

5. 渡邊敏明, 谷口歩美, 福井徹, 太田万理, 福渡努, 米久保明得, 西牟田守, 柴田克己(2004) 日本人女性の母乳中ビオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量. ビタミン 78, 399-407.
6. Wright LD, Skeggs HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 56, 95-98.
7. Baker H, Sobota H (1962) Microbiological assay methods for vitamins. *Ad Clin Chem* 5, 173-235.
8. 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠男 (1996)最近の日本人乳組成に関する全国調査(第十報) - 水溶性ビタミン含量について - 日本小児栄養消化器病学会誌, 10, 11-20.
9. Trugo, N. M., Sardinha, F. (1994) Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr. Res.*, 14, 22-33.
10. Arnaud, J., Cotisson, A., Meffre, G., Bourgeay-causse, M., Augert, C., Favier, A., Vuillez, J. P., Ville, G. (1994) Comparison of three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B<sub>12</sub> in serum. *Scand. J. Clin. Invest.*, 54, 235-240.
11. 健康・栄養情報研究会 (1999) 第六次改定日本人の栄養所要量 食事摂取基準 第一出版社, 96-98.
12. 食事摂取基準 (2005年度版)
13. Vitamin B<sub>12</sub> (1998) In: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington DC, p 306-356.
14. Food and agriculture organization/world health organization (1988) Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>. FAO food and nutrition series No23, pp62-73.
15. Specker, B. L., Miller, D., Norman, E. J., Greene, H., Hayes, K. C. (1988) Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B<sub>12</sub>. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 89-92.
16. Donangelo, C. M., Trugo, N. M., Koury, J. C., Barreto Silva, M. I., Fretias, L. A., Feldheim, W., Barth, C. (1989) Iron, zinc, folate and vitamin B<sub>12</sub> nutritional status and milk composition of low-income Brazilian mothers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 43, 253-266.
17. Luhby, A. L., Cooperman, J. M., Donnenfeld, A. M., Herrero, J. M., Teller, D. N., Wenig, J. B. (1958) Observations on transfer of vitamin B<sub>12</sub> from mother to fetus and newborn. *Am. J. Dis. Child*, 96, 532-533.
18. Ford JE, Zechalko A, Murphy J, Brooke OG (1983) Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch Dis Child* 58, 367-372.
19. Gross CJ, Henderson LM (1983) Digestion and absorption of NAD by the small intestine of the rat. *J Nutr* 113, 412-420.
20. Johnson L, Vaughan L, Fox HM (1981) Pantothenic acid content of human milk. *Am J Clin Nutr* 34, 2205-2209.
21. O'Connor D, Green L, Picciano MF (1997) Maternal folate status and lactation. *J Mammary Gland Neoplasia* 2, 279-289.
22. Institute of Medicine (2000) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin and Choline. National Academy Press, Washington, D.C.
23. Lawrence JM, Herrington BL, Naynard LA () Human milk studies. XXVII. Comparative values of bovine and human milks in infant feeding. *Am J Dis Child*
24. Williams RJ, Cheldelin VH, Mitchell HK (1942) The B vitamin content of milk from animals of different species, in studies on the vitamin content of tissues, II, publication 4237, University of Texas. 97.
25. Matoth Y, Prinkas A, Sroka C (1965) Studies on folic acid in infancy. III. Foliates in breast fed infants and their mothers. *Am J Clin Nutr* 16, 356-359.
26. Ford JE, Scott KJ (1968) The folic acid activity of some milk foods for babies. *J Dairy Res* 35, 85-88.
27. American Academy of pediatrics, Committee on Nutrition (1981) Nutrition and lactation. *Pediatrics* 68,435-443.
28. Lim H-S, Mackey AD, Tamura T, Wong SC, Picciano MF (1998) Measurable human milk folate is increased by

- treatment with  $\alpha$ -amylase and protease in addition to folate conjugase. *Food Chem* 63, 401-407.
29. Tamura T, Yoshimua Y, Arakawa T (1980) Human milk folate and folate status in lactating mothers and their infants. *Am J Clin Nutr* 33, 193-197.
  30. Smith AM, Picciano MF, Deering RH (1983) Folate supplementation during lactation: Maternal folate status, human milk folate content, and their relationship to infant folate status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2, 622-628.
  31. Smith AM, Picciano MF, Deering RH (1985) Folate intake and blood concentration of term infants. *Am J Clin Nutr* 41, 590-598.
  32. Mackey and Picciano (1999)
  33. Heard GS, Redmond JB, Wolf B (1987) Distribution and bioavailability of biotin in human milk. *Fed Proc* 46, 897. (Abstract)
  34. Hood RL, Johnson AR (1980) Supplementation of infant formulations with biotin. *Nutr Rep Internat* 21, 727-731.
  35. Goldsmith SJ, Eitenmiller RR, Feeley RM, Barnhart HM, Maddox FC (1982) Biotin content of human milk during early lactational stages. *Nutr Res* 2, 579-583.
  36. Ford JE, Zechalko A, Murphy J, Brooke OG (1983) Comparison of the B vitamin composition of milk from mothers of preterm and term babies. *Arch Dis Child* 58, 367-372.
  37. Friend BA, Shahani KM, Long CA, Vaughn LA (1983) The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins, and lipids of mature human milk I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatr Res* 17, 61-64.
  38. Hirano M, Honma K, Daimatsu T, Hayakawa K, Oizumi J, Zaima K, Kanke Y (1992) Longitudinal variations of biotin content in human milk. *Internat. J Vit Nutr Res* 62, 281-282.
  39. 福井徹
  40. Salmenpera L, Perheentupa J, Pispä JP, Siimes MA (1985) Biotin concentrations in maternal plasma and milk during prolonged lactation. *Internat J Vit Nutr Res* 55, 281-285.

