

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^{a)}

【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 ¹⁸O-ラベル化したビタミン K を含むエタノール溶液¹⁾ 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/MS³⁾ に適用する。別に調製したビタミン K 標準溶液²⁾ 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) = $A \times 36 / 250$

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-4-¹⁸O, PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O (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-4-¹⁸O, PK-¹⁸O および MK-7-¹⁸O 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 C₁₈ 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ブール血清 (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^{b)}

【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_{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, 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_{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, 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, 十分な感度を得られた.

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を得られた. 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康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, 健康人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⁹⁾

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²⁾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 C₁₈ UG120 (4.6 × 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)

1) 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)

2) 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 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-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 D₂, vitamin D₃), 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

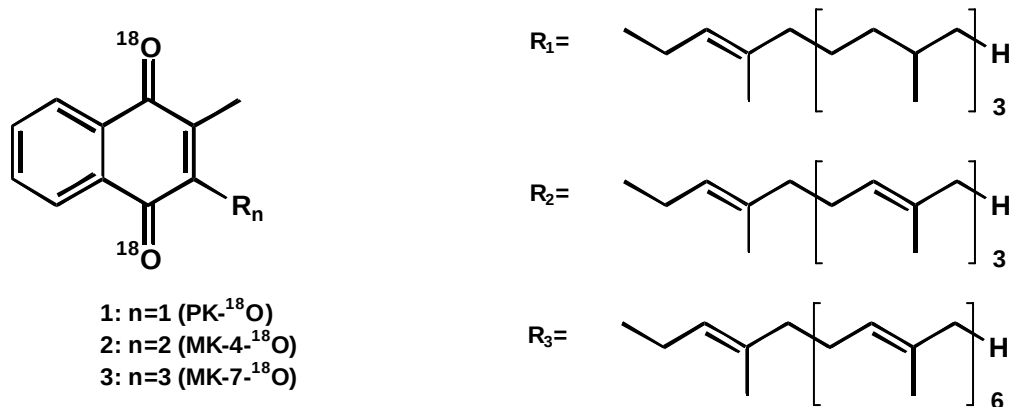
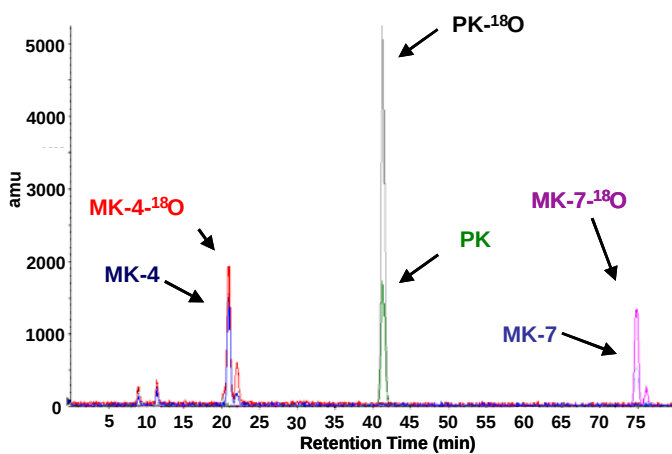


