

骨栄養因子の正常値決定の試み

成人病診療研究所 白木正孝

要約

日本人女性において骨代謝関連ビタミンの参照値を決定し、異常値の臨床的意義について検討した。検討した項目は25-OH vitamin D (25-D)、1,25 (OH)₂ vitamin D (1,25-D)、intact PTH、ビタミンK、およびundercarboxylated osteocalcin (uc-OC)である。ビタミンD代謝産物およびPTHは多数例の分布から25 percentileもしくは75 percentile値以下または以上を異常値とした。またビタミンKについては閉経後女性の25percentile以下を不足とし、uc-OCについては閉経前女性の平均+SD、vitamin K2 userの平均+SD上限をcut-off値とした。

25-Dのcut-off値は約15.0ng/ml、1,25-Dは40pg/ml、PTHのそれは40 pg/mlと定められた。このカットオフ値からみた異常値群の臨床的outcomeは高代謝回転であり、25-Dの異常群のみが新規骨折の発生が早期に起こり、亀背をもつものが多かった。1,25-DとPTHの異常群では骨形態変化を持つものの頻度は高くなかった。

uc-OC 4.5ng/ml以上および総ビタミンK濃度3.0 ng/ml以下をビタミンKに関する異常値とすると、異常群は骨折の有病率が高く、血管障害の有病率が高かった。また一般に高代謝回転であった。

以上より骨関連ビタミンとその関連ホルモンの参照値には臨床的に有意義であると考えられた。

はじめに

骨粗鬆症を代表とする退行期骨疾患は老年者の日常生活能力を低下させる疾患として近年その重要性が認識されるようになってきている。これらの疾患は一旦これが発症すると終生治癒することはなく、長い管理医療を必要とする。とりわけ骨粗鬆症はその合併症である骨折が発生すると、多くの例がなんらかの日常生活能力の減退を示し、また一部の骨折は内臓機能低下を来し、死亡率も増加する。このような疾患の治療法は最近大幅に進歩し、その診断や管理方法にかんしても新しい提案がなされている。しかし、これら医療には高額な医療費が必要とされ、老人医療費の高騰の一因とも考えられている。骨粗鬆症治療における医療費の節約方法にはいくつかのオプションが考えられる。第一のそれは骨粗鬆症と診断されたあといかに効率的に骨折を予防するかである。というのも一般に骨折を持つ例では非骨折例にくらべ医療費が高額になるからである。第二に骨粗鬆症発症年齢をより高齢化させる必要がある。骨粗鬆症発症は加齢とともに増加し、このこと自体は防ぐことのできない現象である。従って骨粗鬆症は根絶できない。そうであるのならば骨粗鬆症発症年齢をより高齢化させ、その罹病期間の短縮をはかることは医療経済学的見地からいっても意味があることと考えられる。

骨粗鬆症発症には数多くの因子が関与していると考えられているが、それらのうちでも骨の代謝に関わる栄養因子を適正に保つことは骨粗鬆症予防の観点から極めて重要である。この点に関しては古くはカルシウム摂取の面から度々論じられてきたところである。ビタミンDとKは前者が腸からのカルシウム吸収と骨石灰化の過程で重要な働きをすることが知られていた。また後者は比較的最近研究されるようになった骨関連ビタミンであるが、石灰化の過程に関与するばかりでなく、骨折という現象と深く関わっていることが明らかとなりつつあるビタミンである。これら二つのビタミンを適正に摂取すること、または体内で合成することは骨粗鬆症発症予防上重要であると考えられているにもかかわらず、いまだにこれら二つのビタミンの骨粗鬆症発症への関与の有無についてはあまり検討されていない。この理由はいくつか考えられるが一番の問題はこれらビタミンの適正な血中濃度が定まっていないため、どのくらいからが異常でどのくらいからが正常であるのか、または異常値を示す例と正常例とでは骨の代謝上どのような不都合がおこるのかについての知見が皆無であるという点が考えられる。最近ビタミンDについてはそれが不足すると二次性副甲状腺機能亢進症が惹起されることが報告された。この報告はビタミンDの生体内での機能が主として副甲状腺機能の抑制にあることを示しており、さらに副甲状腺機能を正常に保つために必要なビタミンDレベルは従来考えられていたビタミンD欠乏状態の値よりもはるかに高い値であることが明らかにされた。さらにビタミンKに関しては、その代謝がどのような調節をうけているのか、またビタミンKの骨への関与に関するマーカーである undercarboxylated osteocalcin (uc-OC) の代謝調節や病的意義についての知見が不足しているという問題も存在する。

今回我々は閉経後婦人のビタミンDおよびKの正常値算出を試みることにした。正常値の算出方法にはいくつかの方法がある。多数のデータの分布から求める方法。健康成人の分布から求める方法。また明らかな病的状態を示す人々の分布から求める方法などがそれである。今回の検討ではこれらの方法に加え、ビタミンDやKの機能が反映される血液成分の分布およびその結果あらわれる骨の形態変化も参考として正常値を導くことにした。ここで用いた血液成分としてはビタミンD機能の反映としての副甲状腺ホルモン値であり、またビタミンK機能の反映としての undercarboxylated osteocalcin (uc-OC) である。さらに骨形態変化の指標としては骨粗鬆症の有無、骨折の有無、脊柱形態異常としての亀背の有無などを骨栄養因子の過不足の final outcome としてとらえられるか否かを検討した。

方 法

1) 対象：

- a) 老年者母集団 (RIPID-OFIS) : 主たる対象を成人病診療研究所に1992年から2001年までに登録されたRIPID-OFIS研究登録閉経前後婦人とした。この研究は閉経前後婦人の骨代謝の長期経過観察研究および介入研究を目的としており、現在までに総計2700名の登録がなされており、うち1786名が少なくとも一年以上の経過観察を終了している集団である。これらの対象の全例で

登録時に腰椎骨密度、全身骨密度、脊椎レントゲン撮影が行われている。また血液、尿生化学検査 (TP, Al-P, Creatinine, Ca, P, 尿Ca/Cr比, Total Cho, TG, 食後血糖, RAHAテスト) が行われており、骨代謝マーカー (total DPD, Osteocalcin, uc-OC, BAP, NTxなど) も行われている。登録後骨粗鬆症と診断された例は無作為に各種治療薬もしくはカルシウム剤による治療が割り付けられ、治療後骨密度が半年ごと、骨レントゲン撮影が1~2年ごとにくり返され、経過観察が行われている。全例の平均観察期間は898日である。

b) 若年者母集団(Young)

この集団とは別に女子栄養大学上西一弘先生の御協力のもと、20歳代の女子学生において食事記録をとったうえで、腰椎骨密度、ビタミンK摂取量、ビタミンK血中濃度、uc-OC血中濃度を測定し、若年者の標準値を求めるとともに各測定値間の相互関係について検討した。

c) 経過観察母集団 (OFIS follow up) : 前述のRIPID-OFIS登録集団より、無治療例 (n=933)、女性ホルモン治療例 (n=223)、EHDP治療例 (n=247)、アレンドロネート治療例 (n=107)、ビタミンD3治療例 (n=268)、ビタミンK2治療例 (n=199) の総計1977例が経過観察されているが、この一部を用い、治療がuc-OCにおよぼす影響を検討した。またこの群のうち未治療例は基礎ビタミン値がその後の骨密度推移や骨折の新規発生にどのように関わってくるかを検討した。

2) 観察項目:

