

介護老人福祉施設入所者，平均年齢 87.6±8.0 歳の高齢者 50 名（男性 15 名，女性 35 名）を対象とした．血中ビタミン D 濃度には季節変動が知られているので，25OHD 濃度が最も高値となる夏季に検討した．

ビタミン D 栄養状態の指標として血清 25OHD 濃度，ビタミン D 欠乏/不足の鋭敏な指標として血清 intact-PTH を測定した．ビタミン K 関連では，血清 PK・MK-7，また骨代謝マーカーとして，骨形成マーカーである血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP)，骨吸収マーカーである血清 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (血中 NTx) を測定した．

全対象者 50 名を対象に食事調査を実施した．施設の栄養提供量と喫食率 (朝・昼・夕食に関しては，主食と主食以外の副食に分けて喫食率を調査し，1 ヶ月の平均摂取量を算出した．エネルギーに関しては全対象者とも「身体活動レベル I」として算出した．

今回の対象者における摂取量は，ビタミン D (μg) が 6.9 ± 1.4 (中央値 7.7)，ビタミン K (μg) が 176.5 ± 112.5 (中央値 168.8)，Ca (mg) が 493.6 ± 53.5 (中央値 504.1) で，Ca 摂取はやや少ないものの，ビタミン D は目安量の約 1.5 倍，ビタミン K は約 2 倍を摂取していた．一方，血中濃度については，ビタミン D に関しては，血清 25OHD が $11.0\pm 3.1\text{ng/ml}$ ，と著しく低い値であり， 10ng/ml が 17 例 (34%)， $10\text{-}15\text{ng/ml}$ が 28 例 (54%)， $15\text{-}20\text{ng/ml}$ が 4 例 (8%) で， 20ng/ml を超えているのは， 20.8ng/ml の 1 例のみで

あった．また血清 25OHD 濃度と intact PTH 濃度は，有意の逆相関を示した．

今回の対象者におけるビタミン K 血中濃度は，PK が $0.62\pm 0.36\text{ng/mL}$ ，MK-7 が $0.52\pm 0.36\text{ng/mL}$ と低い値であった．また骨代謝マーカーについては，骨形成マーカーである BAP が $30.1\pm 11.5\text{U/L}$ と基準値である $7.9\text{-}29.0$ を上回り，また骨吸収マーカーである血清 NTx も $22.3\pm 6.9\text{nmolBCE/L}$ と，基準値である $7.5\text{-}16.5$ を超えていた．

以上の調査結果より，ビタミン D・K とともに，2005 年版摂取基準における目安量を大きく上回る量を摂取しているにも関わらず，血液中濃度はいずれも低かった．血清 PTH 濃度が 25OHD 濃度と逆相関し，血清骨代謝マーカーが高値を示したことから，これらビタミンの欠乏/不足は，実際に骨代謝に悪影響を及ぼし，骨折のリスクを増大させている可能性が危惧された．

III. 考察

1. 脂溶性ビタミンに関する摂取基準策定の方法について

従来，管理栄養士は食事調査のみを行い，医学系研究者は血液・尿検査を専らに行う傾向があり，同一対象者から食事調査と血液・尿検査を同時に行った報告に乏しかった．しかし摂取したものがそのまま 100% 吸収されて，体内で利用されるはずがないことは言うまでもない．実際 2005 年版摂取基準におけるビタミン D の項には，血液中ビタミン D 濃度と摂取量を対比した表が載っているが，よく見ると別々の資料からのデータをあわせたものである．今回の調査に

おける一つの大きな特徴は、可能な限り同一対象者から食事調査と血液・尿検査を同時に行ったことである。IBD患者・高齢者調査では、このような方法論に拠って調査を行ったが、大腿骨頸部骨折患者については、それまで通院していたわけではない患者が救急搬送されてきて、すぐに手術が行われるという状況のため、食事調査はできなかった。

さてIBD患者においては、一見ビタミンD・Kを十分摂取しているように見えるが、血液中濃度は低く、血液中ビタミン濃度は、これらビタミンの摂取量とは相関しないが、脂質摂取量とは相関するという結果であった。今回の報告書には載せていないが、最近フォローアップの調査を行ったところ、免疫抑制剤併用により脂質摂取制限の緩和を行った例にあつては、血清ビタミン濃度の改善、さらに骨密度の増加が見られた。

このように、脂溶性ビタミンに関しては、摂取されたものがそのまま体内に吸収されるとは言えないので、可能な限り食事調査と血液・尿検査を同時に行う形で、調査研究を行うべきであると考えられた。

また各栄養素に関して、摂取基準を決める際、その栄養素単独ではなく、関連の他の栄養素をあわせて考える必要がある。その代表的な例は、ビタミンDとカルシウムであろう。しかし今回の結果は、脂溶性ビタミンに関しては、脂質摂取もまた、脂溶性ビタミンの摂取基準を決めるにあたり、重要な要因であることを示している。従来、通常の慢性肝炎・肝硬変においては、血液中ビタミンD濃度は低下せず、骨粗鬆症は

起こさないが、胆汁の流れが妨げられる原発性胆汁性肝硬変(PBC)では、高率に骨粗鬆症が起こり、ビタミンD吸収障害が重要な役割を果たしていることが知られている³⁾。すなわち、胆汁が十二指腸に十分到達しない状況では、脂溶性ビタミンの吸収が著しく阻害されるということである。すなわち、脂溶性ビタミンに関しては、吸収を阻害する要因をもあわせて考察する必要があるものと考えられる。

2. ビタミンの欠乏と不足

緒言にも述べたように、近年古典的欠乏症を起こすような重症の「欠乏」より軽度の「不足」であっても、疾病の原因となることが注目されている。ビタミンDとビタミンKに分けて述べる。

