大であり、社会に及ぼす影響も大きい<sup>1)</sup>。従って、大腿骨近位部骨折の予防は医学的にも、社会的にも緊急の課題となっている。

近年種々の骨粗鬆症治療薬が臨床現場で用いられているが、主に投与されているのは骨吸収抑制薬である。その代表である bisphosphonate 系薬剤は、強力な骨吸収抑制薬であり、骨折の発生率を半減させるほどの効果を示す。最近一部の国と地域では、人口の高齢化にも関わらず、大腿骨近位部骨折の発生率が減少しており、その減少は骨密度測定の普及や bisphosphonate のような新薬の処方との関連が考えられている<sup>2)</sup>。これに勝るとも劣らない新薬が近年さらに次々と開発されている。このような画期的新薬と比べると、ビタミンをはじめとする栄養療法の効果は小さい。

最近欧米においては、医療行為は有効であることを証明しただけでは不十分で、かけた費用に見合うだけの効果を挙げることを示す必要があると考えられている<sup>3)</sup>。この費用に対する効果（費用対効果）の視点から見ると、ビタミンを含む栄養療法には、新たな側面が見えてくる。

疾患の予防は、一次予防、二次予防、三次予防に分類される。三次予防はリハビリテーションのように、疾患に罹った後の対策、二次予防は疾患の早期診断と早期治療、一次予防は生活習慣の改善などによって、疾患を未然に防ぐことを目指すものである。また、予防に関するアプローチの方法から、high risk approach と population approach に分けられる。前者はその名前の通り、疾患発生のリスクの高い群に対して集中的に介入を行うもので

ある。疾患発生リスクが高く、その薬剤の予防効果が大きいほど費用対効果はよい値となる。従って、骨折リスクの非常に高い群に対して bisphosphonate などを用い、薬剤治療介入を行うことは費用対効果に優れた医療行為である。

しかし、中～低リスク集団に対してもこのような治療介入を行うことは、要する費用や発生しうる副作用の可能性を考えると、とうてい実行不可能である。例えば、50 歳以上の全女性に、bisphosphonate を服用させるというのは、あり得ない選択である。このような場合には、集団のリスクを低い方に平行移動させる population approach が行われる。その場合、多数かつ多様な対象者に対して行いうることが必須であるから、安全かつ安価なものでなければならず、栄養、運動などの生活習慣改善が中心となる。

言い換えると、ビタミンなどの栄養療法は絶対的な効果は新薬より小さいが、かかる費用は圧倒的に低いで、費用対効果には優れており、中～低リスク集団に対する一次予防、population approach には非常に適しているということである。わが国ではこのような研究は皆無だが、海外では医療行為に対する経済評価は盛んに行われており、ビタミン D の骨折予防効果を扱ったものもいくつかある<sup>4)-8)</sup>。

一例を示すと、Decalyos Study は、フランスで行われた臨床研究であり、3,270 名の高齢女性を 2 群に分け、一方にはビタミン D<sub>3</sub> (800 IU/日) + カルシウム (1,200 mg/日) の投与が、他方にはカルシウム (1,200 mg/日) のみの投与が、36 ヶ月行われた。大腿骨近位部骨折は、Ca のみ群では 1,127 名中 184 名に起こったのに対し、D 群では 1,176 名中 138 名であった。すなわち、1,000 名あたり 46 件の大腿骨近位部骨折が予防できたことになる。この骨折は非常に医療費のかかる骨折であるので、もし施設入居高齢者全員にビタミン D + カルシウムの補充を行うならば、それにより、1 億 5 千万フランの医療費が削減できるものと推測されている<sup>4)</sup>。

骨折の危険因子として低骨密度はもちろん重要だが、大腿骨近位部骨折など非椎体骨折の場合、転倒がきっかけになる例が非常に多い。最近ビタミン D の転倒防止効果も注目されていることから、ビタミン D は骨密度低下を防ぐ作用に加えて、複数の作用点から骨折予防に役立つ可能性がある。なお上記の研究は、大腿骨近位部骨折のみに注目したものであるが、実際にはビタミン D 欠乏（不足）の改善によって、それ以外の骨折についても予防