- a) 各目的因子の登録時血中濃度の分布と参照値の決定。目的因子として血中25-OH vitamin D, 1,25(OH)₂ vitamin D, phyloquinone (vitamin K1), menaquinone-4 (vitamin K2), menaquinone-7 (vitamin K2) およびunder-carboxylated osteocalcin (uc-OC)をとりあげた。これらの測定値につき、閉経前後に集団を分類後、原発性副甲状腺機能亢進症例、腎不全例 (BUN 35 mg/dl and/or creatinine 1.5mg/dl以上) およびビタミンKやuc-OCの場合グラケール服用例および骨吸収抑制剤 (anti-resorber:AR) 服用例を除外してそれらの分布を求めた。またとくにビタミンKおよびuc-OCについては、それらの血中濃度に影響する要因について相関回帰分析を行った。
- b) 各目的因子の分布とoutcomeとの関連。各因子 (25-D, 1,25-D, PTH, vitamin K1, total vitamin K, uc-OC) のquartile分布から低値群 (Q1)、正常群(Q2~3)、高値群 (Q4) に分類し、それぞれの群の年齢、体格、骨密度、骨代謝マーカー値、骨折有病率、亀背有病率、骨粗鬆症有病率を算出しそれぞれの群の病的意義について検討した。
- c) ビタミン充足下における正常値の決定。骨粗鬆症と診断された患者につき、活性型ビタミンD₃プロビタミンであるalfacalcidolを投与し、血中intact PTH低下度からどの程度の25-OHD前値の例がintact PTH低下度が高いかを検討した (D₃ Tx 群)。ここで、intact PTHが低下しない25-Dの値をビタミンD充足状態と定義することとした。また骨粗鬆症例に対しビタミンK2を投与し、uc-OCを低下させ、その値をビタミンK充足状態と定義し、ビタミンK充足下におけるuc-OC値を求めた (K2 Tx群)。
- d) 異常値の病的意義に関するProspective study

平均年齢63歳の閉経後女性553例を1～6年間経過観察し、脊椎骨折、大腿骨頸部骨折、上腕骨外科頸骨折、前腕骨遠位端骨折などの脆弱性骨折の発生をカウントした。上記の分類により得られた異常範囲内の値をもつ例と正常範囲であった例とで骨折発生にいたる日数と骨折発生率をKaplan-Meier法による累積ハザード曲線で比較した (OFIS followup群)。

以上の検討された群の内容につき図1に示した。

これらの検討、すなわち、多数例の分布区分における機能異常の出現頻度、充足域を設定し、それ以外の例がどのような異常を呈するかを検討、さらに前向き研究からみた異常なout comeの出現の有無、以上の三つの検討から妥当な正常域を設定することとした。

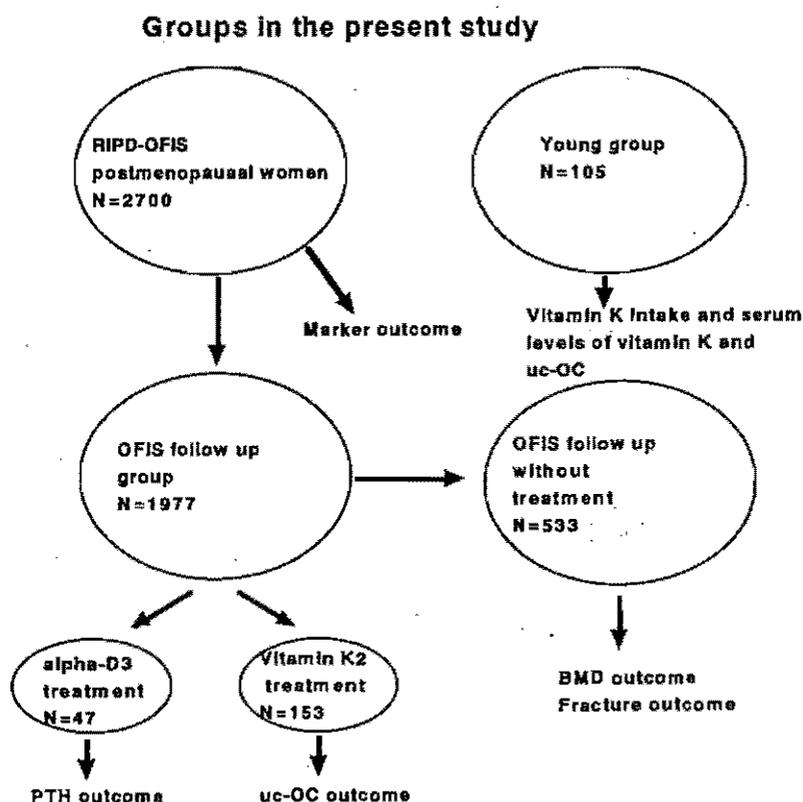


図1 今回の検討対象とそれぞれの対象群における検討内容

結果

A: ビタミンDおよびPTH

1) ビタミンDおよびPTHの分布

a) 閉経前後期におけるビタミンDおよびintact PTHの分布

閉経前女性 (平均年齢; 45.5 ± 6.6 歳、 $n=171$) および閉経後女性 (平均年齢; 65.5 ± 8.8 歳、 $n=1038$) の2群の25-D、1,25-Dおよびintact PTHの分布を表1-3に示す。

表1 Distribution of 25-OH vitamin D in pre- and postmenopausal Japanese women

Group	Range	Mean	1 st Quartile	4 th Quartile
Premenopause	15.0-44.2ng/ml (37.5-110.5nM/L)	18.9 ng/ml (47.3nM/L)	15.0 ng/ml (37.5nM/L)	21.0 ng/ml (52.5 nM/L)
Postmenopause	10.6-29.0 (26.5-72.5)	20.4 (51.0)	16.0 (40.0)	24.0 (60.0)
P	0.0062			

表2 Distribution of 1,25 (OH)₂ vitamin D in pre- and postmenopausal Japanese women

Group	Range	Mean	1 st Quartile	4 th Quartile
Premenopause	12.8-48.4 pg/ml (32-121pM/L)	32.7 pg/ml (81.8 pM/L)	24.0 pg/ml (60 pM/L)	36.0 pg/ml (90 pM/L)
Postmenopause	15.5-48.3 (38.8-120.8)	34.0 (85.0)	20.0 (50.0)	38.0 (95.0)
P	ns			

表3 Distribution of intact PTH in pre- and postmenopausal Japanese women.

Group	Range	Mean	1 st Quartile	4 th Quartile
Premenopause	15.0-44.2 pg/ml	33.2 pg/ml	24.0 pg/ml	35.0 pg/ml
Postmenopause	17.9-46.7 pg/ml	37.0 pg/ml	28.0 pg/ml	43.0 pg/ml
P	0.0009			

b) ビタミンDとPTHの分布状況からみた異常値の決定

次に25-OH vitamin D、1,25(OH)₂ vitamin D、およびintact PTHが骨代謝にどのような影響を与えているかを探索的に検討する目的で、それぞれの因子の4分位 (1st quartile~4th quartile) を求め、1st quartileを低値群、2ndおよび3rd quartileを正常群、4th quartileを高値群と分類して各群の骨代謝関連パラメータの差を検討した (表4-6)。

25-OHDについては表4に示したように、低25-D群は高齢者に多くみられ、骨密度に差はないものの、Al-P, osteocalcin, pyridinoline, DPDなどの骨代謝マーカーが高値で、血清P値が低く、intact PTH値が高値であった。低値群で骨形態を検討したところ、骨折の有病率や骨粗鬆症有病率は高くないものの、亀背の発生頻度が高かった。

1,25 (OH)₂vitamin D (1,25-D) は活性型ビタミンD (hormonal form of vitamin D) と考えられており、この不足乃至は受容体反応性低下は骨軟化症を惹起することで知られている。従って、その不足が骨粗鬆症の危険因子となると考えられていた。しかし今回の検討では予想とは逆に

表4 Bone densities, bone turnover markers, calcium regulation and bone morphological status in the groups with low-, normal- and high-25-D level. (mean±SEM)

Parameters	Low 25-D (n=285) ≤ 15.0 ng/ml	Normal 25-D (n=481) 15.1-20.9 ng/ml	High 25-D (n=237) ≥ 21.0 ng/ml	P in ANOVA
Age (yo)	66.2±0.6	65.1±0.4	63.7±0.5	0.0037
LBMD (g/cm ²)	0.905±0.012	0.895±0.009	0.906±0.012	Ns
TBMD (g/cm ²)	0.970±0.008	0.966±0.005	0.976±0.007	Ns
Al-P (IU)	181±3	185±3	168±4	0.0024
Osteocalcin (ng/ml)	13.3±0.3	12.6±0.2	11.4±0.3	<0.0001
Pyr (nM/mMCR)	34.8±0.8	33.7±0.5	31.5±0.8	0.0094
DPD (nM/mMCR)	7.7±0.2	7.4±0.1	7.0±0.2	0.0336
Serum Ca (mg/dl)	9.1±0.03	9.1±0.02	9.1±0.02	Ns
Serum P (mg/dl)	3.4±0.03	3.4±0.02	3.6±0.03	0.0022
iPTH (pg/ml)	40.7±0.9	36.7±0.6	33.1±0.7	<0.0001
25-D (ng/ml)	13.3±0.2	20.3±0.1	28.9±0.3	<0.0001
1,25-D (pg/ml)	33.0±0.6	34.7±0.6	34.9±0.8	Ns
Urinary Ca/Cr	0.201±0.007	0.217±0.006	0.221±0.008	Ns
Pre-existing Fr (%)	25.9%	23.1%	22.6%	Ns
Osteoporosis (%)	42.1%	42.3%	43.0%	Ns
Kyphosis (%)	32.5%	26.3%	18.3%	0.0035

