

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	石 嶺 南 生
論文審査担当者	主 査      内 藤 隆 文 副 査      田 中 直 樹 ・ 上 原 剛 ・ 井 上 克 枝
<p>論文題目</p> <p style="text-align: center;">Development of Free 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> Assay Method Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による遊離型 25-ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> 測定法の構築)</p> <p>【背景】ビタミン D (VD) 代謝物は骨の健康だけでなく、癌や自己免疫疾患をはじめとする様々な疾患のバイオマーカーとして広く測定されている。VD の自然形であるビタミン VD<sub>3</sub> は紫外線照射によって皮膚で産生されるが、一部魚などの食物から摂取される。また、植物からはわずかに分子構造の異なる VD<sub>2</sub> が摂取されるが、その血漿中濃度は VD<sub>3</sub> に比べて極めて低い。VD<sub>3</sub> と VD<sub>2</sub> は肝臓で代謝されて 25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D<sub>3</sub> と 25(OH)D<sub>2</sub>) に変換される。体内循環では VD とその代謝物は VD 結合蛋白 (DBP) に 85-90%、アルブミンに 10-15%が結合しており、0.03%未満が遊離型として存在している。25(OH)D は DBP との結合親和性が最も高く、血漿の濃度が相対的に高いことから臨床検査における測定対象とされている。近年、遊離型の 25(OH)D が VD 欠乏状態や病態をより反映するという仮説が提唱されたが、これを立証するためには正確で精密な測定法が必要である。本研究では遊離型のほとんどを占める遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の測定系の構築とその基礎性能、臨床的有用性について検討した (信州大学医学部倫理委員会承認番号 4928)。</p> <p>【方法】液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 装置を用いた総 25(OH)D<sub>3</sub>、遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の測定は、ビタミン D 代謝物定量測定キット JeoQuant™ 試薬 (日本電子株式会社) を用いた。総 25(OH)D<sub>3</sub> の測定は JeoQuant™ 試薬の基本的操作手順に従って実施した。遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の測定は第一段階として血清の限外濾過 (アミコンウルトラ-2 30K) により総 25(OH)D<sub>3</sub> から遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> を分離後、濾液の 25(OH)D<sub>3</sub> を測定し遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> 測定値とした。慢性腎不全患者、肝硬変患者、妊婦、健常者 (各 15 名) の総 25(OH)D<sub>3</sub>、遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度を測定した。一部の検体については、DBP およびアルブミンを測定し、計算式による遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度を算出した。また、遊離型 25(OH)D 測定用の ELISA キット (DIAsource 社) を用いて限外濾過液の測定等を実施し、LC-MS/MS 法による遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> 測定法との相違について検討した。</p> <p>【結果】測定系の基礎性能は、併行精度(変動係数 3.8-4.5%)、室内精度(変動係数 4.8-5.9%)、直線性(80 pg/mL)、定量限界(0.97 pg/mL)、添加回収試験(84.5-92.4%)、マトリクス効果(94.5-104.9%)のいずれも良好であった。慢性腎不全患者、肝硬変患者、妊婦 (各 15 名) の総 25(OH)D<sub>3</sub> は健常者と比較してどのグループも有意差が認められなかった。一方、遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> は慢性腎不全患者、肝硬変患者で健常者と比較して有意に低下していた。全検体の総 25(OH)D<sub>3</sub> と遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> には比較的強い相関関係 (r = 0.738) が認められたが、グループ毎で線形回帰式の傾きは異なっていた。計算式で算出した遊離型 25(OH)D と実測総 25(OH)D<sub>3</sub> および実測遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の相関係数はそれぞれ r = 0.621、r = 0.423 であった。LC-MS/MS 法(遊離型 25(OH)D<sub>3</sub>) で 16.71 pg/mL であった限外濾過液を市販 ELISA キット (遊離型 25(OH)D 濃度) で測定したところ、0.46 pg/mL と大きく乖離した。JeoQuant™ 試薬付属の校正物質を 10、20 pg/mL に希釈したものを ELISA で測定するとそれぞれ 0.39、0.43 pg/mL となり、同様の乖離が認められた。</p> <p>【考察】LC-MS/MS 法による遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の測定精度等の基本性能は満足できるものであった。また、疾患等の個体の状態によって総 25(OH)D<sub>3</sub> と遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> は異なる動態を示すことが示唆された。しかし、ELISA 法を用いて遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> を測定した既報とは必ずしも同様な結果にはならなかった。</p>	

要因として LC-MS/MS 法と ELISA 法の乖離が考えられた。ELISA 法は簡便であるが、抗体の特異性、希釈測定による遊離型と結合型の平衡の変動、低希釈倍率によるバックグラウンドの上昇等の課題があることは否定できない。

**【結論】** LC-MS/MS 法による遊離型 25(OH)D<sub>3</sub> の基本性能は満足できるものであり、ELISA 法やその他の免疫アッセイなどの測定系の評価・開発に有用である。