図 1 内部標準物質 (MK-4-¹⁸O, PK-¹⁸O, MK-7-¹⁸O) の化学構造

(i) Standards and their internal standards



(ii) Human plasma sample with internal standards

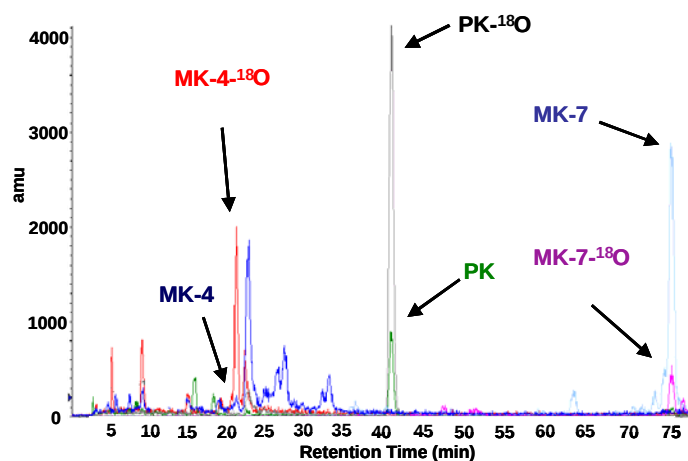


図 2 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム

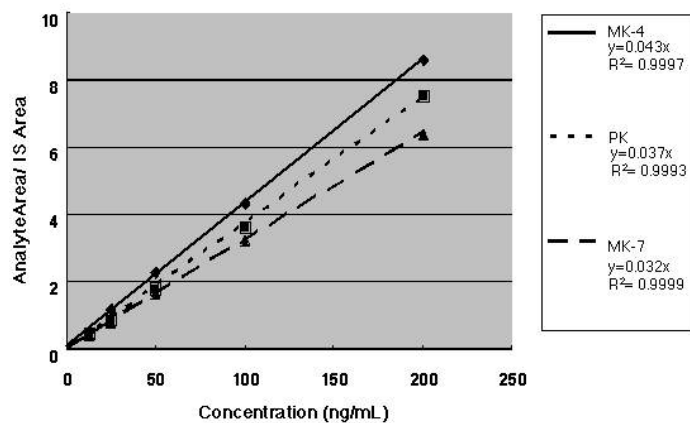


Figure S-1. Calibration Curves for Vitamin K Homologues

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

ビタミン K₁(フィロキノ, PK)

ビタミン K₂(メナキノ, MK)

I.S.-C₁₆

I.S.-C₁₉

表 3 日内変動および日差変動

		PK	MK-4	MK-7
日内変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.145±0.014	0.179±0.014	0.067±0.013
	変動係数 (%)	9.6	7.5	19.3
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.270±0.084	0.353±0.021	0.693±0.061
	変動係数 (%)	6.6	6.0	8.8
日差変動 (n=10)				
コントロール血清	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.152±0.008	0.191±0.011	0.076±0.011
	変動係数 (%)	5.3	5.7	13.9
健常人血漿	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.193±0.058	0.332±0.031	0.598±0.038
	変動係数 (%)	4.9	9.2	6.3

表 4 健常人および MK-4 を投薬されている骨粗鬆症患者の血漿中ビタミン K 濃度

		PK	MK-4	MK-7
健常人 (n=20)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	1.814±1.107	0.149±0.172	16.27±20.58
LC-APCI/MS 法	平均±標準誤差 (ng/mL)	2.163±1.340	0.392±0.457	17.53±22.55
骨粗鬆症患者 (n=10)				
蛍光検出法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.621±0.245	46.83±46.41	4.179±6.281
LC-APCI/MS 法	平均±標準誤差 (ng/mL)	0.850±0.272	51.89±44.88	4.128±6.373