極めて明確にその高値が骨粗鬆症の存在、または低骨密度に関連していた。高値群ではまた尿中カルシウム排泄も多く、この群では骨吸収マーカーの高値がみられなかったところから、1,25-Dが骨吸収を高めて骨密度を減らし結果的に尿中カルシウム排泄を高めたと考えるよりも、1,25-D高値がゆえに腸よりのカルシウム吸収が高まって尿中カルシウムを増加させたと考えるほうが理解しやすい。いずれにせよ骨粗鬆症の危険因子として1,25-D濃度を考えるならば、低値よりは高値のほうが危険因子となりうる可能性を示した今回の結果は興味深い。なお今回の検討の対象998例中553例でビタミンD受容体多型を検討しているが、各群における多型の出現頻度に差は認めなかった(p=0.7349)。

同様の検討をintact PTH血中濃度分布につき行ったものが表6である。

高PTH血症は高齢者により多く認められ、低骨密度、高代謝回転であった。25-Dの低値を伴うこと、また低カルシウム血症の傾向を伴うことから、この高PTH血症は二次性副甲状腺機能亢進症であることがわかる。また低25-Dであるにもかかわらず1,25-Dが低値を呈さないこと、ま

表5 Bone densities, bone turnover markers, calcium regulation and bone morphological status in the groups with low-, normal- and high-1,25-D level.

Parameters	Low 1,25-D (n=109) ≤20.0 pg/ml	Normal 1,25-D (n=567) 21.0-38.0 pg/ml	High 1,25-D (n=322) ≥39.0 ng/ml	P in ANOVA
Age (yo)	64.5±0.8	65.0±0.4	65.4±0.5	Ns
LBMD (g/cm ²)	0.933±0.019	0.915±0.008	0.867±0.011	0.0003
TBMD (g/cm ²)	1.001±0.013	0.977±0.005	0.947±0.007	<0.0001
Al-P (IU)	174±5	176±2	188±4	0.0223
Osteocalcin (ng/ml)	12.1±0.4	12.4±0.2	12.8±0.2	Ns
Pyr (nM/mMcr)	33.0±1.2	33.6±0.5	33.7±0.7	Ns
DPD (nM/mMcr)	6.9±0.2	7.3±0.1	7.7±0.1	0.0513
Serum Ca (mg/dl)	9.1±0.04	9.1±0.02	9.1±0.02	Ns
Serum P (mg/dl)	3.5±0.04	3.5±0.02	3.4±0.03	0.0410
iPTH (pg/ml)	36.3±1.2	36.6±0.6	37.9±0.8	Ns
25-D (ng/ml)	20.1±0.5	20.1±0.3	21.0±0.4	Ns
1,25-D (pg/ml)	16.7±0.3	29.8±0.2	48.1±0.5	<0.0001
Urinary Ca/Cr	0.174±0.009	0.206±0.005	0.240±0.007	<0.0001
Pre-existing Fr (%)	26.7%	20.7%	27.3%	Ns
Osteoporosis (%)	40.9%	38.2%	50.0%	<0.0001
Kyphosis (%)	28.6%	25.5%	21.6%	Ns

た尿中カルシウム排泄が高PTH群で低値であることから、この上昇したPTHはビタミンDの活性化、また腎臓におけるカルシウムの再吸収に関与していると考えられた。即ちこのPTHは生物学的に活性を有すると考えられた。この対象1000例中482例でPTH遺伝子多型 (BsmI および Dra多型) を検討したが、いずれの群においてもこれら多型の出現頻度に差を認めなかった (p=0.9175)。以上より閉経後婦人においては約40pg/ml以上のintact PTH値は二次性副甲状腺機能亢進症状態であると考えられる。

2). 人為的ビタミンD充足状態下におけるintact PTHの反応

46例の骨粗鬆症患者に1α OH vitamin D3 1μg/dayを6ヶ月間投与し、その前後で血中intact PTH値をモニターした。この操作により人為的に活性型ビタミンD充足状態を作り、この状況でintact PTHが

表6 Bone densities, bone turnover markers, calcium regulation and bone morphological status in the groups with low-, normal- and high-intact PTH level.

Parameters	Low PTH (n=269) ≤20.0 pg/ml	Normal PTH (n=457) 21.0-38.0 pg/ml	High PTH (n=274) ≥39.0 pg/ml	P in ANOVA
Age (yo)	64.2±0.5	64.1±0.4	67.4±0.5	<0.0001
LBMD (g/cm ²)	0.890±0.011	0.917±0.009	0.885±0.012	0.0530
TBMD (g/cm ²)	0.966±0.007	0.980±0.006	0.957±0.007	0.0412
Al-P (IU)	178±4	179±3	183±4	Ns
Osteocalcin (ng/ml)	11.6±0.3	12.4±0.2	13.6±0.3	<0.0001
Pyr (nM/mMCr)	33.3±0.8	32.6±0.5	35.3±0.8	0.0149
DPD (nM/mMCr)	7.1±0.2	7.3±0.1	7.9±0.2	0.0025
Serum Ca (mg/dl)	9.2±0.03	9.1±0.02	9.0±0.02	<0.0001
Serum P (mg/dl)	3.6±0.03	3.5±0.02	3.4±0.03	0.0002
iPTH (pg/ml)	22.7±0.3	34.9±0.2	54.5±0.7	<0.00001
25-D (ng/ml)	22.1±0.4	20.6±0.3	18.4±0.3	<0.0001
1,25-D (pg/ml)	34.2±0.7	33.7±0.6	35.3±0.8	Ns
Urinary Ca/Cr	0.253±0.008	0.210±0.006	0.179±0.006	<0.0001
Pre-existing Fr (%)	24.1%	22.3%	25.5%	Ns
Osteoporosis (%)	40.6%	40.2%	47.2%	Ns
Kyphosis (%)	23.8%	26.1%	24.8%	Ns

どの程度抑制されたかを観察することで、逆に副甲状腺機能の正常状態を決定することが目的であった。図2には骨粗鬆症患者の治療前後におけるintact PTHの変動率（上段）および実測値の推移（下段）を示した。intact PTH値は前値 37.8 ± 2.4 pg/mlより3ヶ月後に 25.5 ± 2.0 pg/mlまで $-33.8 \pm 3.8\%$ 低下した。すなわち活性型ビタミンD3の投与により二次性副甲状腺機能亢進が抑制された。このintact PTH値の低下度はintact PTH値の前値の高低では差がなく、血中25-D値に規定されていた。すなわち、intact PTH値が最大に低下した場合の平均値である30%以上低下したものとしなかったものとに分類し、種々の基礎検査値を比較したところ唯一差を認めたのは25-D値のみであった。この結果は25-Dが15~16 ng/ml付近を境界としてそれ以下であれば活性型ビタミンD3で治療可能な二次性副甲状腺機能亢進症を惹起し、おそらく20 ng/ml以上であれば確実に二次性副甲状腺機能亢進症は存在しないと考える根拠となりうるデータと思われる。

3) ビタミンDおよびintact PTHの異常値と骨折発生 (prospective study)

平均年齢63歳、533例の閉経後女性を無治療で観察し、骨折発生の有無を継続的に検討した。96例が骨粗鬆症由来と思われる脆弱性骨折を惹起した。骨折発生までの日数を数え、Kaplan-Meier法による累積ハザード曲線を作成した。結果的にもっとも早期に骨折に至った群は低25-D群であり、1,25-Dの分類やintact PTHの分類群間では骨折に至る過程は各群間に差を認めなかった。(図3)