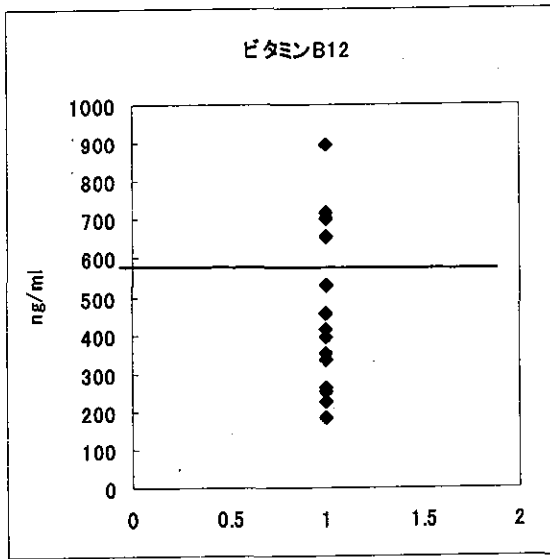


図1 母乳中のビタミンB<sub>12</sub>含量

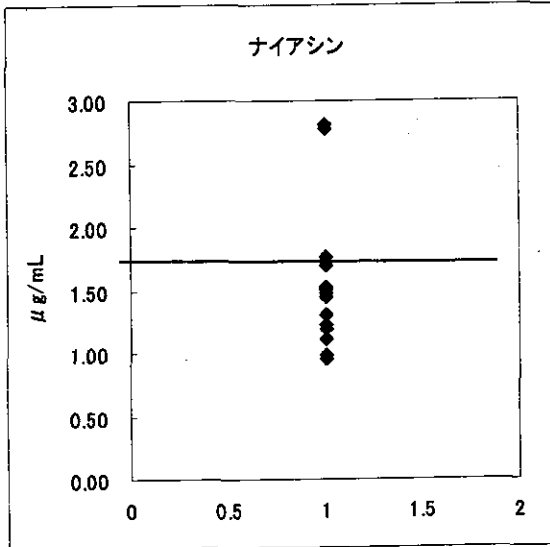


図2 母乳中のナイアシン含量

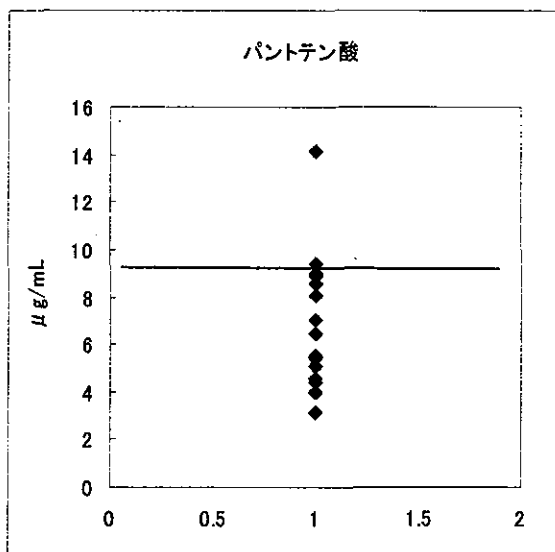


図3 母乳中のパントテン酸含量

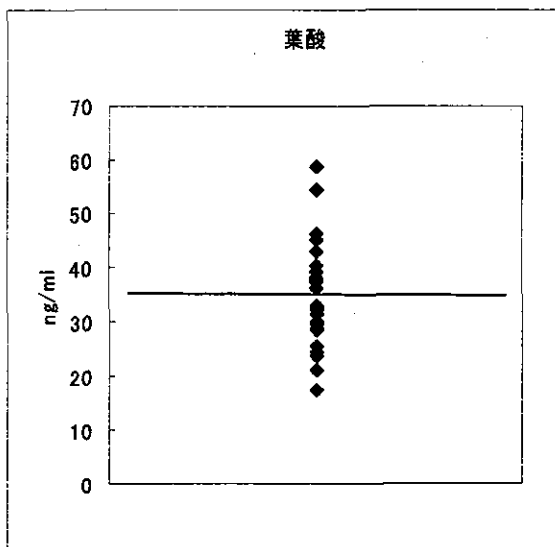


図4 母乳中の葉酸含量

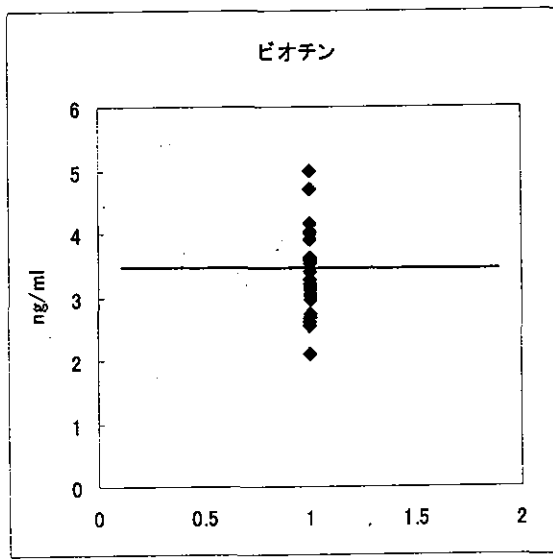


図5 母乳中のビオチン含量

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）  
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究  
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### III. 分担研究者の報告書

#### 10. ビタミンCと葉酸の必要量に関する検討 -ビタミンC, 葉酸-

分担研究者 梅垣敬三 独立行政法人国立健康・栄養研究所 室長

##### 研究要旨

ビタミンの必要量ならびに上限摂取量の策定には、ビタミンの信頼できる分析方法の開発、摂取量を反映する適切な生体指標の選定が要求される。本研究ではビタミンCの分析方法として、高感度かつ迅速に測定できる電気化学検出（ECD）-HPLC法の適用の可能性を検討した。その結果、食品ならびに生体試料のいずれにおいても、電気化学検出-HPLC法が、従来のヒドラジン-UV-HPLC法よりもビタミンC分析に適した方法であるという結果を得た。一方、ビタミンCの生体指標としては、白血球ビタミンC濃度が不足状態を示すよい指標になると考えられている。酸化ストレスが高いと考えられる糖尿病患者のビタミンC濃度をリンパ球と血漿で比較したところ、糖尿病患者では血漿ビタミンC濃度は低下しないが、リンパ球ビタミンC濃度は低下していた。一方、健常人においてビタミンCの摂取量と血漿やリンパ球濃度の関係を考えると、リンパ球中の濃度は推奨量で飽和してしまうため、かなりの不足や病的な状況以外は食事からの摂取量を敏感に反映しない可能性がある。以上の結果から、体内ビタミンCレベルの評価指標としては、評価対象者の状態に応じて血漿とリンパ球の両方を用いることが適切であると考えられた。葉酸については、食品中に存在する多様な形態の葉酸を分析できる微生物学的分析方法の条件設定を行った。

## A. 研究目的

ビタミンの食事からの摂取量と体内レベルを把握することは食事摂取基準策定において重要である。そのためには食品ならびに生体試料のビタミンが迅速かつ適切に分析できる方法・条件の設定、ビタミンの生体内レベルを適切に評価できる生体指標の選定が要求される。ビタミンCは種々の食材ならびに加工食品に含まれており、最近では過剰摂取の傾向になっているとも考えられる。そのため食品中のビタミンC含量の測定と体内レベルの関係を明確にすることが、ビタミンCの必要量の基準策定に重要である。ビタミンCは極めて不安定であり、例えば血漿や血清を分離したのち適切な処理を行わなければ、すぐに分解して正しい値を得ることが困難である。一方、これまで生体内ビタミンCレベルを反映する指標としては血漿や血清が利用されてきたが、最近ではビタミンCを多量に含む白血球ビタミンC濃度が生体のビタミンCレベルを適切に反映する指標と考えられている。ただし、その摂取量と生体濃度の関連などについては明確にはされていない。