(1) ビタミンD

骨はタンパク（主にコラーゲン）の枠組みがまず作られ、その上にリン酸カルシウムが沈着する（石灰化）という機構で形成される。したがって、ビタミンD欠乏によってカルシウムの吸収障害の結果、骨における石灰化障害が起こる。これが小児期に起こったものがクル病、成人期に起こったものが骨軟化症である。歴史的には、産業革命頃イギリスにおいて、クル病・骨軟化症が多発し、日光浴、肝油にて治癒したことが有名であるが、栄養状態・住環境の改善などにより古典的なクル病・骨軟化症はほとんど見られなくなり、ビタミンD欠乏症はいったんあまり注目されなくなった⁴⁾。しかし1970年代以降、血液中ビタミン濃度の測定が可能となり、1980年代以降特に高

齢者のビタミンDについて報告が多く見られるようになり、クル病・骨軟化症を起こすほどのビタミンD欠乏でなくても、骨粗鬆症・骨折の原因になることが明らかとなってきた。

このような状況を受けて、最近欧米においては、vitamin D deficiency(欠乏)と vitamin D insufficiency(不足)という言葉が使い分けられるようになった。すなわち deficiency は、クル病・骨軟化症をきたすような、より重症のものを指す。

一方 insufficiency はクル病・骨軟化症はきたさないより軽度のものである。本来ビタミンDと副甲状腺ホルモン(PTH)は協調して、血清カルシウム濃度を維持するのが役割である。血清カルシウム濃度が低下しそうになると、PTH分泌が亢進する。PTHは、骨吸収亢進、尿細管でのカルシウム再吸収に加えて、腎臓におけるビタミンDの活性化を促進する。ここで活性化されたビタミンDが、小腸からカルシウム吸収を促進する。しかしこの経路がどんどん促進されたのでは、高カルシウム血症が起こりそうだが、ビタミンDはPTH分泌を抑制する。このようにして、PTH・ビタミンD系は協調しつつも、血清カルシウム濃度が一定の範囲に維持されるような、フィードバック機構が成り立っている。さてビタミンDが不足すると、ビタミンDによる抑制がはずれて、PTH分泌が亢進し、それによって骨吸収が促進、すなわち骨粗鬆症が起こることとなる。

ビタミンDに関して、「第6次改訂日本人の食事摂取基準」においては、成人及び高

齢者に対する所要量は1日100IUとされており、その決定の根拠として、「20~46歳の人で、68IU/日のビタミンD摂取を数年間続けると骨軟化症が認められるようになり、100IU/日では発生はみられなかったとの報告があるので、100IUとした」という記載がある。しかしそこで引用されているのは1969年の論文であり、血液中ビタミンD濃度が測定できるようになり、不足の意義が注目されるようになるより以前のものである。すなわち「第6次」におけるビタミンDは、欠乏対策を主に考えたものであった。「2005年版日本人の食事摂取基準」においては、目安量が200IUに変更され、ビタミンD欠乏/不足の指標としてのPTHの意義についても言及されるなど、不足についても考えられ、従来と比べると倍増増加しているが、欧米の基準と比較するとまだ低い値である。

ビタミンD不足を防ぐという観点に立った場合、所要量を決定するためにはどのような方法があるだろうか。これには2つの方法が考えられる⁵⁾。一つの方法は介入研究によるもので、ビタミンDを投与して、その前後で血清PTH濃度を測定するものである。もしビタミンD不足のためにPTHが上昇していれば、ビタミンD投与により不足が解消するのでPTHは低下するが、ビタミンDが充足しており2次性副甲状腺機能亢進症を起こしていないのであれば、それ以上ビタミンDを投与してもPTHは低下しないはずである。しかしわが国において、介入研究はほとんど行われていない。

もう一つは横断調査の結果によるもので、

ビタミンD 栄養状態の最もよい指標は、血清 25OHD 測定であり、ビタミンD 欠乏/不足の最も鋭敏な指標は、血清副甲状腺ホルモン (PTH) 測定である。ビタミンD 充足の判定に普通用いられる方法は、横軸に 25OHD、縦軸に PTH をプロットし、PTH が上昇しない 25OHD 濃度をもって閾値とするものである。この方法で決めた、ビタミンD が欠乏/不足しない血清 25OHD 濃度については、報告によって多少の相違はあるが、20ng/ml 未満であれば充足していないことには、おそらく全く異論がないと考えられる。今回の対象者においては、ほぼ全例 20ng/ml 未満であり、10ng/ml 未満という、重症の欠乏と思われる例も 3 分の 1 以上に見られた。しかも 20ng/ml というのはおそらく低すぎる値であり、30ng/ml が必要であるという報告も少なくない⁶⁾。

ビタミンD が欠乏/不足すると、PTH 分泌が亢進し、そのために骨吸収が促進される。二次的に骨形成も亢進するので、骨全体として、骨形成・骨吸収とも亢進した高代謝回転状態となる。今回の調査結果において、血清 25OHD 濃度と血清 intact PTH 濃度は逆相関を示し、骨代謝マーカーは、骨形成マーカーである BAP、骨吸収マーカーである NTx とも、基準値を上回っていた。すなわちこれら対象者においては、ビタミンD が充足していないことが、実際に骨代謝異常につながっていることが示唆される。骨折の危険因子としては、骨密度低下が最も有名であるが、骨の高代謝回転は、骨密度とは独立した骨折の危険因子である⁷⁾。

骨形成は、完成にはかなり長い時間を要

する過程である。コラーゲンなどの枠組みの上にリン酸カルシウムが沈着して骨ができること述べたが、この課程が完成するには数ヶ月かかる。したがって、あまりに早いペースで、骨吸収・骨形成を繰り返すということは、完成度の低い未熟な骨の割合を増加させることとなる。骨粗鬆症の診療において、ほとんど骨密度のみが考慮された時期もあったが、最近では、その他にも多数の危険因子が存在し、最も重要なことは骨折を防止することであると考えられている⁸⁾。骨密度は骨折発生を予測する大切な要素ではあるが、近年骨質もまた、重要な因子であると考えられている。薬物治療において、必ずしも骨密度増加効果と骨折予防効果は比例しない。例えば、ラロキシフェンという女性ホルモン誘導体は、骨密度増加効果から予測されるより、はるかに大きな骨折防止効果を発揮し、骨質を改善するものと考えられている⁹⁾。一方、フッ素は著明な骨密度増加効果を示すが、骨折は逆に増える。これはフッ素によって一見増加するのは、質の悪い骨であると考えられている¹⁰⁾。