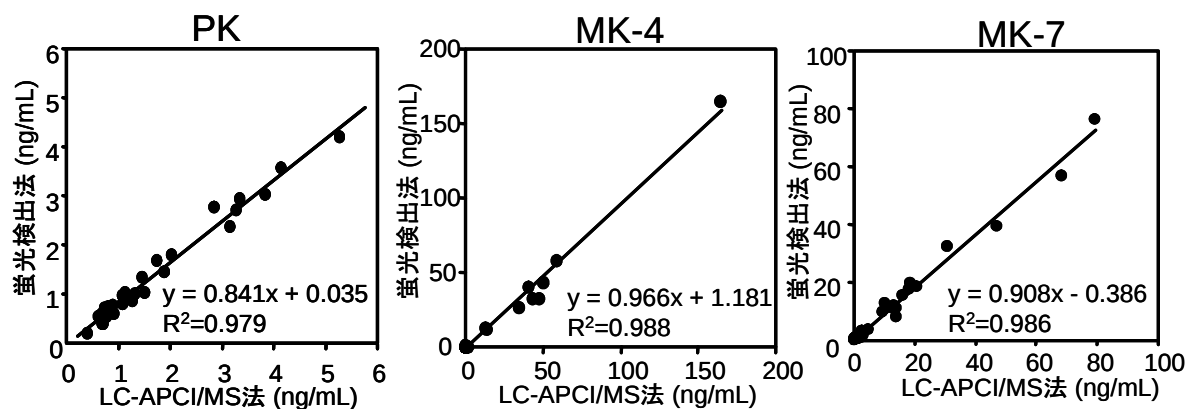


図5 蛍光検出法と LC-APCI/MS 法の相関

3. LC-APCI/MS/MS 法による血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度定量法の確立

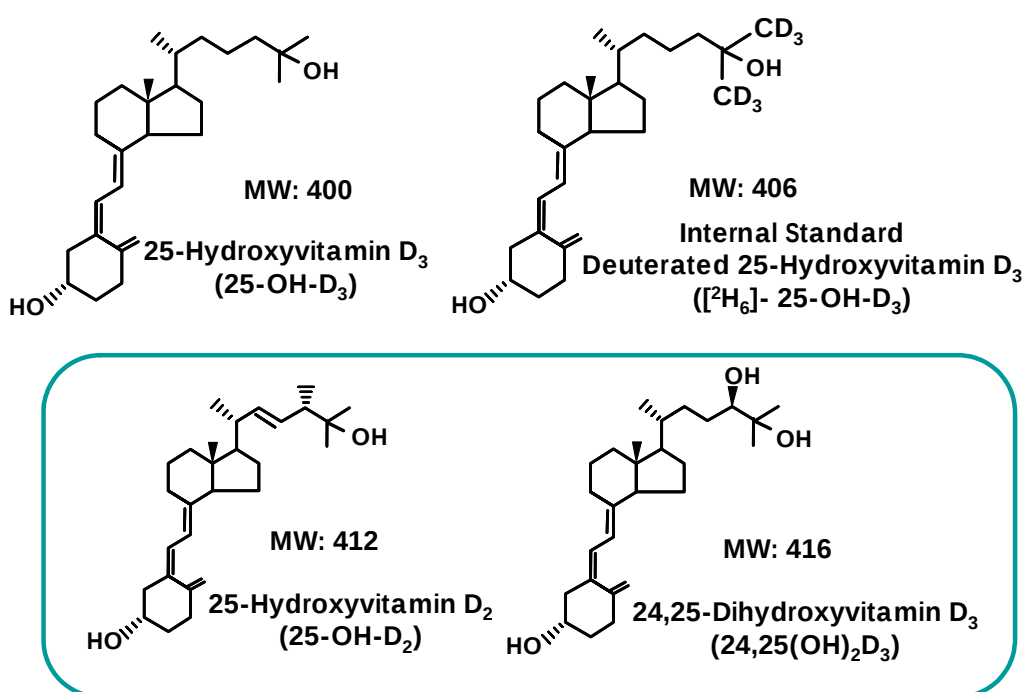


図6 25-OH-D₂/D₃, 24, 25 (OH)₂D₃ 及び [²H₆]-25-OH-D₃ の化学構造

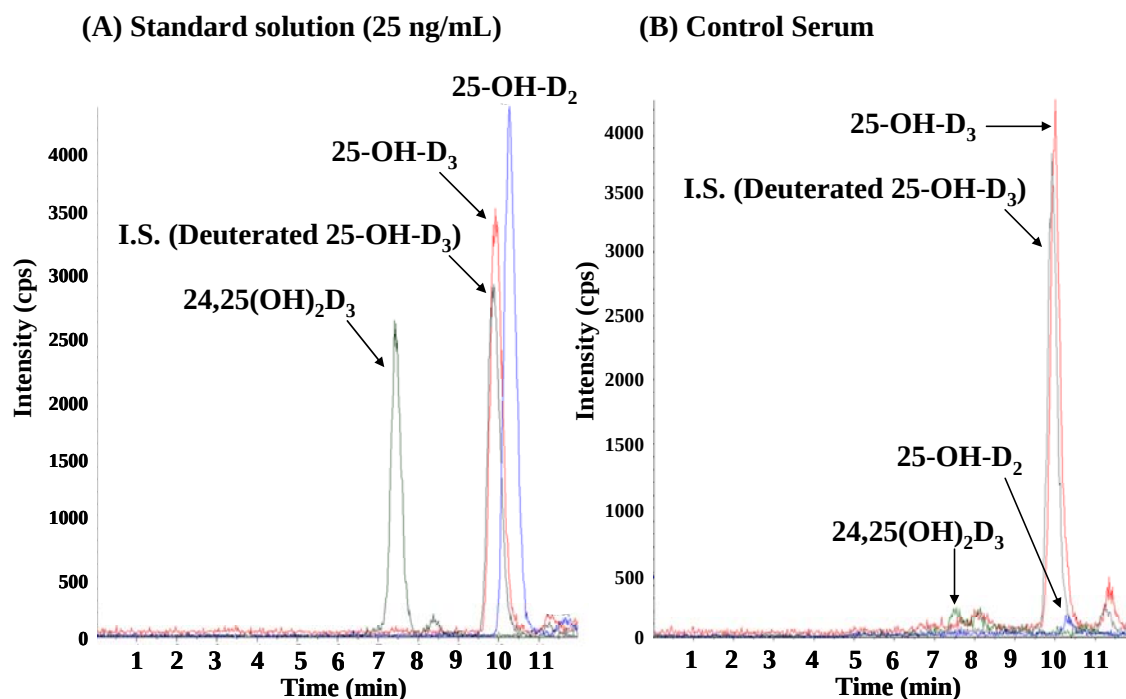
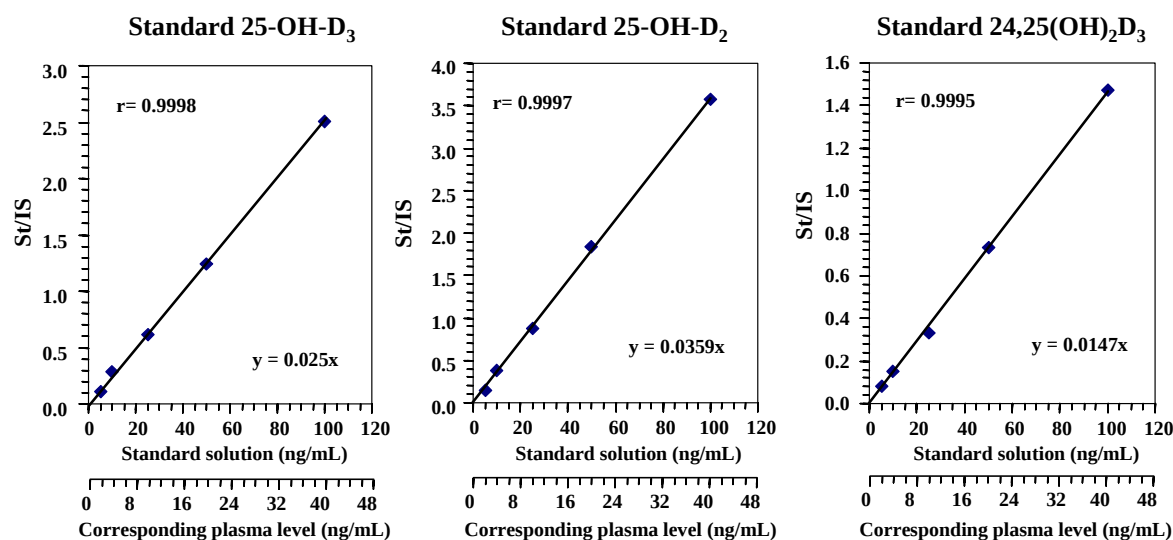


図 7 LC-APCI/MS/MS 分析におけるクロマトグラム



Calibration curves for 25-OH-D₃, 25-OH-D₂ and 24,25(OH)₂D₃.

Deuterated 25-OH-D₃ was used as internal standard for three vitamin D metabolites. All values were calculated as ratios St (intensity of standard are) / IS (intensity of internal standard area). The measured data of samples were converted to the concentration in 1 ml of plasma according to the following equation: plasma concentration (ng/mL) = measured data x (20/50).

図 8 ビタミン D 代謝物の標準検量線

表 5 標準血清を用いたビタミン D 代謝物濃度の精度評価

Metabolites	Mean±SD	RSD %
25-OH-D₃		
Intra assay (n=10)	20.0 ± 1.1 ng /mL	5.7
Inter assay (n=5)	18.6 ± 0.5 ng/mL	2.5
Recovery (n=5)	103.8 ± 4.3 (%)	4.1
25-OH-D₂		
Intra assay (n=10)	2.5 ± 0.1 ng /mL	4.5
Inter assay (n=5)	2.7 ± 0.1 ng/mL	5.1
Recovery (n=5)	99.3 ± 2.2 (%)	2.2
24,25(OH)₂D₃		
Intra assay (n=10)	2.8 ± 0.3 ng /mL	11.4
Inter assay (n=5)	2.5 ± 0.3 ng/mL	9.9
Recovery (n=5)	98.8 ± 5.1 (%)	5.2