食品中のビタミンCは通常ヒドラジン-UV-HPLC法で測定されているが、この方法は全てのビタミンCを酸化型に変換して測定するため、還元型と酸化型のビタミンCを分別定量することが難しく、分析操作も煩雑であるという問題がある。最近、電気化学検出(ECD)-HPLC法によるビタミンCの分析も行われている。以上の状況を考慮し、本実験では生体内ビタミンCを適切に評価できる生体試料の選定、ビタミンCの迅速かつ簡便な分析方法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 食品中のビタミンC測定

食品中のビタミンC濃度は5訂食品成分表に利用されているヒドラジン-UV-HPLC法<sup>(1)</sup>ならびに既報のECD-HPLC法<sup>(2)</sup>で行った。分析試料は細切したのち5%メタリン酸溶液とケイ砂で磨砕抽出し、適宜希釈してヒドラジン-UV-HPLC法ならびにECD-HPLC法による分析試料とした。分析方法の概略は図1に示した通りである。分析した野菜や果物は、チンゲン菜、ピーマン(緑)、いちご、

ジャガイモ(男爵)、ブロッコリー、かいわれ大根、ごぼう、りんご(ふじ)、みかん(いよかん)、バナナ、キウイフルーツ、にんじん、菜の花、ニガウリ、ほうれん草、ピーマン(赤)、アボカドである。ECD法による分析では酸化型ビタミンC(デヒドロアスコルビン酸)の測定も可能であることから、メタリン酸で前処理した試料をジチオスレイトールにより還元処理しHPLC-ECD試料とした。HPLC-ECDの分析条件としては、カラムに資生堂カプセルバックC18(UG120, 4.6x100mm)を用い、移動相は200 $\mu$ M EDTA及び500 $\mu$ M塩化n-ドデシルトリメチルアンモニウム含有200mMリン酸-リン酸カリウム緩衝液(pH 3.0)、流速は0.9ml/min、ECD加電圧は+350mV(Ag/AgCl)、試料の注入量は2 $\mu$ lとした。ヒドラジン-UV-HPLC法の分析条件としては、カラムにセンシュー科学Silica-2150-N(100)6mm x 150mmを用い、移動相は酢酸・n-ヘキサン・酢酸エチル混液(1:4:5 v/v/v)、流速は1.5ml/分、検出器は可視吸光検出器(495nm)、注入量は20 $\mu$ lとした。

### 2. 生体試料中のビタミンC濃度の測定

血液は肘正中皮静脈より採取し、直ちに4 $^{\circ}$ C、1000gで15分間、遠心分離して血漿を採取した。この残りの白血球層を別に分取して1mlの2mM EDTA含有PBSと混合後、Ficoll-Paque™ PLUS 0.2mlを下層に注入し、室温、4500gで4分間遠心してリンパ球層を分離した。得られたリンパ球は2mM EDTA含有PBSで数回洗浄の後、5%メタリン酸に懸濁させ、ECD-HPLC法による分析試料とした。

### 3. 糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度の測定

被験者は41人の2型糖尿病患者(平均年齢63歳、男性25人と女性16人)であり、空腹時の血糖は137mg/dl、ヘモグロビンA1c 7.1%であった。またこれらの患者の中で合併症のある患者は26人、合併症のない患者は15人であった。対象とした健康人は年齢ならびに性別を合わせた50人(男性31人と女性19人)であった。

### 4. 葉酸の測定方法の検討

分析に利用する菌体にはクロラムフェニコール耐性L.casei(ATCC27773)を用いた。葉酸標準品はホリニン酸カルシウム塩五水和物、葉酸定量用培地はDifco社製を

利用した。菌体の濁度はマイクロプレートリーダー（コロナ電気株式会社）を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

実験は倫理委員会の承認を得た後、個人情報等や倫理に関係した事項を遵守して行った。

### C. 研究結果

#### 1. 食品中のビタミンCの測定方法に関する検討

17種類の野菜や果物のビタミンCの測定をヒドラジン-UV-HPLC法とECD-HPLC法で比較したところ、総ビタミンC（還元型+酸化型）としては同様の値を得ることができた（図2）。また、ECD-HPLC法により測定した野菜や果物中のビタミンCはほとんどが還元型であった。図1に示したようにヒドラジン-UV-HPLC法に比べて、ECD-HPLC法は、測定操作のステップが少なく、また酸化型と還元型の両方を迅速、簡便、高感度に測定できるという特徴があった。

#### 2. 生体試料中のビタミンC濃度の測定に関する検討

生体成分中のビタミンC濃度は微量であることから、測定感度の高いECD-HPLC法により分析した。ビタミンCの生体内濃度を反映する指標としては、血漿と血球で検討した。ビタミンCは不安定であることから、採血後のビタミンC濃度の変動を検討したところ、試料を4℃程度に冷却し、直ちに5%のメタリン酸と混合して凍結保存すれば血漿でもリンパ球でも安定した値を得ることができた。一般に好中球のビタミンCが適切な生体内ビタミンCの評価指標といわれているが、好中球は細胞を単離するまでに時間を要する。さらに好中球を分離する際に共存する赤血球を溶血して除去しなければならないことから、好中球の分離調製操作でビタミンCが分解する可能性もある。そのため体内ビタミンCレベルの評価指標として利用する血液細胞は、容易に単離できるリンパ球が適切であると考えられた。

#### 3. 糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度の比較

図3に示したように糖尿病患者の血漿

ビタミンC濃度は健常者と差異はなかったが、リンパ球ビタミンC濃度は健常者に比べて有意に低かった。さらに合併症を持っている患者のリンパ球ビタミンC濃度は、合併症を持たない患者に比べて有意に低かった。この場合も血漿ビタミンC濃度に差異はなかった。

#### 4. 葉酸の分析方法についての検討

葉酸は種々の化学形態をとっており、それら全てを測定するためには微生物学的測定法が適している。しかし、その方法は労力と時間を要し、再現性に問題があった。そこで、分析に利用するL.caseiにクロラムフェニコール耐性菌、菌体をグリセロールに懸濁して凍結保存して菌体を速やかに分析に利用できる処理方法、測定にマイクロプレートを利用する方法を採用した。このような対応により無菌操作の必要はなく、容易にできる条件が設定できた。