骨の高代謝回転は、それ自身が、骨密度低下とは独立した、骨折の重要な危険因子である。現在世界中で最も多く処方されている骨粗鬆症治療薬はビスフォスフォネート系薬剤である。これは強力な骨吸収抑制剤であり、著しく骨密度を増加させるとともに、骨折発生率を著しく低下させる。しかしこのような著明な骨折予防効果のうち、骨密度増加によって説明できるのは、効果のうちごく一部にしか過ぎない。骨密度増

加が見られなくても、高代謝回転が補正されただけで、骨折発生率が低下することが知られている。したがって、ビタミンD不足はおそらく、骨折リスク増加を招く、重大な要因であると考えられる。

(2) ビタミンK

血液凝固因子は、グルタミン酸残基(-Glu)に新たなカルボキシル基が導入され、-Gla残基となることによって活性化される。ビタミンKの最も基本的な役割は、この反応を触媒する酵素 γ -carboxylaseの補酵素として作用することである。

しかしビタミンKによってGla化されるタンパクは、血液凝固因子以外にも存在する。骨の基質タンパクとして最も多いのは、コラーゲンであるが、オステオカルシン

(osteocalcin, bone Gla protein; BGPとも呼ばれる)は非コラーゲンタンパクとしては最も多く存在する。またマトリックスグラタンパク(matrix Gla protein; MGP)は、骨や血管に存在する。

「第六次改定日本人の栄養所要量」においては、ビタミンKの肝臓以外での作用については、考慮されていなかった。「日本人の食事摂取基準(2005年版)」において初めて、骨折の予防に必要なビタミンKは、肝臓での作用のみを考えた場合に比べて多い可能性に言及されたが、摂取基準策定への取り入れは見送られている。すなわち現行の食事摂取基準は、肝臓以外におけるビタミンKの役割を考慮したものではない。

近年、骨折予防におけるビタミンKの意義を示す論文が報告されつつある¹¹⁾。Booth

らによると、ビタミンK摂取量によって4群に分けて分析したところ、ビタミンK摂取量の最も高かった群の骨折リスクは、最も低かった群のリスクの半分以下であった¹²⁾。またVergnaudらによると、骨密度低下によって大腿骨頸部骨折のリスクは2.4倍、ucOC(undercarboxylated osteocalcin; Gla化されていないオステオカルシン、骨におけるビタミンK作用不足の指標)高値によって1.9倍に増加し、骨密度低下とucOC高値の両方を有する例では、骨折のリスクは5.5倍にも上昇し、ucOC高値すなわち骨におけるビタミンKの作用不足は、骨密度とは独立した骨折の危険因子であった¹³⁾。

治療的介入に関しては、白木によっては、ビタミンK₂投与群においては、ucOCが低下し、骨密度低下が防止され、さらに新規骨折発生が有意に減少したと報告し¹⁴⁾、また佐藤らは、アルツハイマー病女性患者に対し、ビタミンK₂・D₂・カルシウム補給を行ったところ、非椎体骨折の発生が著しく抑制されたと報告している¹⁵⁾。

このように骨において、ビタミンKが不足しやすい理由の一つは解剖学的構造である。腸管から吸収されたビタミンKは、門脈を通過して肝臓に運ばれ、その後肝臓以外の組織に至ることから、ビタミンKは、肝臓でまず血液凝固因子のGla化に使われた後のものが肝臓以外で利用されるわけであり、これをfirst pass effectと言う。したがって、肝臓ではビタミンKが充足していても、骨や血管など肝臓では不足しているという状況が十分起こりうる。

3. 高齢者の問題点

脂溶性ビタミンに関しては、摂取したものがそのまま生体内に吸収されるとは言えないことを上に述べたが、もう一点、生体内に入ったものが、そのまま作用しうるか、という問題がある。高齢者は特にこういう点が問題になりやすい集団である。

吸収に関しては、脂溶性ビタミン吸収と脂質摂取の問題を上に述べたが、高齢者においては、吸収を阻害する要因が複数存在するものと考えられる。

さらに、ビタミンDやKが体内に入ったとしても、それがそのまま作用できるわけではない。

例えばビタミンDに関しては、25水酸化酵素、 1α 水酸化酵素の作用を受けて、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ となり、この形でホルモンとして作用を発揮する。加齢とともに 1α 水酸化酵素の活性は低下する。いわばビタミンD抵抗性の状態になっているわけで、仮に吸収障害がなかったとしても、若年者と同じだけの作用を発揮するには、若年者より多くの摂取を要することが考えられる。

ビタミンKは、細胞内で還元型ビタミンKとなり補酵素として作用し、K自身は酸化型となるが、再度還元反応を受けて再利用される(ビタミンKサイクル)。細胞内のビタミンK含量は低く、1分子のビタミンKが何度も再利用されるものと考えられているが、加齢とともに、このビタミンKサイクルの効率は低下する。最近津川らは、血清 undercarboxylated osteocalcin (ucOC)/intact osteocalcin (iOC)比と、血清ビタミンK濃度の関連を発表している。ucOC

はGla化されていないオステオカルシンであるから、この比率は骨におけるビタミンK作用不全の指標となる。この比を上昇させない、すなわち骨においてビタミンKが充足する、血清ビタミンK濃度を求めると、71歳以上では明らかに、より若年者より高かった¹⁶⁾。すなわちビタミンKに関しても、吸収障害がなかったとしても、若年者と同じだけの作用を期待するためには、はるかに大量のビタミンK摂取を要することがわかれる。