B: ビタミンK

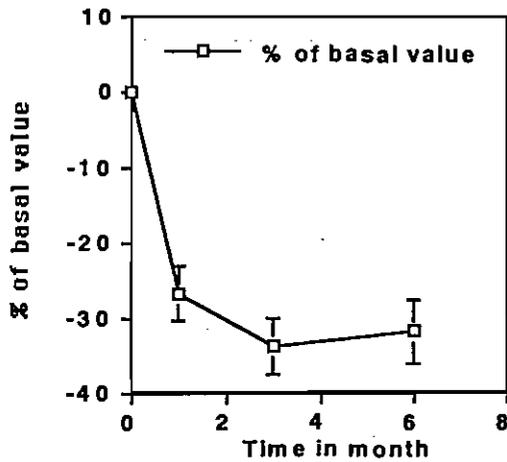
1) 若年者群におけるビタミンKやuc-OC血中濃度に影響を与える要因

女子大生105例において食事記録をつけさせたのち、早朝空腹時に採血し、血中ビタミンK3分画およびuc-OCを測定した。図4に示すようにビタミンK摂取量と血中ビタミンK3分画の総和 (Total K) は極めて良好な相関関係を示し、正確な食事記録があれば、食事からのビタミンK摂取量で血中濃度が推定できることが判明した。さらにビタミンK濃度は血清中性脂肪濃度に依存していた(図6)。これらの結果は若年者における血清ビタミンK濃度規定因子として食事からのビタミンK摂取量と中性脂肪代謝の状態の二つの因子が重要であることを示している。一方、若年女性においてuc-OC値と有意の相関を示す因子は検討した項目中には見出せなかった。これは若年女性ではuc-OCの分散が小さいためと考えられた。

2) 老年女性におけるビタミンK血中濃度、uc-OC濃度を規定する因子

老年女性においても若年女性と同様の検討を行った。血清総ビタミンK濃度はuc-OC濃度と高度に有意な負相関関係を示し(図5)、このことから、uc-OCは老年女性においてはビタミンK不足のよい指標となるものと考えられた。さらに血清総ビタミンK濃度は若年者と同様血清中性脂肪濃度と有意の正相関を示した(図7)。uc-OCは中性脂肪と弱い負相関を示したが、総ビタミンK濃度および中性脂肪濃度の2変量を説明変数とし、uc-OCを目的変数としてステップワイズ多変量解析を行ったところ、uc-OCの説明変数として中性脂肪は取り上げられなかった (data not shown)。従って、老年女性においてuc-OCを規定する因子は総ビタミンK濃度であり、中性脂肪は独立変数とは考えられなかった。総ビタミンK濃度に関して、中性脂肪は独立した規定因子であった。中性脂肪濃度は各種アポ蛋白によ

Percentage change in serum intact PTH level after 1 α OH vitamin D3 treatment



Change in serum intact PTH level after 1 α OH vitamin D3 treatment in osteoporosis

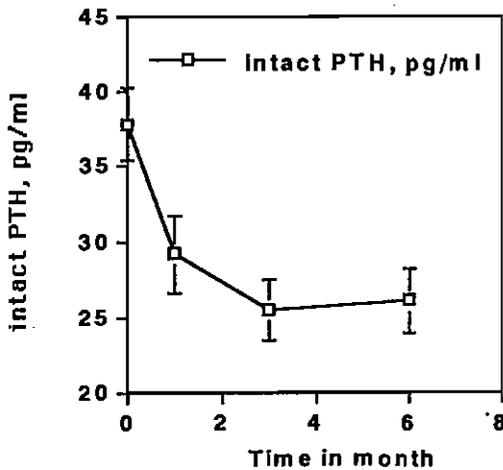


図2 活性型ビタミンD3治療前後の血中intact PTHの変動

り規定されるので、例えばアポEフェノタイプによりその濃度は規定される。今回の対象例中349例でアポEフェノタイプを測定していたので、各フェノタイプ別に血清TG, TC, 総ビタミンK, uc-OC値を比較してみたがアポE4をもつものでTG, TCが高い傾向は認められたもののビタミンK値やuc-OC値に差は認めなかった(data not shown)。従って、なぜ高中性脂肪血症例で血清総ビタミンK濃度が高値をとるのかについては他のアポ蛋白との関連、もしくはアポE量で検討しなければならないと考えられた。表8には血中ビタミンK3分画、uc-OCの分布を各

- 累積ハザード (Q1)
- 累積ハザード (Q2-3)
- △ 累積ハザード (Q4)

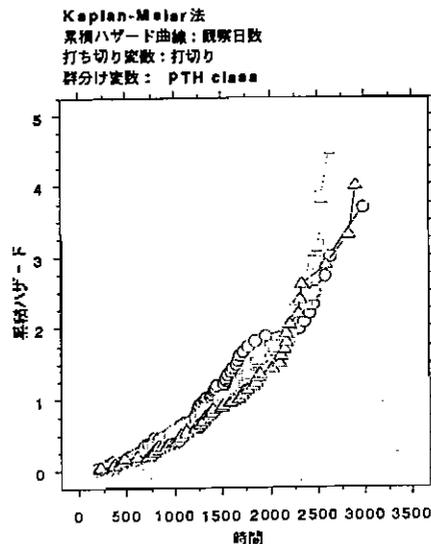
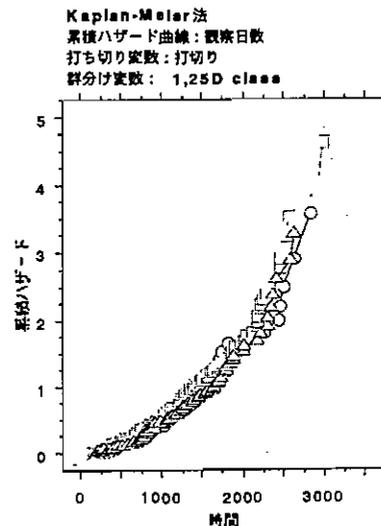
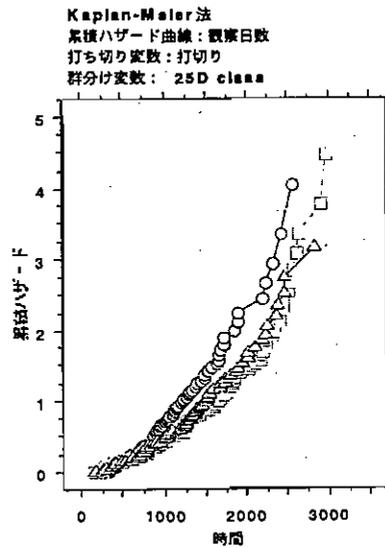


図3 ビタミンDおよびPTHの高値群、正常群および低値群の骨折発生率時間推移 (Kaplan-Meier法、累積ハザード曲線)

Relationship between vitamin K intake and serum level of total vitamin K (log scale)

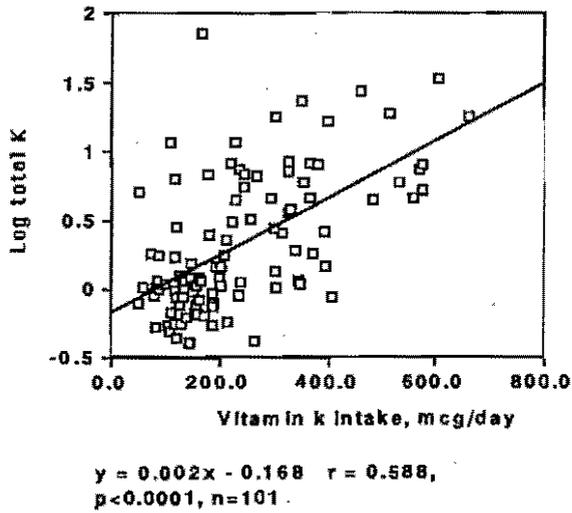


図4 ビタミンK摂取量と血清総ビタミンKレベル (若年者)

Relationship between serum levels of uc-OC and total vitamin K

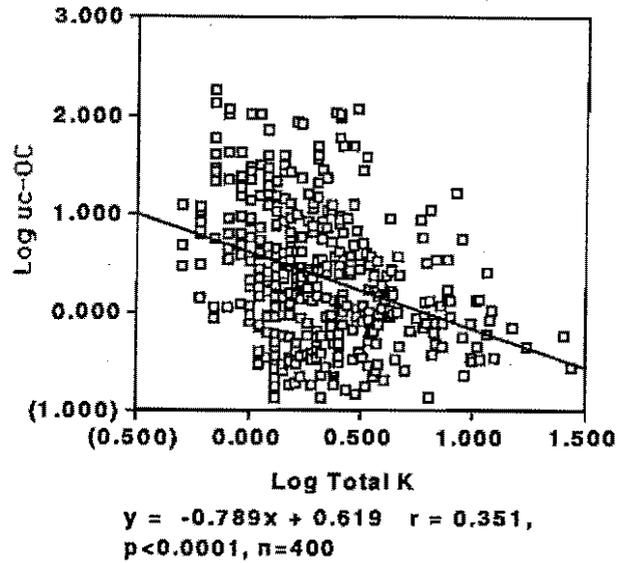


図5 uc-OCと血清総ビタミンK値との相関 (老年女性)