### D. 考察

ビタミンCは食品中でも生体試料中でも不安定であり、その分析は迅速に行わなければならない。生体試料中のビタミンC濃度の測定は、試料が十分に得られない場合が多いことから測定感度の高いECD-HPLC法が適していると考えられる。一方、食品中のビタミンC濃度の測定は総ビタミンC（アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸）を測定するヒドラジン-UV-HPLC法による分析が一般的な方法となっている。今回、食品中のビタミンC測定もECD-HPLC法が利用できるかどうか、また一般的な分析方法であるヒドラジン-UV-HPLC法との測定値の関連を17種類の野菜と果物を分析することにより比較検討した。結果に示したように2つの方法により分析した値は極めてよい相関を示すことが明らかになった。ECD-HPLC法によるビタミンCの分析は、測定操作のステップも少なく、感度も高く、さらに必要ならば酸化型のデヒドロアスコルビン酸と還元型のアスコルビン酸も分別定量できることから、食品のビタミンC分析においても優れた方法と考えられる。ECD-HPLC法では試料をメタリン酸で磨砕して、希釈するだけでHPLCの分析試料を調製することができる。そのため、食事



摂取基準の策定において、摂取食品そのものを利用したビタミン C 含量の測定も容易に行うことが可能である。

体内のビタミン C 濃度を反映する評価指標としては、好中球ビタミン C がよいとされているが、好中球は分離に時間を要するという問題があるが、リンパ球は血液からの単離が容易であり、迅速に測定試料を調製することができるため、ビタミン C の評価指標に適していると考えられる。一方、血球のビタミン C 濃度は摂取量が 100mg/日ではほぼ飽和することが知られている<sup>(3, 4)</sup>。この事実は、摂取量が 100mg/日以下の時は、血球ビタミン C が優れた生体指標となるが、100mg/日以上ではビタミン C の摂取量が増加しても血球ビタミン C 濃度は増加しないことを示唆している。血漿ビタミン C は約 500mg/日程度まで摂取量の増加とともに血漿濃度も増加する<sup>(3, 4)</sup>。従って、たんに摂取量との関連を調べる生体指標としては血漿ビタミン C 濃度がより適していると考えられる。

糖尿病等の状態では生体が酸化ストレスを受けることから血漿ビタミン C 濃度の低下が想定される。本研究で糖尿病患者のビタミン C 濃度を測定したところ、血漿ではビタミン C 濃度の低下が認められなかったが、リンパ球では低下が認められ、さらに糖尿病の合併症を有する患者ではより有意なビタミン C 濃度の低下が起こるという結果を得た。この事実は、疾病等のある場合は、血漿ビタミン C と血球ビタミン C 濃度が異なった挙動を示す可能性を示唆する。いずれにしても、生体内ビタミン C レベルを評価する生体指標としては、血漿とともに血球（リンパ球）中の濃度も把握する必要があるものと考えられる。

葉酸の分析については、微生物学的定量方法を採用し、その測定条件を設定した。今後、この方法を利用して、食事葉酸の摂取レベルと葉酸の体内濃度を詳細に検討することができると思われる。

#### E. 結論

ビタミン C の分析方法としては、食品ならびに生体試料のいずれにおいても、電気化学検出 (ECD) -HPLC 法が、従来のヒ

ドラジン-UV-HPLC 法よりも適した方法であると考えられた。また、ビタミン C の生体指標としては評価対象者の状態に応じて血漿とリンパ球の両方を用いることが適切と考えられた。葉酸については、食品中の多様な形態の葉酸を分析できる微生物学的な分析方法の条件設定を行った。

#### F. 健康危機情報

特記する情報なし

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

Yamada, H., K. Yamada, M. Waki, and K. Umegaki, Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetic patients with and without diabetes complications. *Diabetes Care*, 2004, 27(10): p. 2491-2.

##### 2. 学会発表

1) 山岸あづみ, 瀧本秀美, 杉山朋美, 呉 堅, 山田和彦, 梅垣敬三: ヒトにおけるビタミン C の生体利用性に関する基礎的研究, 第 58 回日本栄養・食糧学会(仙台) 平成 16 年 5 月 22 日.

2) 山田薫, 脇昌子, 秋山礼子, 山田浩, 梅垣敬三: 糖尿病患者における緑茶飲用, 血漿および白血球ビタミン C と糖尿病性合併症との関連に関する検討. 日本内科学会第 101 回年会(東京) 平成 16 年 4 月 8 ~10 日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 引用文献

1. 五訂日本食品標準成分表分析マニュアル 科学技術庁資源調査会食品成分部会編 (平成 9 年 4 月) 社団法人資源調査会発行

2. 梅垣 敬三, 吉村 美香, 西牟田 守, 江指 隆年: 「電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーによる血漿ビタミン C の定量方法に関する

- る検討」日本栄養・食糧学会誌 52(2): 107-111 (1999)
3. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 93: 3704-9.
  4. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, et al. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 9842-6.