4. 結語・今後の摂取基準策定にむけた提言

(1) 今後の課題

本調査において特に高齢者を対象としたのには、いくつかの理由がある。

一つの理由は、上にも述べたように高齢者は、特に摂取と吸収・体内利用に乖離の見られる可能性が高い集団であることである。脂溶性物質の吸収は、食事からの脂質摂取量、胆汁酸の分泌量、膵臓消化酵素の分泌量などの影響を大きく受けるが、高齢者においては、これら条件のいずれもが低下していると考えられる。

さらに、ビタミンD・Kは、骨の健康に欠かせない栄養素であり、骨粗鬆症に伴う骨折は圧倒的に高齢者において頻度高く起こる。したがって、高齢者において一層、骨の健康を意識した食事摂取のあり方を考えねばならないと思われたことである。

今後高齢者におけるビタミンD・Kの摂取を考えるにあたっては、骨の健康、骨折予防をも考慮する必要があると思われるが、

その場合大きな問題となるのが、摂取基準策定の際に確実なエビデンスと言えるようなデータをどのように構築するかという問題である。

(2) ビタミンD

今回の研究結果より、少なくとも高齢者においては、現行の5 μ gよりはるかに多い量を摂取しないと、ビタミンD栄養状態の指標である、血清25(OH)D濃度が20ng/mlに到達しないことが明らかとなった。今回の調査結果より、横軸にビタミンD摂取量、縦軸に血清25(OH)D濃度を取って、血清25(OH)D濃度が20ng/mlに達する摂取量を求めると、わずか数十人の調査から結論めいたことは言えないが、約19 μ gという結果になった。

このことはおそらく欧米における、ビタミンDは不足しやすいビタミンであり、特に高齢者においては多量を要するという考え方が、おそらく日本人にもあてはまることを示唆するものであろう。

脂溶性ビタミンは、体内に蓄積するものとして、安全性に問題があると考えられがちであるが、通常の(活性型でない)ビタミンDを摂取することは、安全性が高いと考えられる。すなわちもしビタミンDが若干過剰となり、血清カルシウム濃度が上昇すると、副甲状腺ホルモン(PTH)が抑制され、それにより腎臓におけるビタミンDの活性化が低下する。すなわち生体のフィードバック機構に守られており、よほどの超大量が一度に体内に入らない限り、ビタミンDは安全性が高いと思われる。近年、アメリカのメルク社により、骨吸収抑制剤である

アレンドロネートとビタミンDの合剤が販売されており、1錠あたりビタミンDを2800IU(70 μ g)含有する錠剤を週1回服用するが、特に高カルシウム血症は起こらない。

屋外に出る機会が少なく、脂溶性ビタミンの吸収が低下している高齢者にあっては、少なくとも1日600IU(15 μ g)あるいはそれ以上のビタミンDを要するものと考えられる。

(3) ビタミンK

今回の調査結果・従来の報告より、ビタミンK欠乏/不足は骨折のリスクとなり、欠乏/不足者に対するビタミンK補充によって骨折が減少することは間違いないと思われる。最近アメリカの権威ある医学雑誌に発表されたメタアナリシスの結果においても、ビタミンK投与によって骨折が抑制できると結論付けられている¹¹⁾。

ただこのことを摂取基準に取り入れるためには、一つ大きな方法論上の問題がある。ビタミンKは骨密度にはそれほど大きな影響を与えない。ビタミンKが不足しても、おそらくそれほど骨密度は低下しないし、ビタミンKを投与してもおそらく、骨密度は増加しない。しかし骨折発生率には影響する。

骨粗鬆症診療においても、以前は骨密度至上の時期もあったが、現在では骨折リスクは骨密度以外の要素(骨質)にも大きく左右され、骨強度=骨密度+骨質とされており、おそらくビタミンKは骨質改善作用を持つ⁸⁾。

したがって今後、ビタミンK不足と骨密

度の関連に関する横断調査や、ビタミンK投与の介入試験を行っても、明らかな結果が出ない可能性が強い。そうすると骨折発生率を指標とした調査が必要ということになるが、そのためにはおそらく少なくとも数千人を数年間経過観察するという調査が必要となるが、経費・人員いずれの面からも容易に行える研究ではない。

薬物療法においては、真のエンドポイント、代替エンドポイントという考え方がしばしば用いられる。例えば高脂血症治療において、本当に知りたいことは、その治療によって心筋梗塞の発生が減少するかどうかであるが、その調査には莫大な時間・費用がかかるとする。その場合、LDLコレステロールを顕著に低下させるとすれば、LDLコレステロールは動脈硬化の重要な危険因子であるから、LDLコレステロール低下によってある程度の評価をすることができる。

さて骨折とビタミンKの関係に戻ると、骨においてビタミンKの作用不足によって、血清ucOC濃度が増加し、血清ucOC濃度高値は骨折の重要な危険因子であることは証明されている。すると血清ucOCを、動脈硬化・心筋梗塞におけるLDLコレステロールのようにとらえて、血清ucOCを上昇させないビタミンK摂取量という考え方ができる。現実的には、こういう方法論しかあれないのではないだろうか。その場合、おそらく現在の65-75 μ gではなく、その数倍のビタミンKを要するものと考えられる。

参考文献

- 1) 折茂肇, 坂田清美 第4回大腿骨頸部骨折全国頻度調査成績: 2002年における新発生患者数の推定と15年間の推移. 日本医事新報 2004; 4180:25-30
- 2) 日本整形外科学会診療ガイドライン委員会・大腿骨頸部/転子部骨折ガイドライン策定委員会・厚生労働省医療技術評価総合研究事業「大腿骨頸部骨折の診療ガイドライン作成」班 大腿骨頸部/転子部骨折診療ガイドライン 南江堂 2005
- 3) Levy C, Lindor KD. Management of osteoporosis, fat-soluble vitamin deficiencies, and hyperlipidemia in primary biliary cirrhosis. Clin Liver Dis. 2003 Nov;7(4):901-10. Review.
- 4) Holick MF: McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. Am J Clin Nutr 1994 60(4):619-30,
- 5) 田中清, 白木正孝 ビタミンDの基準値の国際比較 THE BONE 2004 18(2): 183-189,
- 6) Lips P Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 89-90(1-5):611-4.
- 7) Bonnick SL, Shulman L. Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? Am J Med. 2006 119(4 Suppl 1):S25-31.
- 8) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006年版 ライフサイエンス出版 2006
- 9) Seeman E, Crans GG, Diez-Perez A, Pinette KV, Delmas PD. Anti-vertebral fracture efficacy of raloxifene: a meta-analysis. Osteoporos Int. 2006 17(2):313-6.