効果が見込まれるので、実際の経済効果はさらに大きく、上記の推定はおそらく過小評価である。

最近海外では、400IU/日のビタミンDでは骨折を防ぐことができず、最低800IU/日程度を要するという大規模研究やメタアナリシスがあいついで発表され<sup>9)10)</sup>、ビタミンDによる骨折予防の社会的側面にも言及されている。予防効果を評価するのに、NNT (number needed to treat) という指標がよく用いられる。これはその疾患(ここでは骨折)の発生を1件防ぐためには、何人に対して介入する必要があるかという数字であり、NNTが小さい方が効率のよい予防介入である。当然、疾患発生リスクの高い集団に対して介入した方がNNTはよい値となる。Tangらは、29のRCT (randomized controlled trial)、63,897例のデータのメタアナリシス結果から、ビタミンDの有効性を報告しているが、NNT=63であったと述べている<sup>9)</sup>。この研究は50歳以上の女性が対象であり、決して骨折リスクが非常に高い集団だけを選んだものではないことを考えると、NNT=63は非常によい数字であり、循環器領域でのNNTと比べても遜色ない<sup>11)</sup>。

ビタミンDの骨折予防効果に関しては、近年の海外での進歩に比べて、日本での臨床研究が非常に遅れている。多数の介入試験が海外で発表されてきたが、これまでわが国ではほぼ皆無であった。最近、我々は施設入所高齢者に対する、ビタミンD<sub>3</sub>による介入試験を行った<sup>12)13)</sup>。血液中の25-hydroxyvitamin D濃度が最もよいビタミンD栄養状態の指標だが、日本人の食事摂取基準2005年版の目安量である、200 IU/日では極めて不十分な効果しか得られず、少なくとも800 IU/日を要することを報告した。しかし、これはまだ血液中のビタミンD濃度を指標としたのにとどまっておらず、骨折を指標したものではない。このようなわが国の現状では、本稿に述べたような医療経済からみたビタミンの評価というような話題は時期尚早なのかもしれない。しかし、このようなビタミンの評価は社会と行政に対してビタミンの重要性を訴えていく、一つの有力な視点となるものであり、今後わが国でも研究が行われるべき分野であると考え、あえて紹介した。

**Key Words** : vitamin D, fracture prevention, health economics, primary prevention, population approach

Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University

Kiyoshi Tanaka, Akiko Kuwabara

京都女子大学家政学部食物栄養学科

田中 清, 榎原 晶子

## 文 献

- 1) 田中清, 萩野浩, 原田敦他 (2007) 骨粗鬆症における薬物療法に関する医療経済評価. *Osteoporos Jpn* **15**, 51-55
- 2) Guilley E, Chevalley T, Herrmann F, Baccino D, Hoffmeyer P, Rapin CH, Rizzoli R (2008) Reversal of the hip fracture secular trend is related to a decrease in the incidence in institution-dwelling elderly women. *Osteoporos Int* **19**, 1741-1747
- 3) 田中清, 武田英二, 門脇孝, 恩地森一, 立川俱子, 清野裕 (2006) 生活習慣病の治療・予防における栄養療法の意義と医療経済評価. *日本病態栄養学会誌* **9**, 3-9
- 4) Lilliu H, Pamphile P, Chapuy M-C, Schulten J, Arlot M, Meunier PJ (2003) Calcium-vitamin D<sub>3</sub> supplementation is cost-effective in hip fracture prevention. *Maturitas* **44**, 299-305
- 5) Kanis JA, Dawson A, Oden A, Johnell O, de Laet C, Jonsson B (2001) Cost-effectiveness of preventing hip fracture in the general female population. *Osteoporos Int* **12**, 356-361
- 6) Torgenson DJ, Kanis JA (1995) Cost-effectiveness of preventing hip fracture in the elderly population using vitamin D and calcium. *QJM* **88**, 135-139
- 7) Willis MS (2002) The health economics of calcium and vitamin D<sub>3</sub> for the prevention of osteoporotic hip fractures in Sweden. *Int J Technol Assess Health Care* **18**, 791-807
- 8) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2001) Hip fracture prevention: cost-effectiveness strategies. *Pharmacoeconomics* **19**, 449-468
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Reginster J-Y (2007) Calcium and vitamin D for osteoporotic fracture risk. *Lancet* **370**, 632-634
- 12) Himeno M, Tsugawa N, Kuwabara A, Fujii M, Kawai N, Kato Y, Kihara 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* **27**, 733-737
- 13) Kuwabara A, Tsugawa N, Tanaka K, Fujii M, Kawai N, Mukae S, Kato Y, Kojima Y, Takahashi K, Omura K, Kagawa R, Inoue A, Noike T, Kido S, Okano T (2009) Improvement of vitamin D status in Japanese institutionalized elderly by supplementation with 800 IU vitamin D<sub>3</sub>. *J Nutr Sci Vitaminol* **55**, 453-458