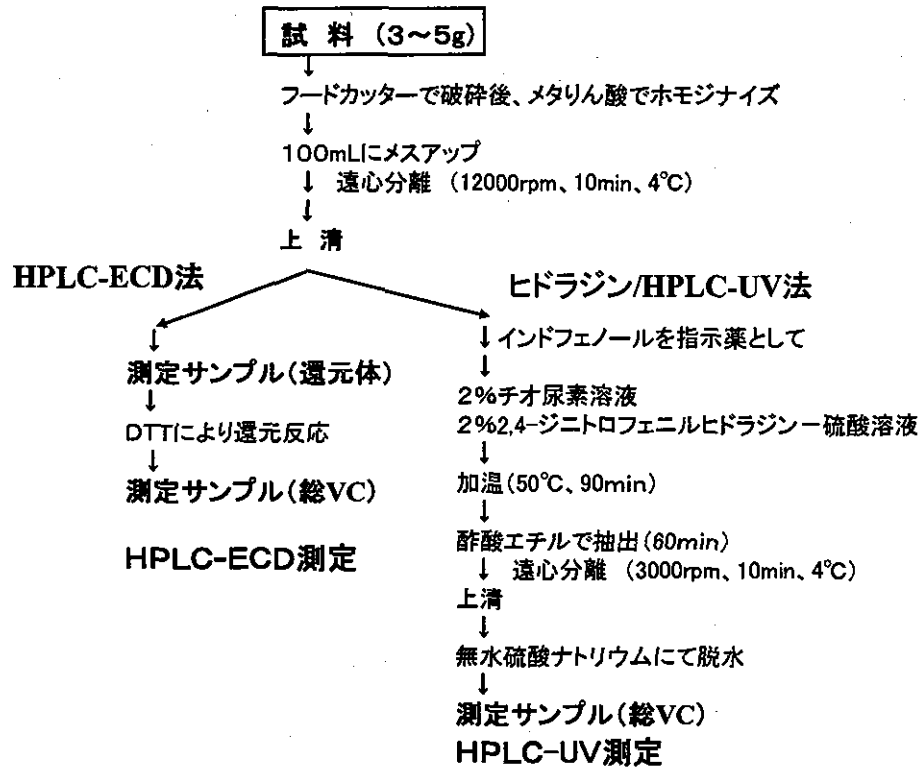


図1 電気化学検出 (ECD) HPLC 法ならびにヒドラジン-UV-HPLC 法によるビタミンC 測定方法の概略

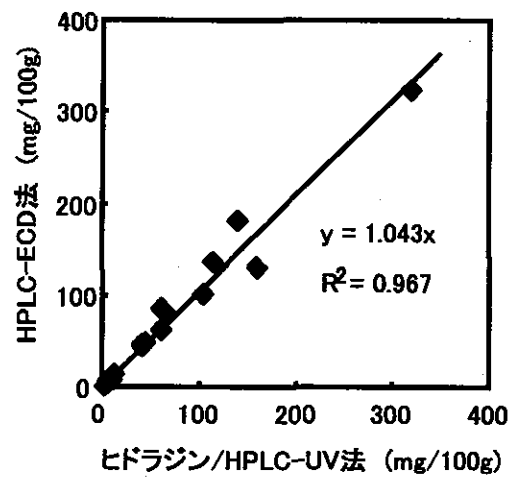


図2 野菜と果物のビタミンC含量の測定における ECD-HPLC 法とヒドラジン HPLC 法の比較. 17種類の野菜と果物のビタミンC含量を ECD (電気化学検出) -HPLC 法とヒドラジン-HPLC 法で測定した.

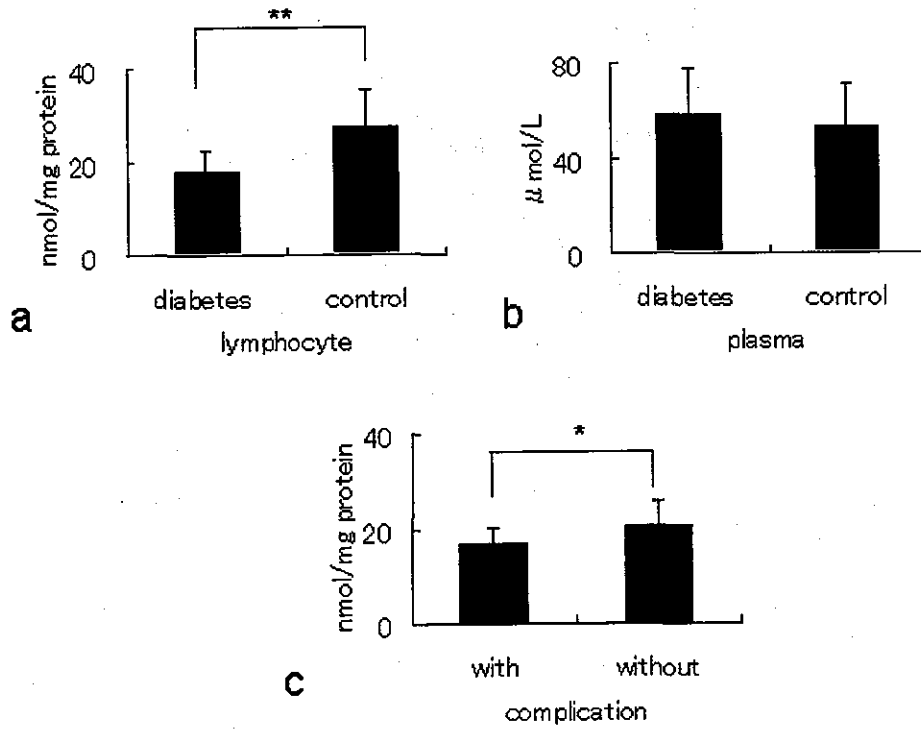


図3 II型糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度  
 a: リンパ球のビタミンC濃度, b: 血漿ビタミンC濃度,  
 c: リンパ球ビタミンC濃度 (合併症の有無)

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 11. 血中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量法の開発

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学 教授

研究協力者 神戸薬科大学 須原義智, 鎌尾まや, 津川尚子

#### 研究要旨

日本人の脂溶性ビタミンの栄養状態と食事摂取量との関係を示す栄養調査研究は少なく、食事摂取基準の策定には欧米のデータが中心に用いられている。この現状に鑑み、日本人の栄養調査データを集積することを目的として正確かつ高精度の血中及び母乳中の脂溶性ビタミン濃度の微量定量法の開発を行った。今年度は血中ビタミン K 濃度測定について新規定量法として LC-APCI/MS/MS 法の確立、蛍光 HPLC 法の改良法を確立するとともに、血中 25-ヒドロキシビタミン D 濃度について LC-APCI/MS/MS 法を用いた新規定量法を確立した。また、乳児栄養を評価する目的で、LC-APCI/MS/MS 法を用いる母乳中脂溶性ビタミン濃度の一斉分析法の開発に着手した。

## 1. LC-APCI/MS/MS 法による血中ビタミン K 濃度定量法の確立<sup>a)</sup>

### 【定量法】

血清 0.5 mL を褐色のスクリュウcock付遠沈管にとり、内部標準物質として<sup>18</sup>O-ラベル化したビタミン K を含むエタノール溶液<sup>1)</sup> 2.0 mL, 精製水 0.5 mL, ヘキサン 3.0 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離する。ヘキサン層 2.5 mL を予めヘキサン 10 mL で膨潤させた Sep-Pak Silica に付加し、吸着物をヘキサン/エーテル (97:3, v/v) 5.0 mL により溶出させる。溶出液をロータリーエバポレーターで乾固させ、得られた残渣をエタノール 60 μL に溶解し、30 μL を以下の条件の

LC-APCI/MS/MS<sup>3)</sup> に適用する。別に調製したビタミン K 標準溶液<sup>2)</sup> の分析を同時に行い、内部標準物質に対する標準ビタミン K のピーク面積比 (Qs) を算出し、検量線を作成する。検体の分析から同様に各々のピーク面積比 (Qt) を算出し、検量線より LC-APCI 分析時の濃度 A を求め、以下の計算により血中濃度を算出する。