- 10) Cranney A, Guyatt G, Griffith L, Wells G, Tugwell P, Rosen C; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev.* 2002 23(4):570-8.
- 11) Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer MJ, Gilbody S, Torgerson DJ. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2006 166(12):1256-61.
- 12) Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas J, Schaefer EJ, Dawson-Hughes B, Kiel DP. 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(5):1201-8.
- 13) Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart 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(3):719-24.
- 14) 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.* 2000 15(3):515-21.
- 15) Sato Y, Kanoko T, Satoh K, Iwamoto J. Menatetrenone and vitamin D2 with calcium supplements prevent nonvertebral fracture in elderly women with Alzheimer's disease. *Bone.* 2005 36(1):61-8.
- 16) 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(2):380-6.

11. 日本人の食事摂取基準の策定を目的とした血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度
定量法の開発と脂溶性ビタミンの潜在性欠乏に関する評価

分担研究者	岡野 登志夫	神戸薬科大学	教授
研究協力者	鎌尾 まや	神戸薬科大学	助手
研究協力者	須原 義智	神戸薬科大学	講師
研究協力者	津川 尚子	神戸薬科大学	講師

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。この方法を用いて、母乳中の脂溶性ビタミン濃度を測定し、乳児における脂溶性ビタミンの摂取量を評価するとともに、日本人の脂溶性ビタミン栄養について調査し潜在性欠乏に関する評価を行った。[平成 16 年度] 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 (25(OH)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。[平成 17 年度] 前年度に確立した LC-APCI/MS/MS による血中ビタミン K 及び 25(OH)D 濃度の測定法を発展させ、血中および母乳中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。一方、成人を対象とした脂溶性ビタミンの潜在性欠乏評価の一環として、骨に対するビタミン K の必要量を評価した。血中ビタミン K 濃度と骨代謝におけるビタミン K 栄養マーカーである非グラ化オステオカルシン (ucOC) 濃度を測定し、ucOC 濃度はビタミン K の不足マーカーとして利用できることを確認するとともに、骨におけるビタミン K 要求性が加齢的に高まることを示唆する結果を得た。また、骨折とビタミン K の関係を解析し、ビタミン K 不足が骨折の危険因子となる可能性を示唆する結果を得た。[平成 18 年度] 乳児の食事摂取基準策定に必要な摂取量を求める目的で、LC-APCI/MS/MS 法により健常授乳婦の母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定するとともに、授乳婦の血漿中脂溶性ビタミン濃度の測定および食事調査を実施した。また、思春期男女を対象にビタミン D およびビタミン K の栄養調査を行い、各々副甲状腺ホルモン (PTH) と非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) をビタミン D および K 栄養の潜在的不足マーカーとしてカットオフ値を評価した。ビタミン D の栄養調査では、血中 25(OH)D 濃度を 20 ng/mL 以上に維持することが望ましいという結論を得た。ビタミン K の栄養調査では、骨の健康を考慮に入れた場合には現在の目安量よりも 1.5 倍程度の摂取量が必要である可能性が示唆された。さらに、「ビタミン摂取量が血液中和尿中のビタミン含量に及ぼす影響～生活習慣一次予防のための生体飽和量を求める研究～」の一環として、脂溶性ビタミンでは摂取量の増加と血中濃度上昇との関係性を評価するとともに、ビタミン D については PTH 濃度を、ビタミン K については ucOC 濃度を不足のマーカーとして両ビタミンが充足する摂取量を評価した。

1. 血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の開発

1-1) LC-APCI/MS/MS 法による血中ビタミン K 濃度定量法の確立¹ (平成 16 年度)

【定量法】

血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質として¹⁸O-ラベル化したビタミン K を含むエタノール溶液ⁱ⁾ 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/MSⁱⁱⁱ⁾ に適用する。別に調製したビタミン K 標準溶液ⁱⁱ⁾ 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) = $A \times 36 / 250$

i) 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-4-¹⁸O、PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O (図 1-1) をそれぞれ 3.2 ng/mL とするようエタノールに溶解する。

ii) 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-4-¹⁸O、PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O を各々 50 ng/mL 含むよう添加して調製する。

iii) HPLC 条件：

カラム : CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 x 250 mm、5 μm、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 1-2 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 1-3 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 1-1 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。

1-2) 蛍光検出 HPLC 法によるヒト血漿中ビタミン K 濃度の定量² (平成 16 年度)

【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、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1-4、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。3,000 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_{VP} (島津製作所社製)

オートインジェクター：SIL-10AD_{VP}
(島津製作所社製)

検出器：RF-10A_{XL} (島津製作所社製)

励起波長：320 nm

検出波長：430 nm

カラム：CAPCEL PAK C₁₈ 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：1.0 mL/min

HPLC条件2 (PK、MK-7、I.S.-C19分析条件)

ポンプ：LC-10AD_{VP} (島津製作所社製)

オートインジェクター：SIL-10AD_{VP}
(島津製作所社製)

検出器：RF-10A_{XL} (島津製作所社製)

励起波長：240 nm

検出波長：430 nm

カラム：CAPCEL PAK C₁₈ UG120

(4.6 x 250 mm、5 μm、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1-2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 1-3)。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 1-4 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 1-5)。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。

1-3) LC-APCI/MS/MS 法による血中

25-Hydroxyvitamin D 濃度定量法の確立³⁾
(平成 16 年度)