## Molybdenum in Biological Samples and Clinical Significance of Serum Molybdenum

MUNEHIRO YOSHIDA

### SUMMARY

Molybdenum is an essential trace element in human nutrition. The determination of Mo in biological materials can be performed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The Mo status of the Japanese population is assessed on the basis of the Mo content in foods and human milk. A balance study of Mo is reported. Finally, the meaning of serum Mo is discussed.

### 14.1. INTRODUCTION

Molybdenum is used in the production of steels and alloys and as a chemical catalyst in the manufacture of plastics, lubricants, and pigments. Because of the lower toxicity of Mo as compared with B, Cr, Mn, and Ni, the industrial use of Mo is steadily increasing [1]. On the other hand, several cases of occupational Mo exposure with elevation of serum uric acid and ceruloplasmin levels have been observed [2, 3]. In these cases, serum/plasma and urinary Mo concentrations were monitored as an index of Mo exposure.

Molybdenum is also used as a material for several prostheses in joint-replacement surgery performed on young patients [4]. Due to the possibility that Mo is released from the prosthesis into blood, it has been proposed that monitoring blood Mo is important to detect the long-term effects of Mo exposure [5]. This metal is also important as an essential micronutrient for both plants and animals. In animals, Mo functions as a cofactor for a limited number of enzymes, including xanthine oxidase,

aldehyde oxidase, and sulfite oxidase [6]. Human nutritional deficiency of Mo was observed in a patient subjected to prolonged total parenteral nutrition [7]. In this case, clinical symptoms suggestive of a deficiency of sulfite oxidase and those including irritability leading to coma, tachycardia, tachypnea, and night blindness were reported; however, it is believed that dietary Mo deficiency is not likely to occur due to the high concentration of Mo in cereals and pulses. Since plasma and urinary Mo concentrations are correlated to dietary Mo intake, these levels may be used as an index of Mo nutritional status [8, 9].

In this chapter, Mo concentrations in biological samples (foods, animal tissues, human milk, blood, and urine) are surveyed and the clinical significance of serum Mo is discussed.

## 14.2. ANALYSIS OF MOLYBDENUM IN BIOLOGICAL SAMPLES BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY

### 14.2.1. General

Several analytical methods can be used for Mo quantification including electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS), ICP-MS, and neutron activation analysis (NAA). Among these, ETA-AAS and ICP-MS have the lion's share to determine Mo in biological samples. In the following sections the applicability of ICP-MS methods to Mo quantification as developed in the author's laboratory is described [9–12].

### 14.2.2. Sample Preparation

**14.2.2.1. Cereal, Pulse, and Liver Samples** Since these samples contain Mo at a high level ( $\geq 100$  ng/g), a simple short wet digestion is applicable. Up to 1 g of dry samples are digested with 10 mL metal-free grade  $\text{HNO}_3$  in a 30 mL micro Kjeldahl flask until the disappearance of insoluble components and then the digestion mixture is diluted to 50 mL with double-distilled water.

**14.2.2.2. Food Samples and Animal Tissue** Since a large part of these samples contain Mo at a low level ( $< 100$  ng/g), long thorough wet digestion is required. Approximately 1 g of sample is carefully heated with 10 mL metal-free grade  $\text{HNO}_3$  for 30 min in a 30 mL micro Kjeldahl flask. The mixture is further heated with 2 mL metal-free grade 60%  $\text{HClO}_4$  until the appearance of white fumes of  $\text{HClO}_4$  and the volume of the digest is made up to 10 mL with water.