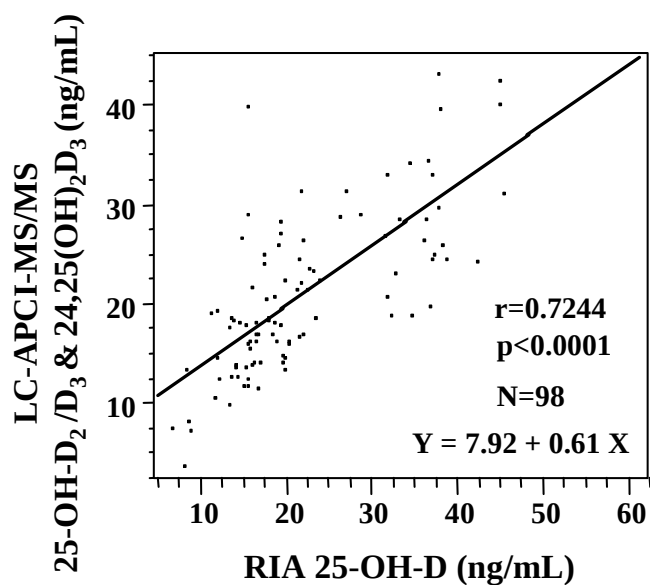


図 9 LC-APCI/MS/MS 法と RIA 法による 25-OH-D 濃度測定値の比較

表 6 25-OH-D 濃度と血中 PTH 濃度との相関

	Whole PTH		Total intact PTH	
	r	p value	r	p value
LC-APCI MS/MS				
25-OH-D ₃	- 0.2078	0.0401*	- 0.2323	0.0213 *
25-OH-D ₂ /D ₃	- 0.2294	0.0231 *	- 0.2489	0.0135 *
25-OH-D ₂ /D ₃ & 24,25(OH) ₂ D ₃	- 0.2273	0.0244 *	- 0.2461	0.0146 *
RIA 25-OH-D	- 0.0817	0.4240	- 0.0587	0.5660

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

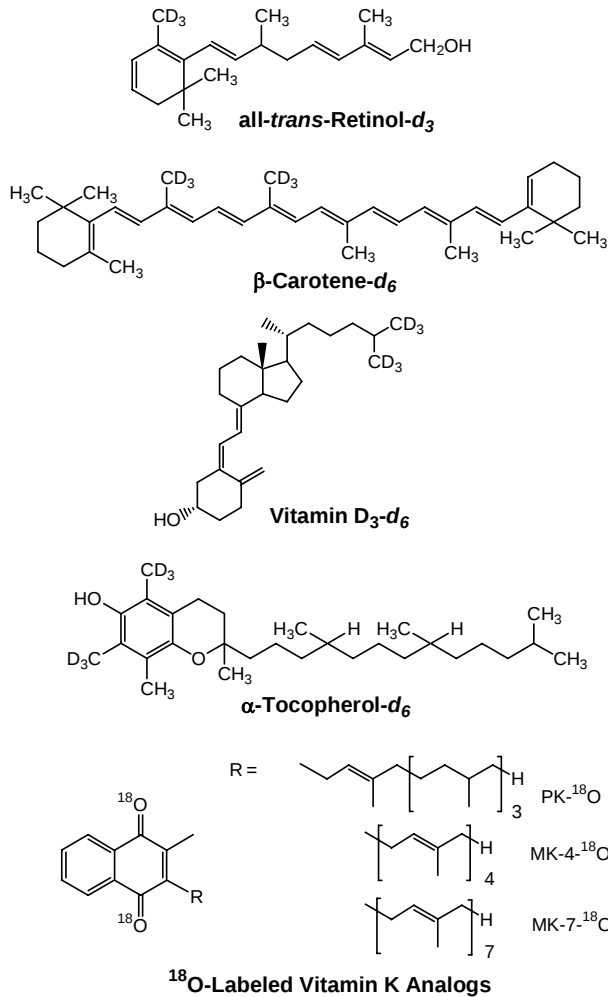


図 10 内部標準物質として合成した安定同位体ラベル化合物