本法は、従来の RIA 法で合算定量される 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃)、25-Hydroxyvitamin D₂ (25(OH)D₂)及び 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ (24,25(OH)₂D₃) (図 1-6)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 [²H₆]-25(OH)D₃ (側鎖 26,27 位メチルの水素を重水素化した化合物; 図 1-6) を 2 ng 添加し¹⁾、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 C₁₈ に負荷し、メタノール/水 (7:3, v/v) 15 mL で洗浄後、25(OH)D₂/D₃ 及び 24,25(OH)₂D₃ 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ⁱⁱ⁾ 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。

$$\text{血中濃度 (ng/mL)} = A \times 20/50$$

<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 C₁₈ 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)D₃ (m/z : 401.4/257.0)

25(OH)D₂ (m/z : 413.4/355.4)

24,25(OH)₂D₃ (m/z : 417.4/363.1)

[²H₆]-25(OH)D₃ (m/z: 407.4/263.4)

- i) 内部標準溶液： [²H₆]-25(OH)D₃ 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)
- ii) ビタミン D 代謝物標準溶液：
25(OH)D₂/D₃, 24,25(OH)₂D₃ 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 [²H₆]-25(OH)D₃ を 50 ng/mL 含むよう調製する。

【定量精度の確認】

図 1-7 に示すように、標準液ならびに標準血清において 25(OH)D₂/D₃、24, 25 (OH)₂D₃ 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 1-8 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 1-5 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 1-5）。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)D₃ : 0.9999、25(OH)D₂ : 0.9967, 24,25(OH)₂D₃ : 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、健常ヒト血漿 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 1-9 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 1-6）。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。

1-4) LC-APCI/MS/MS 法による血中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立⁴⁾（平成 17～18 年度）

脂溶性ビタミンの栄養調査を目的として、我々が合成した重水素あるいは重酸素標識化合物を内部標準物質とする血漿中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。本法では、16 年度に開発した LC-APCI/MS/MS 法による 25(OH)D₂、25(OH)D₃、24,25(OH)₂D₃、PK、MK-4、MK-7 の測定法を改良し、さらにレチノール、β-カロテン、α-トコフェロールを一斉同時に定量できる方法として確立した定量法である。また、血中濃度が低いために検出し難かった血中ビタミン D 濃度を正確に測定するため、共役ジエン構造を標的としたラベリング試薬である 4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-diene

(DMEQ-TAD)^{5,6}によりビタミンD類を誘導体化し、LC-APCI/MS/MSでの測定感度を高めた定量法を確立した。

【定量法】

(1) 血漿中脂溶性ビタミンの抽出・測定

ヒト血漿あるいは血清 0.5 mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液ⁱ⁾ 25 μL 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液ⁱⁱ⁾ 25 μL、蒸留水 0.5 mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 3.0 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で5分間遠心分離した。有機層 2.5 mL を褐色試験管にとり、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、50 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

<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 C₁₈ UG120 (4.6 mm i.d.x250 mm、5 μm、資生堂社製)

移動相 : (A) メタノール：水 (90:10, v/v)

(B) アセトニトリル

0-10 min (A) 100 %

10-40 min (B) 0→90 %のグラ

ジエント

40-100 min (A) : (B) =10 :

90

流速 : 1.0 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)

all-trans-retinol (m/z : 269.1/213.4)

β-carotene (m/z : 537.6/177.1)

vitamin D₃ (m/z : 385.3/259.4)

25(OH)D₃ (m/z : 383.3/229.3)

α-tocopherol (m/z : 430.4/165.1)

PK (m/z : 451.5/187.1)

MK-4 (m/z : 445.5/187.3)

MK-7 (m/z : 649.7/187.1)

d₆-all-trans-retinol (m/z : 275.2/192.4)

d₆-β-carotene (m/z : 543.6/180.1)

d₇-vitamin D₃ (m/z : 392.4/266.5)

d₆-25(OH)D₃ (m/z : 389.4/229.1)

d₆-α-tocopherol (m/z : 436.5/171.1)

¹⁸O-PK (m/z : 455.4/191.1)

¹⁸O-MK-4 (m/z : 449.4/191.1)

¹⁸O-MK-7 (m/z : 653.7/191.1)

各脂溶性ビタミンの定量には各脂溶性ビタミン (5、20、100、500、2500、12500、62500 ng/mL) 及びその内部標準物質 (500 ng/mL) を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象脂溶性ビタミン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、以下の計算式より濃度を算出した。

血漿(血清)中脂溶性ビタミン濃度(ng/mL)
=RS/V

R: 検量線より得られた内部標準物質に対する測定対象脂溶性ビタミンの濃度比

S: 内部標準物質の添加量 (25 ng)

V : 血漿 (血清) 量 (0.5 mL)

i) d_6 -all-trans-retinol (図 1-10) エタノール溶液 : 用時、 d_6 -all-trans-retinol acetate をアルカリけん化して調製した。ヘキササン : 酢酸エチル (9 : 1) 抽出液より得られた残渣を 2-プロパノールに溶解し、325 nm の吸光度 ($A_{325 \text{ nm}}$) を測定した。以下の式に基づき d_6 -all-trans-retinol 濃度を計算し、1 $\mu\text{g/mL}$ のエタノール溶液を調製した。また、蛍光検出 HPLC により純度検定をおこなった。

d_6 -all-trans-retinol 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{325 \text{ nm}} \times 549/100$

ii) その他の内部標準物質を含むエタノール溶液 : d_6 - β -carotene、 d_7 -vitamin D_3 、 d_6 -25(OH) D_3 、 d_6 - α -tocopherol、 ^{18}O -PK、 ^{18}O -MK-4 及び ^{18}O -MK-7 (図 1-10) をそれぞれ 1 $\mu\text{g/mL}$ となるようエタノールに溶解した。