Relationship between serum total vitamin K and triglycerides

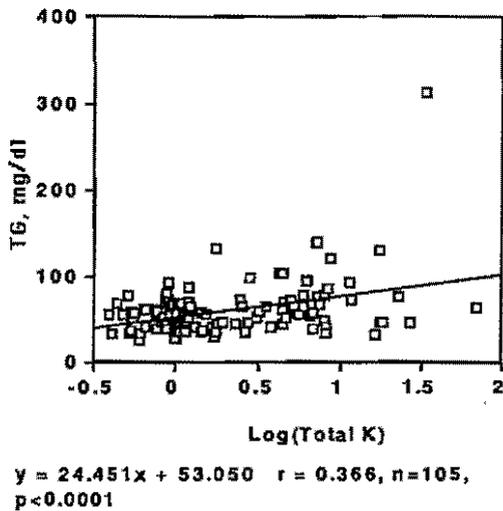


図6 血清総ビタミンK濃度と血清中性脂肪濃度の関係 (若年女性)

Relationship between serum levels of total vitamin K and triglycerides

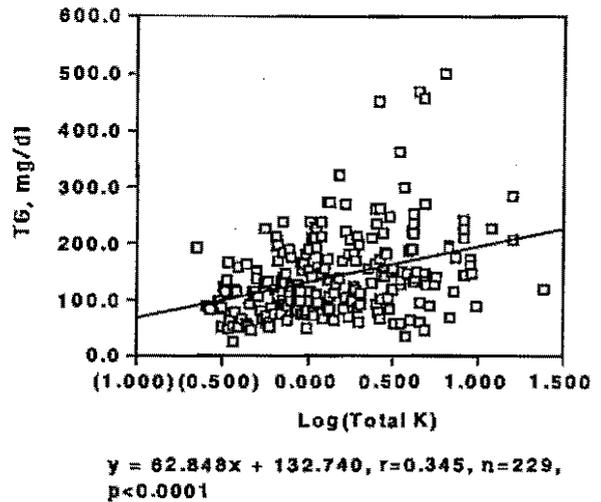


図7 血清総ビタミンK濃度と血清中性脂肪の関係 (老年女性)

表7 1 α OH vitamin D3 1 μ g/day投与後intact PTH値が30%以上低下した群(Yes)と低下しなかった群(No)における基礎25-D値

Group	Number of cases	Basal 25-D, ng/ml (Mean \pm SE)	p
Yes	24	16.4 \pm 0.8	0.0013
No	12	22.0 \pm 1.6	

表8 ビタミンKおよびuc-OCの血中濃度

Group	Pre-menopause (n=142) a	Post-menopause with normal BMD (n=169) b	OP without treatment (n=136) c	OP with vitamin K2 (n=153) d	OP with antiresorber (n=57) e	P In Fisher PSLD
Uc-OC, ng/ml	2.6±1.9	5.7±9.4	5.6±8.7	2.2±2.6	2.9±2.7	a vs b, c <0.0001 b vs d <0.0001 b vs e 0.0051 c vs d <0.0001 c vs e 0.0099
PK, ng/ml	0.53±0.47	1.7±3.5	1.2±0.9	1.4±1.3	1.5±1.4	a vs b,c,d,e <0.0001~0.0092 b vs c 0.0330
MK-4, ng/ml	0.19±0.94	4.92±41.81	1.87±8.40	69.35±95.59	1.51±9.83	d vs a,b,c,e <0.0001
MK-7, ng/ml	3.9±8.1	6.0±11.9	5.0±7.2	7.5±21.7	5.3±5.9	a vs d 0.0301
Total K, ng/ml	4.6±8.2	12.6±44.9	8.0±11.1	77.0±98.1	8.3±11.9	d vs a,b,c,e <0.0001

Mean ± SD

表9 undercarboxylated osteocalcin正常値の基準設定

Group	Mean ± SD, ng/ml	Upper limit, ng/ml	Number of cases
premenopausal control	2.6±1.9	+SD; 4.5 75 percentile; 3.4	142
Postmenopause	4.3±7.5	+SD; 11.8 75 percentile; 4.7	505
K-User	2.2±2.6	+SD; 4.8 75 percentile; 2.3	153

Tentative upper limit of uc-OC=4.5 ng/ml

Total vitamin K ; 25 percentile of postmenopause = 3.0 ng/ml

Definition of vitamin K insufficiency ;

uc-OC >4.5 ng/ml and/or total vitamin K < 3.0 ng/ml

群別に示した。ビタミンK1の血中濃度に比べ、ビタミンK2属の血中濃度が大きければつきを示したが、これはビタミンK2属を含んだ食品、すなわち納豆を毎日摂取するわけではないことが大きな理由と考えられた。uc-OCの濃度は閉経前後で有意に変化した。すなわち、uc-OCは閉経後、閉経前値の約2倍まで上昇した。一方uc-OCの調節因子であるビタミンKレベルは閉経後むしろ増加する傾向にあった。このことは閉経後、ビタミンK要求量が増加するか、またはビタミンK利用率が低下する可能性が考えられた。閉経後にみられるビタミンK利用率の低下の存在の有無は、ビタミンKを過剰に投与して、uc-OCがどの程度低下するかを検討することで解明できるかもしれない。そこで閉経後骨粗鬆症患者にビタミンK2 45mgを連日経口投与し、投与後のビタミンK血中濃度とuc-OC値を検討した。結果的にビタミンK血中濃度はMK-4値で対照群の36倍（1.9ng/ml→69ng/ml）に増加し、一方uc-OCは40%まで低下し（5.6ng/ml→2.2ng/ml）、この値は閉経前女性のそれに等しかった。以上の結果は老年女性ではビタミンKの投与により閉経前のuc-OCの値を得ようとすれば、換言すると骨におけるビタミンK作用不足をビタミンKにより改善しようとすれば、大量のビタミンKが必要であることを示している。閉経後女性のuc-OC値を規定するもう一つの要因は骨代謝回転の亢進である。閉経後女性に骨吸収抑制剤であるエストロゲン製剤やビスフォスフォネート製剤を投与するとuc-OCはほぼ若年者と同様の分布を示した。Uc-OCが骨芽細胞から分泌されたのち骨に取り込まれるか否かは必ずしも明らかではないが、これらの結果はuc-OCの少なくとも一部が一旦骨に取り込まれる画分も存在する可能性を示したものと考えられる（表8、図8）

以上の検討からuc-OCおよび血清ビタミンKの濃度の規定因子相互関連を模式化したものが図10である。ビタミンKは食事、閉経、中性脂肪代謝により規定され、一方uc-OCは閉経、ビタミンK、骨代謝回転により規定されていた。

3) ビタミンK不足の病的意義。

以上の検討から閉経後女性のビタミンK不足の定義をuc-OC 4.5ng/ml以上and/or総ビタミンK血中濃度3.0 ng/ml以下（表9）と暫定的に定め、不足群と充足群間でその臨床背景を比較した。比較対象は閉経後女性で無治療観察群から腎不全、二次性骨粗鬆症の原因疾患を有するもの、原発性副甲状腺機能亢進症例を除いた250例である。

不足群は充足群に比べ既存脊椎骨折有病率が高く（27.5% vs 14.7%, p=0.0122）（図12）、既存長管骨骨折有病率も高い傾向にあった（図11）。今回注目されたことはビタミンK不足例では血管障害（脳硬塞、心筋梗塞、大動脈瘤破裂の既往）の有病率が有意に高かったことである（18.6% vs 9.0%, p=0.0232）（図12）。MGP knockout mouseの結果からビタミンK代謝の血管への関与が想定されているが、そのことを反映したものかもしれない。ビタミンK不足例は高齢者ほど出現頻度が高く（図13）、全身骨密度が低く、PTHが高く、TGが低く、カルシウム摂取量が低く、高代謝回転であった。長期観察により不足群でより骨折発生率が高いか否かを検討するにはまだ統計的パワー不足であった。（表10）