**14.2.2.3. Human Milk and Serum** Since Mo concentrations in these samples are very low ( $< 10$  ng/g), minimum dilution of Mo concentration is required during preparation. Approximately 2 to 5 mL of milk or serum sample are transferred to a ceramic melting pot (32  $\phi$   $\times$  24 mm) and heated in an electric furnace at 550  $^\circ\text{C}$  for 16 h. After dry incineration, the remaining ash is dissolved in 5 mL of 0.1 M  $\text{HNO}_3$ . This dry digestion technique is also applicable to most food samples.

**14.2.2.4. Urine** Urine specimens are directly diluted with nine volumes of 0.1 M HNO<sub>3</sub>.

### 14.2.3. Determinations by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Molybdenum concentrations in sample solutions thus prepared are determined by ICP-MS with direct nebulization. ICP-MS operating conditions are as follows: instrument, ICPM-8500 (Shimadzu, Kyoto, Japan); forward power, 1200 W; coolant gas flow rate, 7.0 L/min; auxiliary gas flow rate, 1.5 L/min; nebulizer gas flow rate, 0.58 L/min; sampling depth, 5.0 mm; integration time, 2.0 s; number of run, 20; mode of analysis, pulse; isotopes monitored, <sup>95</sup>Mo, <sup>97</sup>Mo, and <sup>98</sup>Mo. An Rh isotope (<sup>103</sup>Rh) was used as an internal standard. Because three Mo isotopes, <sup>95</sup>Mo, <sup>97</sup>Mo, and <sup>98</sup>Mo, were monitored, three analytical values of Mo were obtained for each sample. Since the analytical values obtained were similar, the mean of three analytical values was used for quantification. As an internal standard of Mo determination using ICP-MS, the isotopes of <sup>45</sup>Sc, <sup>89</sup>Y, or <sup>115</sup>In are also applicable.

Table 14.1 shows analytical results for Mo in several Certified Reference Materials (CRMs) and in milk samples with or without standard addition of Mo. When CRMs

TABLE 14.1 Validation with CRMs and Recovery for Mo Determination [10, 11]

CRMs or Samples	Method of Preparation <sup>a</sup>	Certified Value	Observed Value <sup>b</sup>
		(µg/g)	(µg/g)
Rice flour (SRM 1568a)	S-wet	1.46 ± 0.08	1.40 ± 0.07
Wheat flour (SRM 1567a)	S-wet	0.48 ± 0.03	0.50 ± 0.02
Bovine liver (SRM 1577a)	S-wet	3.5 ± 0.5	3.69 ± 0.30
Nonfat milk power (SRM 1549)	S-wet	0.34 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.06
Tomato leaves (SRM 1573a)	S-wet	0.46 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.11
Bovine muscle powder (RM 8414)	L-wet	0.08 ± 0.06	0.095 ± 0.032
Apple leaves (SRM 1515)	L-wet	0.094 ± 0.013	0.087 ± 0.020
Wheat flour (SRM 1567a)	Dry	0.48 ± 0.03	0.51 ± 0.04
Nonfat milk power (SRM 1549)	Dry	0.34	0.35 ± 0.04
			µg/kg or µg/L
Cow's milk	Dry	–	45.5 ± 3.9
Cow's milk + Mo (40 ng/g)	Dry	–	85.7 ± 1.8
Formula milk powder	Dry	–	16.6 ± 0.1
Formula milk powder + Mo (10 ng/g)	Dry	–	26.9 ± 0.3
Pooled human milk	Dry	–	6.3 ± 0.2
Pooled human milk + Mo (5 ng/g)	Dry	–	11.8 ± 0.4
Pooled serum	Dry	–	0.66 ± 0.07
Pooled serum + Mo (1 ng/mL)	Dry	–	1.66 ± 0.18

<sup>a</sup>S-wet, short simple wet digestion; L-wet, long wet digestion; Dry, dry incineration at 550 °C.

<sup>b</sup>Values are the means ± SD for quadruplicate sample preparation and analyses.

<sup>c</sup>Noncertified value.