(2) DMEQ-TAD による誘導体化による血漿中ビタミン D 類の抽出・測定

ヒト血漿 200 μL をポリプロピレン製チューブにとり、ビタミン D 内部標準物質エタノール溶液¹⁾ 50 μL およびアセトニトリル 1.0 mL を加えて転倒混和後、10 分間室温で放置した。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を試験管に分取した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣を酢酸エチル 1.2 mL に溶解し、蒸留水 0.6 mL を加えてボルテックスミキサーで攪拌した。3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層を褐色試験管に分取した。残った水層に酢酸エチル 0.6 mL を加えて再度抽出し、

得られた酢酸エチル層を先の褐色試験管にあわせた。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで乾固した後、0.4 %

DMEQ-TAD 酢酸エチル溶液 75 μL を加え、30 分間室温にて放置した。再度、0.4 %

DMEQ-TAD 酢酸エチル溶液 75 μL を加えて、室温で 60 分間放置した後、エタノール 0.75 mL を加えて過剰な試薬を分解した。ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をアセトニトリル 80 μL に溶解し、30 μL を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

なお、測定対象は vitamin D_3 (D_3)、vitamin D_2 (D_2)、25-hydroxyvitamin D_3 [25(OH) D_3]、25-hydroxyvitamin D_2 [25(OH) D_2] 及び 24,25-dihydroxyvitamin D_3 [24,25(OH) $_2D_3$] とした。

<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_{18} UG120
(4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm , 資生堂社製)

移動相 : (A) アセトニトリル
(B) 水
0-5 min (A) : (B) = 30 : 70
5-35 min (A) 30 \rightarrow 95 % のグラ

ジエント

流速 : 1.0 mL/min.

温度 : 35 $^{\circ}\text{C}$

<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)

DMEQ-TAD- D_3 (m/z : 730.5/468.3)

DMEQ-TAD-D₂ (m/z : 742.6/468.3)

DMEQ-TAD-25(OH)D₃ (m/z :
746.5/468.1)

DMEQ-TAD-25(OH)D₂ (m/z :
758.5/468.2)

DMEQ-TAD-24,25(OH)₂D₃ (m/z :
752.5/468.0)

DMEQ-TAD-d₇-D₃ (m/z : 737.6/468.2)

DMEQ-TAD-d₆-25(OH)D₃ (m/z :
752.5/468.1)

定量計算には、試料と同様に誘導体化した測定対象ビタミンDの標準物質(2.5、10、50 ng/mL)及びその内部標準物質(50 ng/mL)を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象ビタミンD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、以下の計算式より濃度を算出した。

血漿中脂溶性ビタミン濃度(ng/mL)

=RS/V

R : 検量線より得られた内部標準物質に対する測定対象ビタミンDの濃度比

S : 内部標準物質の添加量 (10 ng)

V : 血漿量 (0.2 mL)

i) ビタミンD内部標準物質エタノール溶液 : d₇-vitamin D₃及びd₆-25(OH)D₃をそれぞれ0.2 µg/mLとなるようエタノールに溶解した。

【定量精度の確認】

(1) 血漿中脂溶性ビタミンの一斉測定法

図1-11に示すように、標準物質混合溶液ならびに血漿試料において、全ての測定対象脂溶性ビタミンは単一ピークとして検出され、一斉定量が可能であることが確認さ

れた。標準溶液に対して作成した検量線は、全ての測定対象脂溶性ビタミンにおいて、0.25 から 3125 ng の範囲で直線性を示した。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、十分な感度が得られた(表1-7)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿に all-trans-retinol 250 ng、β-carotene 150 ng、D₃ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、α-tocopherol 6.5 µg、PK 0.75 ng、MK-4 1 ng、MK-7 4 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表1-7に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度であると判断した。プール血漿を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、vitamin D₃を除いて変動係数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1-8)。プール血漿のD₃測定値の日差変動が大きくなった理由として、血漿中D₃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、プール血漿の各脂溶性ビタミン濃度を本法及び従来法(蛍光検出HPLC法、可視検出HPLC法、化学発光法)で測定し、得られた値を比較した。その結果、表1-9に示すように、本法及び従来法の定量結果はよく一致した。従って、本法は真度、精度及び特異性に優れ、且つ各脂溶性ビタミン濃度を一斉定量できる方法であるといえる。

(2) DMEQ-TADによる誘導体化による血漿中ビタミンD類の測定

図1-12に示すように、標準溶液ならびに血漿試料において、全てのビタミンD類が

ら DMEQ-TAD 誘導体化により生成した 6R および 6S 体のピークが検出された。6R および 6S 体の生成比は約 1:3 であったため、定量計算には主生成物である 6S 体のピーク面積を用いることとした。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、2-6 pg と極めて高感度であり、誘導体化により約 40 倍の高感度化が達成できた (表 1-10)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿 0.2 mL に D₃ 2 ng、D₂ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、25(OH)D₂ 10 ng 及び 24,25(OH)₂D₃ 2 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-10 に示すように 92-109 % の良好な回収率が得られた。従って、本法による脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。プール血漿を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、D₂ の日差再現性を除いて変動係数 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 1-10)。D₂ 測定値の日差変動が大きくなった理由として、プール血漿中 D₂ 濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

血漿試料と同様に、母乳試料についても真度・精度を検討した。プール母乳 10 mL に D₃、D₂、25(OH)D₃ 10 ng 及び 25(OH)D₂ 10 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-11 に示すように 90-105 % の良好な回収率が得られた。また、日内再現性の変動係数は 4-12 % と概ね良好な結果が得られた。

従って、本法は血漿および母乳試料中のビタミン D を極めて高感度に測定でき、且つ真度及び精度に優れた方法であるといえ

る。

1-5) LC-APCI/MS/MS 法による母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立⁴ (平成 17 ~ 18 年度)

【定量法】

母乳試料は解凍後、超音波処理をおこない均質化した。続いて、ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンはアルカリけん化法で、アルカリに不安定なビタミン K はリパーゼ消化法で抽出した。