以上の結果は今回定めた参照値が臨床背景からみても病的状態鑑別のよい指標になっていることを示している。

表10 ビタミンK不足状態の臨床背景

Item	Sufficient	Insufficient	P
Age (yo)	66.4±0.7	69.0±0.9	0.0227
Body weight (Kg)	51.1±0.6	49.9±0.9	Ns
Body height (cm)	150.0±0.5	149.9±0.6	Ns
LBMD (g/cm ²)	0.943±0.014	0.909±0.022	Ns
TBMD (g/cm ²)	0.985±0.009	0.949±0.013	0.0157
Al-P (IU)	178±4	184±6	Ns
Osteocalcin (ng/ml)	6.9±0.3	10.2±1.80	0.0466
DPD (nM/mMCr)	6.6±0.2	7.9±0.4	0.0024
Ca (mg/dl)	9.2±0.03	9.2±0.05	Ns
P (mg/dl)	3.5±0.04	3.4±0.05	Ns
Intact PTH (pg/ml)	32.8±1.3	40.6±0.4	0.0030
1,25-D (pg/ml)	34.5±1.4	37.0±2.1	Ns
25-D (ng/ml)	22.9±0.9	22.3±0.9	Ns
Total Cho (mg/dl)	206±3	198±3	0.0490
TG (mg/dl)	154±7	125±7	0.0033
Calcium intake (mg/day)	560±20	440±33	0.0015
Uc-OC (ng/ml)	2.8±0.1	10.2±1.7	<0.0001
Total K (ng/ml)	9.5±1.3	2.8±0.4	<0.0001

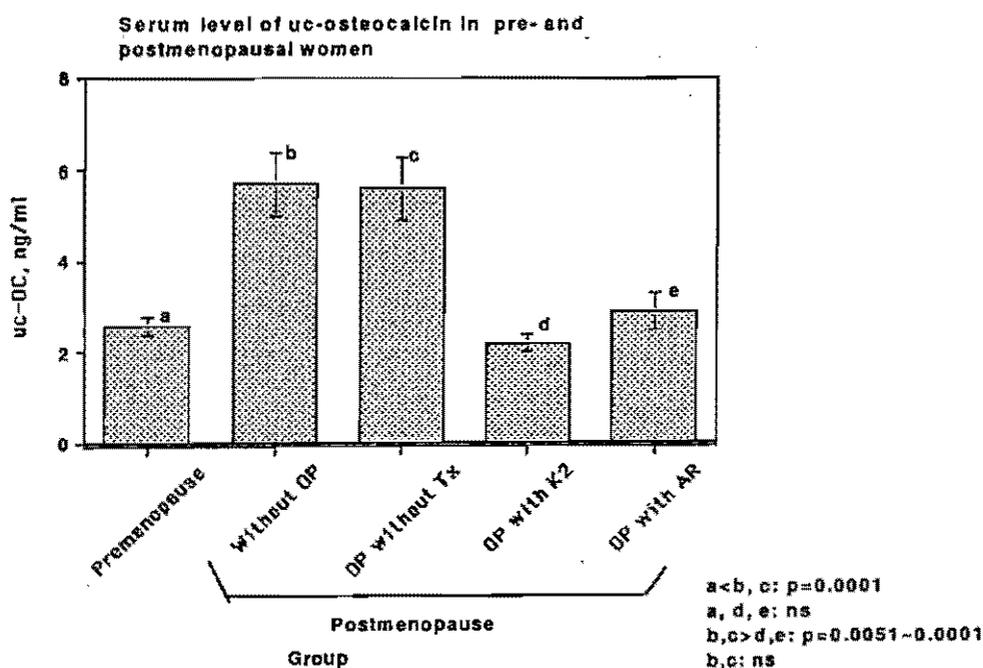


図8 血清uc-Osteocalcin値
OP: Osteoporosis
Tx: treatment
AR: Anti-resorber (estrogen and bisphosphonate)

Serum levels of total vitamin K in pre- and postmenopausal women

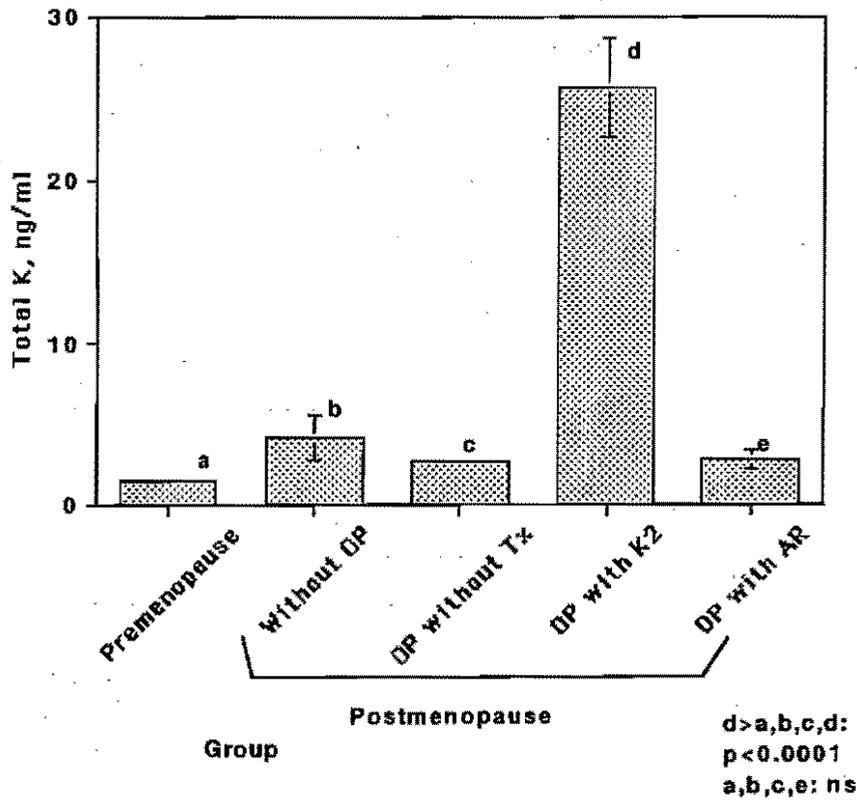


図9 血清総ビタミンK濃度

Metabolic regulation of vitamin K and undercarboxylated osteocalcin (uc-OC) in women