血中ビタミン K 濃度 (ng/mL) = A × 36 / 250

1) 内部標準物質を含むエタノール溶液: 内部標準物質である MK-4-<sup>18</sup>O, PK-<sup>18</sup>O および MK-7-<sup>18</sup>O (図 1) をそれぞれ 3.2 ng/mL となるようエタノールに溶解する。

2) ビタミン K 標準溶液: MK-4, PK および MK-7 をエタノールに溶解し、各々の最終濃度が 200, 100, 50, 25, 12.5 ng/mL になるよう調製する。これらのビタミン K 標準溶液には内部標準物質である MK-4-<sup>18</sup>O, PK-<sup>18</sup>O および MK-7-<sup>18</sup>O を各々 50 ng/mL 含むように添加して調製する。

### 3) HPLC 条件:

カラム : CAPCEL PAK C<sub>18</sub> UG120

(4.6 x 250 mm, 5μm, 資生堂社製)

移動相 : [メタノール: 0.1% 酢酸水溶液 (95:5)]: エタノール (100:0-55:45) (35 分間)

流速 : 1.0 mL/min

検出器 : API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

### 【定量精度の確認】

標準血清として和光純薬社製ヒトプール血清 (液状コントロール血清 I, Lot.No.DG118) および標準血清に内部標準物質 50 ng/mL を添加した試料について測定した。図 2 に示すように、標準液ならびに標準血清において各ビタミン K 類は単一ピーク

として検出された。また、図 3 に示すように標準溶液の測定により良好な検量線が得られた。表 1 に検出限界及び標準血清を用いた精度評価の結果を示す。PK, MK-4, MK-7 ともに、日内変動、日差変動ともに RSD 値が低く、回収率もほぼ 100% を満たすことから、本定量法は精度の面においても満足出来るものであると判断した。

## 2. 蛍光検出 HPLC 法によるヒト血漿中ビタミン K 濃度の定量<sup>b)</sup>

### 【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.5 mL を褐色のスクリュウcock付遠沈管にとり、蒸留水 0.5 mL を加えて希釈した後、内部標準物質としてビタミン K の側鎖を飽和アルキル基に置換した 2 種類の合成誘導体 (図 4, 各 1 ng/50 μL エタノール), エタノール 1.9 mL およびヘキサン 3.0 mL を加えてボルテックスミキサーで攪拌した。3000 rpm で遠心分離した後、得られたヘキサン層 2.5 mL を、あらかじめヘキサン 10 mL で膨潤させた Sep-Pak Silica カートリッジ (Waters 社製) に負荷し、ビタミン K 画分をヘキサン/エーテル (97:3, v/v) 5.0 mL により溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をエタノール 200 μL に溶解し、40 μL を以下の 2 種類の条件の HPLC に適用した。

### HPLC 条件 1 (MK-4, I.S.-C16 分析条件)

ポンプ: LC-10AD<sub>VP</sub> (島津製作所社製)

オートインジェクター: SIL-10AD<sub>VP</sub>

(島津製作所社製)

検出器: RF-10A<sub>XL</sub> (島津製作所社製)

励起波長: 320 nm

検出波長: 430 nm

カラム: CAPCEL PAK C<sub>18</sub> UG120

(4.6 x 250 mm, 5μm, 資生堂社製)

移動相: メタノール/水 (95:5, v/v)

流速: 1.0 mL/min

### HPLC 条件 2 (PK, MK-7, I.S.-C19 分析条件)

ポンプ: LC-10AD<sub>VP</sub> (島津製作所社製)

オートインジェクター: SIL-10AD<sub>VP</sub>

(島津製作所社製)

検出器: RF-10A<sub>XL</sub> (島津製作所社製)

励起波長: 240 nm

検出波長: 430 nm

カラム: CAPCEL PAK C<sub>18</sub> UG120

(4.6 x 250 mm, 5μm, 資生堂社製)

移動相: メタノール/エタノール (95:5, v/v)

流速: 1.0 mL/min

MK-4の定量にはMK-4(1, 5および10 ng/mL), I.S.-C16 (5 ng/mL)を含む標準溶液を, PK, MK-7の定量にはPK, MK-7 (1, 5および10 ng/mL), I.S.-C19 (5 ng/mL)を含む標準溶液を用いた. 内部標準物質と測定対象物質の濃度比に対してピーク面積比をプロットした検量線を作成し, 以下の計算式よりビタミンK濃度を算出した.

血漿(血清)中ビタミンK濃度(ng/mL)=RS/V

R: 検量線より得られた内部標準物質に対するビタミンKの濃度比

S: 内部標準物質の添加量 (1 ng)

V: 血漿(血清)量 (0.5 mL)

#### 【定量精度の確認】

標準溶液に対して作成した検量線は, HPLC条件1, 2ともに2から500 pgの範囲で直線性を示した. また, 検出限界はPKについては2 pg, MK-4, MK-7については4 pgと, 十分な感度が得られた.

市販のヒトコントロール血清(和光純薬社製)に3段階の濃度のMK-4, PK, MK-7を添加して添加回収率を求めたところ, 表2に示すように良好な回収率が得られた. 従って, 本法におけるビタミンKの定量は十分な真度であると判断した. また, 市販のヒトコントロール血清および健常人血漿を試料とした場合の日内変動および日差変動は, ヒトコントロール血清のMK-7を除いて10%以下と良好な値を示し, 十分な測定精度が達成されていると判断した(表3). ヒトコントロール血清のMK-7において変動係数が大きくなった理由として, MK-7濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる.

さらに, 健常人20名およびMK-4を投薬されている骨粗鬆症患者10名の血漿中ビタミンK濃度を本法およびLC-APCI/MS/MS法で測定した. その結果, 表4に示す定量値が得られ, 本法およびLC-APCI/MS/MS法の定量結果は良好な相関を示した(図5). 従って, 本法はLC-APCI/MS法と同様に, ビタミンK栄養調査を目的としたヒト血漿中ビタミンK濃度の測定に十分適用可能であると判断した.

#### 3. LC-APCI/MS/MS法による血中25-Hydroxyvitamin D濃度定量法の確立<sup>9)</sup>

本法は, 従来のRIA法で合算定量される25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>), 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub> (25-OH-D<sub>2</sub>)及び24,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (図6)を同時分別定量することを目的として開発した.