(1) 母乳中脂溶性ビタミンの抽出・測定 (アルカリけん化法：ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンに適用可能)

母乳 20.0 mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液 100 μL 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液 100 μL、1% 塩化ナトリウム溶液 12 mL、7% ピロガロール・エタノール溶液 (w/v) 40 mL、60% 水酸化カリウム溶液 20 mL を加え、70°C で 60 分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、1% 塩化ナトリウム溶液 76 mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60 mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60 mL を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで

乾固した。残渣をヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）3 mL に溶解し、褐色試験管に移した後、再びロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をエタノール 100 μ L に溶解し、50 μ L を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

(2) ビタミン K の抽出（リパーゼ消化法）

母乳 3.0 mL を褐色のスクリュウコック付遠沈管にとり、内部標準物質を含むエタノール溶液 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.7）12 mL、リパーゼ（ブタすい臓製、ナカライテスク社製）0.3 g を加え、混合した後、37 $^{\circ}$ C で 90 分間攪拌した。エタノール 12 mL を加えた後、超音波処理をおこない、ヘキサン 12 mL を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 10 mL を褐色ナス型フラスコに移した。残った水層にヘキサン 12 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 12 mL をナス型フラスコにあわせた。ヘキサン層をロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をヘキサン 3 mL に溶解し、あらかじめヘキサン 10 mL で洗浄した Sep-Pak Silica カートリッジ（Waters 社製）に負荷した。ヘキサン：ジエチルエーテル（97：3, v/v）5.0 mL により溶出させたビタミン K 画分を、ロータリーエバポレーターで乾固した。得られた残渣をエタノール 200 μ L に溶解し、50 μ L を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

【定量精度の確認】

7 名の健常授乳婦より提供された母乳を

混合して調製したプール母乳を用いて、添加回収率及び同時再現性を検討した。

プール母乳 20 mL に all-trans-retinol 20 μ g、 β -carotene 0.6 μ g、vitamin D₃ 20 ng、25(OH)D₃ 20 ng、 α -tocopherol 30 μ g、PK 30 ng、MK-4 20 ng、MK-7 10 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-12 に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。また、同時再現性試験における変動係数は 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。

(3) 母乳中ビタミン D 類の高感度測定法（アルカリけん化法：ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの一斉分析法）

(1)の方法をさらに発展させ、低濃度で検出しにくい母乳中ビタミン D 濃度測定を DMEQ-TAD 誘導体化により高感度化した。

解凍後、超音波処理により均質化した母乳 10.0 mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として d₆-all-trans-retinol エタノール溶液ⁱⁱ⁾ 50 μ L 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質エタノール溶液ⁱⁱⁱ⁾ 50 μ L、1%塩化ナトリウム溶液 6 mL、7%ピロガロール・エタノール溶液（w/v）20 mL、60%水酸化カリウム溶液 10 mL を加え、70 $^{\circ}$ C で 60 分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、1%塩化ナトリウム溶液 38 mL、ヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）30 mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）30 mL

を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をヘキサン：酢酸エチル（9：1, v/v）2.5 mL に溶解し、このうち 1.0 mL をビタミン A、E 類測定用、1.5 mL をビタミン D 類測定用とした。ビタミン D 類測定用の溶液は、ロータリーエバポレーターで乾固した後、以下の条件の HPLC にて精製した。

＜精製用 HPLC 条件＞

ポンプ : Waters 600 (Waters 社製)
検出器 : Waters 996 (Waters 社製)
カラム : Zorbax SIL
(4.6 mm i.d. × 250 mm, Agilent 社製)
移動相 : ヘキサン：2-プロパノール：
メタノール
(88:10:2, v/v/v)
流速 : 1.0 mL/min.
温度 : 室温
分取画分 : D 画分 3.5-5.0 min
25(OH)D 画分 5.0-8.0 min

分取した D および 25(OH)D 画分をロータリーエバポレーターで乾固した後、血漿試料と同様に DMEQ-TAD 誘導体化をおこない、LC-APCI/MS/MS にて測定した。ただし、0.4 % DMEQ-TAD 溶液及びエタノール添加量は倍量とし、測定対象は D₃、D₂、25(OH)D₃ 及び 25(OH)D₂ とした。

ii) d₆-all-trans-retinol エタノール溶液：用時、d₆-all-trans-retinol acetate をアルカリけん化して調製した。ヘキサン：酢酸エチル（9：

1) 抽出液より得られた残渣を 2-プロパノールに溶解し、325 nm の吸光度 (A_{325 nm}) を測定した。以下の式に基づき

d₆-all-trans-retinol 濃度を計算し、1 µg/mL のエタノール溶液を調製した。また、蛍光検出 HPLC により純度検定をおこなった。

d₆-all-trans-retinol 濃度 (µg/mL) = A_{325 nm} × 549/100

iii) その他の内部標準物質エタノール溶液：

d₆-β-carotene、d₇-D₃、d₆-25(OH)D₃、

d₆-α-tocopherol、[¹⁸O]-phyloquinone (PK)、

[¹⁸O]-menaquinone-4 (MK-4) 及び

[¹⁸O]-menaquinone-7 (MK-7) をそれぞれ 1

µg/mL となるようエタノールに溶解した。

【結果・考察】

図 1-13 に示すように、標準溶液ならびに血漿試料において、全てのビタミン D 類から DMEQ-TAD 誘導体化により生成した 6R および 6S 体のピークが検出された。6R および 6S 体の生成比は約 1:3 であったため、定量計算には主生成物である 6S 体のピーク面積を用いることとした。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、2-6 pg と極めて高感度であり、誘導体化により約 40 倍の高感度化が達成できた (表 1-13)。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿 0.2 mL に D₃ 2 ng、D₂ 2 ng、25(OH)D₃ 10 ng、25(OH)D₂ 10 ng 及び 24,25(OH)₂D₃ 2 ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 1-13 に示すように 92-109 % の良好な回収率が得られた。従って、本法による脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。プール血漿