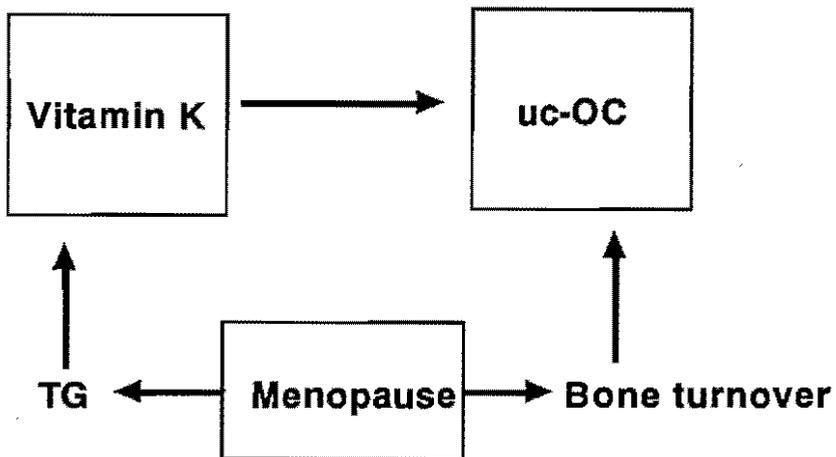


図10 ビタミンKおよびuc-OCの代謝調節

Prevalence of fracture and vitamin K status

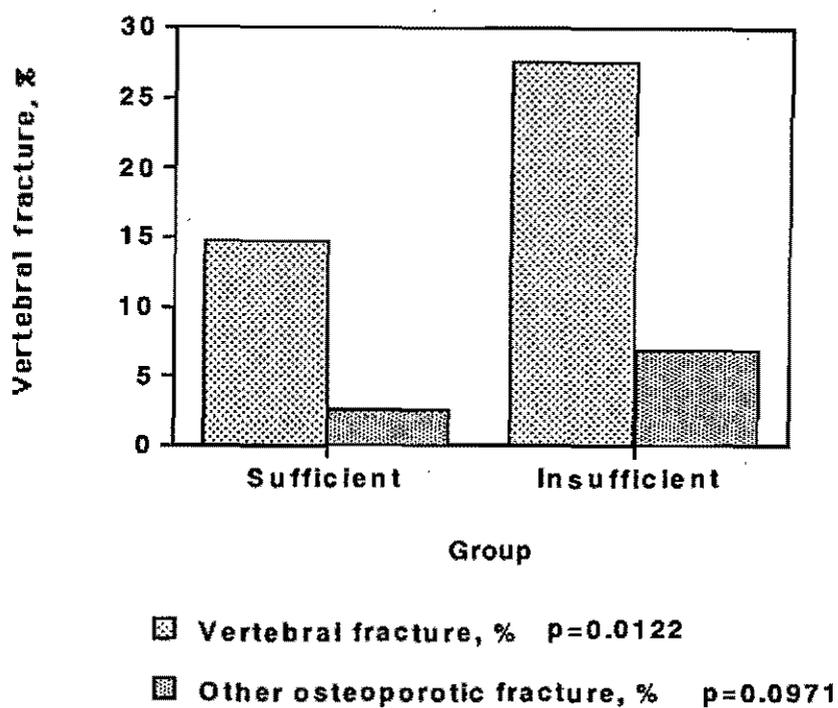


図11 骨折有病率とビタミンK充足状態

Vascular events and vitamin k status

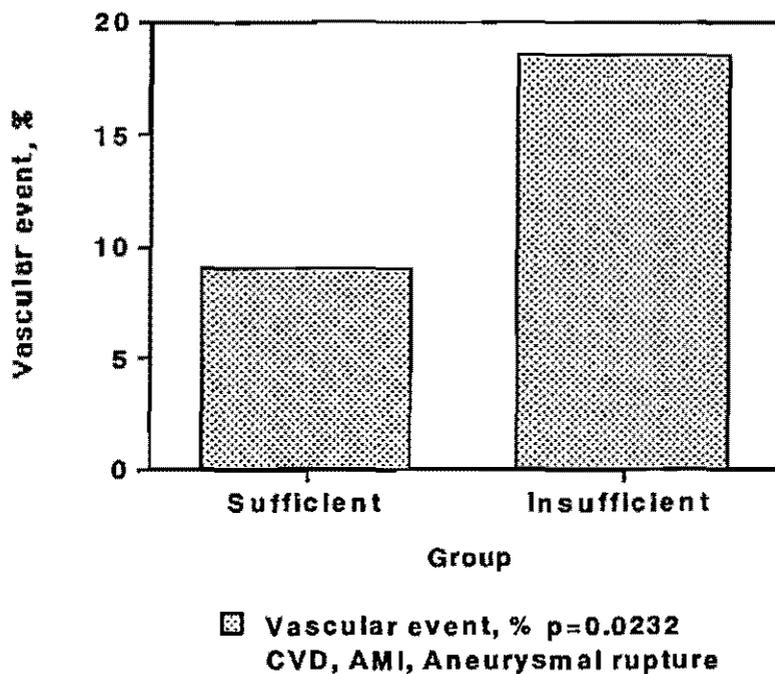


図12 血管障害有病率とビタミンK充足率

Percentage of vitamin K Insufficients and aging

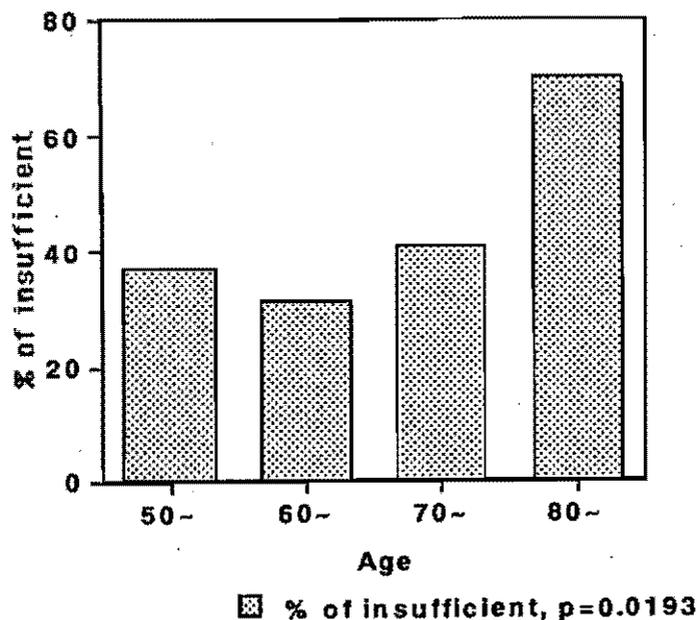


図13 ビタミンK不足例の年齢別出現頻度

考 察

骨代謝調節は数多くの因子により調節されているが、それらのうちでも栄養因子は古くからその重要性が指摘されてきた。しかし、実際の患者で栄養因子のどの程度の異常が本当に病的意義をもつのかについてはいままで詳細な検討はなされてこなかった。最近、ビタミンDに関して、その機能の面から過不足を判断しようとする考え方が提唱され欧米を中心にビタミンD正常値のみなおし作業が行われている。ビタミンKに関しては骨折との関連が指摘されており、ビタミンK不足の反映であるuc-OCの高値例は大腿骨頸部骨折が多く発現すること、骨折を有する例では血清ビタミンK濃度が低値であることなどが報告されてきた。今回の検討では、これらの仮説が日本人でも適応可能であるか否か、またこれらビタミンの正常範囲をどの程度に設定したらよいか、またそれらの異常値を有する例の臨床的outcomeはどのような病態であるか、などの点に関し、主として閉経後女性集団を用いて検討することとした。

各ビタミンの正常値の算出には十分に症例数がそろっているビタミンDに関しては四分位を算出してその中間の二分位に属する例に対し、両端の四分位に属する例のclinical outcomeを代謝面および骨形態面より検討した。ビタミンKおよびuc-OCに関しては閉経前女性の平均値に1SDを加えた値を標準値とした。この値が閉経後女性の75percentile、およびK-userの平均値に1SDを加えた値にほぼ等しかったからである。一方ビタミンKの血中濃度は比較的バリエーションが大きく、食事の影響が大きいことが予想された。しかも血中ビタミンK濃度は中性脂肪の血中濃度に大きく依存するので、中性脂肪濃度が低い閉経前例の値で閉経後例の値を評価できないと考えた。そこで閉経後例の参照値として

閉経後例の25percentile値を用いることとした。ビタミンK不足の判断は上記のuc-OCおよび総ビタミンK値のいずれかを上回るか、下回った時ビタミンK不足と判定し、それ以外を充足と判定した。

結果的に表11に示したごとく参照値を各パラメータにおいて暫定的に定めた。25-Dに関しては、従来骨軟化症の発症が10ng/ml以下でみられることから、その値以下をビタミンD不足とする考え方が一般的であったが、今回、閉経後女性の25-Dの分布から参照値を求めたところ、25percentile以下(15ng/ml)の症例で高代謝回転であり、PTHが高く、亀背が多いという結果をえた。新規骨折発症率もこの群でやや上回っていた。さらに活性型ビタミンD₃を投与してPTH低下作用を観察したところ、16ng/ml以下の25-D値例で有意なPTHの低下が観察でき、それ以上の群ではPTH低下作用は十分観察されなかった。従って、二次性副甲状腺機能亢進症の改善効果を一義的なビタミンD作用と考え、25-Dは15-16ng/ml以上必要であると推論された。最近、HeaneyはPTHレベルがビタミンD作用のsurrogate markerになりうることを論じた(1)。なぜならば、多くの報告が25-DとPTHの負の相関関係を報告しているからである(2-9)。これらの報告のなかで、25-Dの推奨されるべき値として、二次性副甲状腺機能亢進症の存在を考慮すると16ng/ml以上とするもの(6)、12ng/ml以上とするもの(7)、15ng/ml以上とするもの(8)、また20ng/ml以上とするもの(9)など様々であった。今回の我々の検討では15ng/mlが基準と考えられ、この点では欧米人と大差ない値が得られた。