#### 【定量法】

ヒト血漿あるいは血清0.1 mLを遠沈管にとり, 内部標準物質として[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub> (側鎖26,27位メチルの水素を重水素化した化合物; 図6)を2 ng添加し<sup>1)</sup>, メタノール0.2 mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌した. 3000 rpmで遠心分離した後, 得られた上清を, あらかじめメタノール/水(7:3, v/v)15 mLで洗浄したBond Elut C<sub>18</sub>に負荷し, メタノール/水(7:3, v/v)15 mLで洗浄後, 25-OH-D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>及び24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>画分をアセトニトリル/メタノール(8:2, v/v)5.0 mLにより溶出させた. 溶出液をロータリーエバポレーターで乾固した後, 得られた残渣をメタノール100 μLに溶解し, 50 μLを以下の条件のLC-APCI/MS/MSに適用した. 別に調製したビタミンD代謝物標準溶液<sup>2)</sup>の分析を同時に行い, 内部標準物質に対する標準ビタミンD代謝物のピーク面積比(Qs)を算出し, 検量線を作成する. 検体の分析から同様に各々のピーク面積比(Qt)を算出し, 検量線よりLC-APCI分析時の濃度Aを求め, 以下の計算により血中濃度を算出した.

血中濃度 (ng/mL) = A × 20/50

#### <HPLC条件>

ポンプ : LC-10AD (島津製作所社製)  
オートインジェクター : SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム : CAPCEL PAK C<sub>18</sub> UG120  
(4.6 x 250 mm, 5 μm, 資生堂社製)

移動相 : メタノール : 水 (95:5, v/v)

流速 : 0.5 mL/min.

#### <APCI-MS/MS装置及びMS検出条件>

装置 : API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

MS検出条件 : Precursor ion/product ion (m/z)

25-OH-D<sub>3</sub> (m/z : 401.4/257.0)

25-OH-D<sub>2</sub> (m/z : 413.4/355.4)

24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (m/z : 417.4/363.1)

[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub> (m/z : 407.4/263.4)

1) 内部標準溶液 : [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub>を400 ng/mLとなるようエタノールに溶解し, 5 μLを添加する. (血中濃度として20 ng/mL添加)

2) ビタミンD代謝物標準溶液 :

25-OH-D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を5, 10, 25, 50, 100 ng/mLなるようメタノールに溶解して調製する. これらの標準溶液はいずれも

[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub>を50 ng/mL含むよう調製する.

#### 【定量精度の確認】

図7に示すように, 標準液ならびに標準血清



において 25-OH-D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, 24, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 及び内部標準物質は単一ピークとして検出された。標準溶液に対して作成した検量線は、図 8 に示すように 5 から 100 ng/mL の範囲で直線性を示した。また、検出限界はいずれも 1 ng/mL と十分な感度が得られた。

市販のヒトコントロール血清（和光純薬社製）を用いて、Intra 及び Inter assay を行ったところ、表 5 に示すように十分な精度が得られた。また、各ビタミン D 代謝物を 20 ng/mL 添加して添加回収率を求めたところ、良好な回収率が得られた（表 5）。血清の 3 段階希釈試験で得られた回帰直線の相関係数は 25-OH-D<sub>3</sub> : 0.9999, 25-OH-D<sub>2</sub> : 0.9967, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> : 0.9997 であった。以上のことから、本法における定量は十分な精度・真度であると判断した。

#### 【従来法との比較】

本法と従来法の測定値の比較を行うため、健康ヒト血漿 98 検体を用いて DiaSorin 社製 25-OH-D RIA キットによる測定値との比較を行った。その結果、図 9 に示すように良好な相関性を示し、両測定方法の妥当性を評価することができた。また、ビタミン D の不足・欠乏の指標であり 25-OH-D 濃度とは逆相関することが知られる血中 PTH 濃度との関係を比較した結果、本法の測定値とは有意な逆相関関係が確認できたが、RIA 法では逆相関の傾向を示すにとどまった（表 6）。このことから、本法の測定はビタミン D の栄養状態を鋭敏に評価できる方法であると判断された。

#### 4. 日本人を対象とした母乳中脂溶性ビタミン含量の測定

##### 【概要】

乳児の食事摂取基準策定の指標となる日本人母乳中の脂溶性ビタミン濃度を測定する。対象ビタミンは、ビタミン A (all-trans retinol), β-カロテン, ビタミン D (vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>), ビタミン E (α-tocopherol), ビタミン K (PK, MK-4, MK-7) とする。測定対象は出産後 2~4 ヶ月（平均 3 ヶ月）の母乳サンプルを中心とし、季節変動についても考慮する。

##### 【定量法】

母乳サンプルを均質化し、内部標準物質として合成した各脂溶性ビタミンの重水素あるいは重酸素標識体（図 10）を加える。アルカリけん化あるいはリパーゼ消化の後、脂溶性ビタミンを抽出し、LC-APCI/MS 法にて一斉検出する。現在は内部標準物質の合成が完

了し、抽出及び測定条件の検討中である。

#### 健康危機情報

特記する情報なし

#### 研究発表

##### 1. 発表論文

a) Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T. "Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Anal. Chem.* 2005, 77(3), 757-63.

b) Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Okano T. "Determination of Plasma Vitamin K by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using Vitamin K Analogs as Internal Standards." *J. Chromatogr. B*, 2005, 816(1-2), 41-8

c) Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T. "Method for the Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* 2005, in press

##### 2. 学会発表

なし

#### 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 引用文献

なし

1. LC-APCI/MS/MS 法による血中ビタミン K 濃度定量法の開発

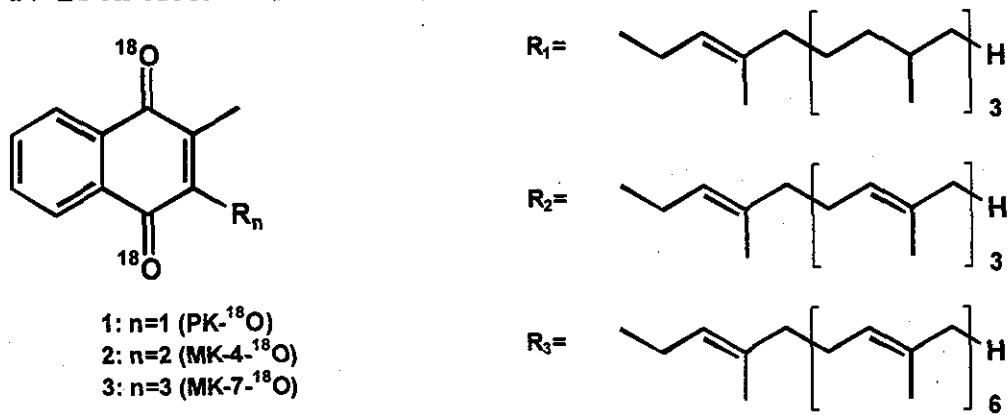
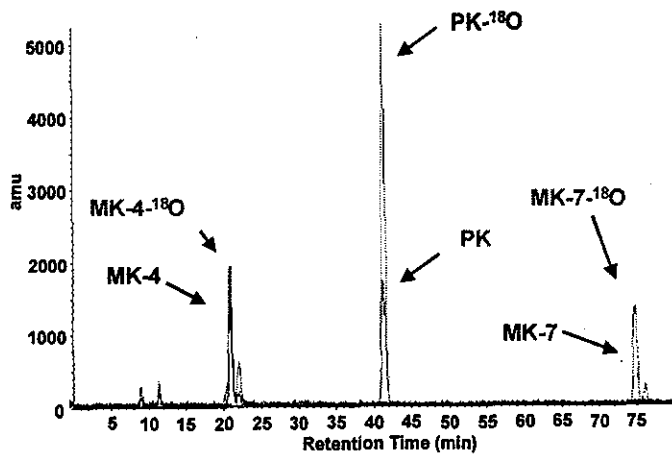