25-Dの低値からどのような臨床的outcomeがもたらされるかは、このビタミン不足の病的意義を考える上で重要なことである。今回の検討では基準値以下の群で低骨密度は見出せなかったが、高代謝回転、二次性副甲状腺機能亢進症、亀背、および新規骨折発症が時間的に早まる傾向を認めた。高代謝回転状態は将来の骨折リスクを高めるので、これらの所見は低25-Dが骨粗鬆症悪化要因となる可能性を示したものと考えられる。

今回我々は1,25-Dの参照値も同時に決定することを試みたが、この結果はある面予想に反した結果であった。1,25-DはビタミンDの最終活性産物であり、いわゆるhormonal formである。従って、このビタミンは老年女性の種々のカルシウム代謝の準異常状態に反応して変動するものと予想される。すなわち、本ビタミンの高値は異常なカルシウム代謝の存在に対する合目的的反応である可能性があり、逆に本代謝産物の高値は当該例のカルシウム代謝が異常であることの証拠であるのかもしれない。結

表11 骨代謝関連ビタミンの参照値

Item	Reference range (round value)
Intact PTH	21-38 pg/ml (20-40)
25-OH vitamin D	15.0 ng/ml 以上
1,25-(OH) ₂ vitamin D	20-39 pg/ml (20-40)
Undercarboxylated osteocalcin	4.5 ng/ml 以下
Total vitamin K	3.0 ng/ml 以上

果的に本代謝産物の高値例では骨粗鬆症の有病率が高く、骨密度が低値であった。一方、1,25-D高値群では二次性副甲状腺機能亢進症はみられず、25-Dも低値ないしは高値も示さなかった。しかし尿中カルシウム排泄は明らかに高値であったので、本代謝産物の高値は腸よりのカルシウム吸収を増し、PTH分泌亢進を予防していると考えられた。

今回のもう一つの目的は老年女性における二次性副甲状腺機能亢進症を定義することであった。その分布から75 percentile値以上をPTH過分泌と定義してみたところ、この群の臨床的outcomeは低骨密度、高代謝回転、低カルシウム、リン血症、低カルシウム尿症であった。このような代謝状況が骨折発生に直結するか否かを検討してみたが、そのような事実は確認できなかった。また既存骨折の有病率も高くなかったことから、老年女性における二次性副甲状腺機能亢進症の存在はビタミンD不足を伴わない限り、骨粗鬆症の重篤化には関与しない可能性が考えられた。

ビタミンDに比べ、ビタミンKはその骨作用が最近研究されてきており、いまだに臨床的な重要性は確立していない。ビタミンKは腸管から吸収されたあと肝臓で優先的に利用されるため(10)、骨や血管などビタミンKの肝臓以外の標的臓器で不足しがちになることが予想される。ビタミンKの血中濃度は低値であると骨折が発生しやすく(11)、その骨作用不足の反映と考えられるuc-OCの高値は骨折有病率を高めるとされている(12-14)。さらに我々はすでにビタミンK2の投与が骨粗鬆症の骨折発生を抑制することを報告した(15)。従って、ビタミンK作用不足の臨床的outcomeは骨折であることが予想される。今回はまだ十分に症例数が確保できなかったため、新規骨折発生に対するビタミンK不足の効果については検討できなかった。

ビタミンKは脂溶性ビタミンであり、血中ではアポ蛋白に結合して各組織に配分されると考えられている。従って、その血中濃度の高低には脂肪代謝が深く関与しているものと考えられた。事実今回の検討からビタミンKの血中の濃度は血清TGと有意な正相関を示した。その傾きは閉経前症例よりは閉経後症例で急峻であった。閉経後にはTGが高値になることはよく知られた事実である。これは閉経後にTGの転送効率が低下した、血管壁におけるLPL活性が低下するためと考えられている。血清TGが比較的low値を示す閉経前女性では比較的low血清ビタミンK濃度で、low uc-OC値を達成できるのに対し、閉経後女性では血清ビタミンK濃度はTG高値を反映して高値であるにもかかわらずuc-OC値は高値を示した。このことは一つには閉経後女性ではビタミンKの細胞への転送が非効率的になっている可能性を示している。事実ビタミンK2投与例では閉経前女性と同等のuc-OC値をえたが、そのために必要とされるビタミンKの血中濃度は閉経前女性の約17倍必要であった。閉経後にビタミンK作用がその血中濃度に比べて減弱してみえるもう一つの可能性は閉経前後における骨代謝回転の差異があげられる。骨粗鬆症患者の骨代謝回転を骨吸収抑制剤(エストロゲン、ビスフォスフォネート)の投与で約40%低下させると血中uc-OCはビタミンK血中濃度の変化なしに、閉経前女性のそれとほぼ同等となった。このことは血中uc-OCの少なくとも一部は骨芽細胞から直接分泌された画分ばかりでなく、骨基質から骨吸収により溶出してきた画分も含まれていることを示している。ゆえにもしも骨代謝回転が同じであれば、閉経後では同じuc-OC値を得るのに閉経前の約2倍(total vitamin K in anti-

resorber-user = 8.0ng/ml vs premenopausal women=4.6 ng/ml) のビタミンK血中濃度が必要であることになる。ビタミンKの利用効率は従って、老年女性で低下しているが、その低下度に関してはいまだに結論することはできない。

ビタミンK不足の臨床的outcomeについては、不足例は加齢とともに増加し、全身骨密度が低値であり、高代謝回転であり、PTH分泌が亢進していた。また血清コレステロールが低く、TGも低値であり、カルシウム摂取量も少なかったことから、おそらく食事量が全体的に少ない症例に多くみられるのではないかと推察された。ビタミンK不足例では既存骨折の有病率が高かったが、注目すべきは血管障害の有病率も高かったことである。ビタミンK不足例はより高齢者に多くみられるので若干の年齢補正が今後されなければならない。血管で分泌されるビタミンK依存性蛋白であるMGPをノックアウトすると血管の石灰化と血管の破綻で当該マウスは死亡することが報告されている(16)。ヒトにおいてもビタミンK不足が血管障害を惹起するのか、換言するとビタミンKの投与が血管障害を予防するか否かは今後検討されねばならない問題と考えられる。

謝 辞

若年女性のデータを提供していただいた女子栄養大学上西一弘博士に深謝します。

文 献

- 1) Heaney RP. Vitamin D: Howmuch do we need, and how much is too much ? Osteoporosis Int 11:553-555, 2000.
- 2) Stein MS, Flicker L, Schere SC et al Relationships with serum parathyroid hormone in old institutionalized subjects. Clin Endocrinol 54:583-592, 2001.
- 3) Reginster JY, Zegels B, Lejeune E, et al. Influence of daily calcium and vitamin D supplementation on parathyroid hormone secretion. Gynecol Endocrinol 15:56-62,2001.
- 4) Fradinger EE, Zanchetta JR. Vitamin D and bone mineral density in ambulatory women living in Buenos Aires, Argentina. Osteoporosis Int 12:24-27, 2001.
- 5) Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al. Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. J Clin Endocrinol Metab. 86:1633-1637, 2001.
- 6) Outila TA, Karkkainen MU, Lamberg-Allardt CL. Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: association with fore arm bone mineral density. Am J Clin Nutr 74:206-210, 2001.
- 7) Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C, et al. Vitamin D status and redefining serum

- parathyroid hormone reference range in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3086-3090, 2001.
- 8) Kauppinen-Makelin R, Tahtela R, Loyttyniemi E. A high prevalence of hypovitaminosis D in Finnish medical in- and outpatients. *J Intern Med* 249:559-563, 2001.
 - 9) Lips P, Duong T, Oleksik A et al. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1212-1221, 2001,
 - 10) Vermeer C, Braam L. Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification. *J Bone Miner Metab* 19:201-206, 2001
 - 11) Hart JP, Catterall A, Dodds RA, et al Circulating vitamin K1 levels in fractured neck of femur. *Lancet* ii: 283, 1984.
 - 12) Plantalech L, Guillaumont M, Leclercq M, et al Impaired carboxylation of serum osteocalcin in elderly women. *J Bone Miner Res* 6:1211-1216, 1991.
 - 13) Szulc P, Chapuy MC, Munier PJ, et al Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 91: 1769-1774, 1993.
 - 14) Vergnaud P, Garnero P, Munier PJ, et al Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: The EPIDOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 82:719-724, 1997.
 - 15) Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin k2 (Menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15: 515-521, 2000.