図 1 内部標準物質 (MK-4- $^{18}O$ , PK- $^{18}O$ , MK-7- $^{18}O$ ) の化学構造

(i) Standards and their internal standards



(ii) Human plasma sample with internal standards

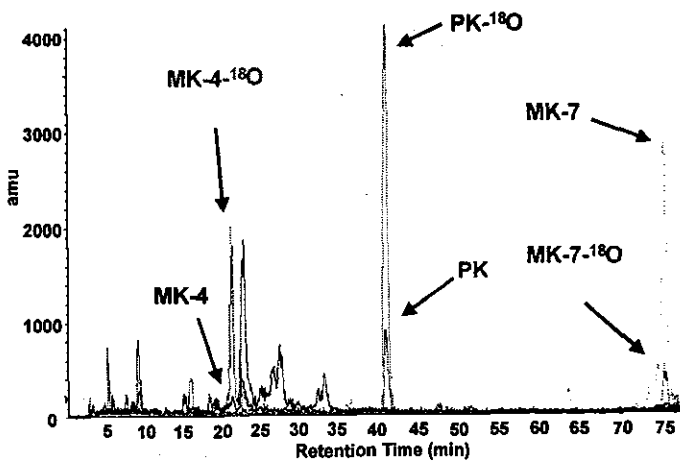


図 2 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム

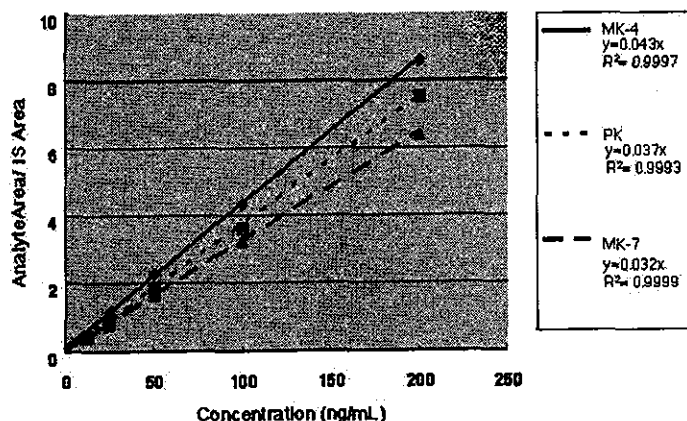


Figure S-1. Calibration Curves for Vitamin K Homologues

図3 ビタミンK類の標準検量線

表1 標準血清におけるビタミンK濃度の測定と精度評価

		PK	MK-4	MK-7
Quantitation limit (pg/mL)		40	50	80
Recovery				
	Mean±S.D. (ng/mL)	1.89 ± 0.05	0.43 ± 0.02	3.19 ± 0.20
	RSD (%)	2.65	4.65	6.27
	Recovery (%)	98 ± 3	102 ± 5	102 ± 6
Intra-assay				
Control serum	Mean±S.D. (ng/mL)	0.95 ± 0.04	0.27 ± 0.01	1.44 ± 0.08
	RSD (%)	6.21	4.79	5.85
Inter-assay				
Control serum	Mean±S.D. (ng/mL)	1.03 ± 0.06	0.21 ± 0.02	1.51 ± 0.04
	RSD (%)	6.21	9.10	2.97

2. 蛍光検出 HPLC 法によるヒト血漿中ビタミン K 濃度の定量

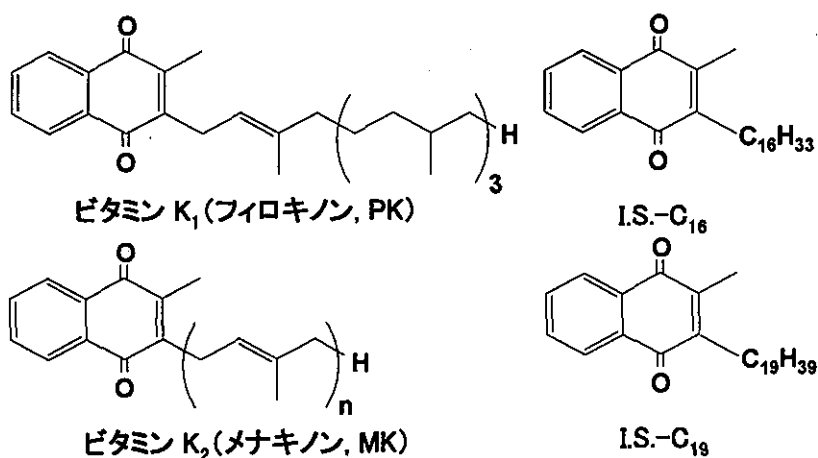


図4 PK, MK-n および内部標準物質の化学構造

表2 添加回収実験の結果

		PK	MK-4	MK-7
低濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	103±5.2	93±8.6	97±6.1
	変動係数 (%)	5.0	9.2	6.3
中濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	99±2.3	101±2.5	101±4.6
	変動係数 (%)	2.3	2.5	4.6
高濃度添加 (n=5)	平均±標準誤差 (%)	99±2.0	99±5.2	104±3.2
	変動係数 (%)	2.0	5.3	3.1

PK 添加量 : 低濃度 0.4 ng, 中濃度 0.8 ng, 高濃度 1.6 ng

MK-4 添加量 : 低濃度 0.1 ng, 中濃度 0.2 ng, 高濃度 0.4 ng

MK-7 添加量 : 低濃度 0.75 ng, 中濃度 1.5 ng, 高濃度 3.0 ng