

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06096

研究課題名(和文) 血清ビタミンD代謝動態評価の為にLC-MS/MSによる高精度分析法の構築

研究課題名(英文) Development of LC-MS/MS-based accurate quantification methods for assessing serum vitamin D metabolites

研究代表者

石毛 崇之 (ISHIGE, Takayuki)

千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：30757315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSにおけるイオン化効率の増強のためにビタミンD代謝物をDAPTADで誘導体化した。イオン強度は、25(OH)D3-DAPTADでは25(OH)D3に比べて約100倍程度上昇した。検体前処理にSLEを使用することにより、4つの血清ビタミンD代謝物[25(OH)D3、3-epi-25(OH)D3、25(OH)D2、24,25(OH)2D3]を高感度かつ安定して分析することができた。今後は、血清1,25(OH)2Dの分析法の構築も行なっていく。

研究成果の概要(英文)：DAPTAD derivatization of vitamin D metabolites were performed for enhancing the ionization efficiency of LC-MS/MS. As compared with 25(OH)D3, the intensity of 25(OH)D3-DAPTAD was increased approximately 100-fold higher. By using SLE for sample preparation, the high-sensitive and robust method for quantification of 4 serum vitamin D metabolites was established. We are planning to establish serum 1,25(OH)2D analysis method by LC/MS/MS.

研究分野：病態検査学

キーワード：ビタミンD代謝物 LC-MS/MS 誘導体化

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の偏りや日光浴の減少などを背景とした乳幼児や成人のビタミンD不足が問題となっている。一方、ビタミンDはホルモンとして多様な作用を持ち、その不足は乳幼児の骨疾患だけでなく、成人の免疫性疾患、悪性腫瘍などのリスクとも関連することが注目され、特に欧米では関連サプリメントが多用されている。ビタミンD代謝物は分子構造によってその生物学的活性が大きく異なるため、ビタミンD代謝動態を把握する上で、それぞれの代謝物の精確な定量は必須である。これまで、25(OH)Dや1,25(OH)2Dの血中濃度分析には抗体を用いた免疫学的測定法(主に radioimmunoassay; RIA)が用いられてきた。この方法の問題点として、交差反応による測定対象以外のビタミンD代謝物の測り込みがある、放射性廃棄物が出る、ランニングコストが高い、検体量を多く必要とする、ということが挙げられる。近年ではこれらの問題を解決すべく、感度・特異度に優れた LC-MS/MS を用いた分析が盛んに行われている。しかしながら、ビタミンDはその構造上イオン化し難く、特に血中濃度の低い 1,25(OH)2D は定量に十分な感度が出ず、LC-MS/MS の中でも最も分析が難しいもののひとつと言われている。また、分析技術の進歩と共に近年では新たなビタミンD代謝物が発見されており、例えば 25(OH)D3 の 3 位水酸基の光学異性体である 3-epi-25(OH)D3 が報告された。これは 25(OH)D3 と異なり生物活性が無いため、測り分けが必要であるが、免疫学的測定法では弁別できない可能性がある。したがって、ビタミンD代謝および生物学的活性の包括的な理解の為に、ビタミンD代謝物の精密定量法が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

ビタミンDは骨代謝や免疫調節に関連した様々な作用を持ち、その不足は乳幼児の骨疾患だけでなく、成人の免疫性疾患、悪性腫瘍などのリスクとも関連するため、代謝物を含めた精確な定量が必要である。ビタミンD代謝物は分子構造によってその生物学的活性が大きく異なり、代謝動態の正確な評価には精密定量法の構築が不可欠である。従来の免疫学的測定法では微小構造差の弁別は難しい。本研究ではビタミンD代謝物の精確な定量の為に、LC-MS/MSを用いた高精度ビタミンD代謝物分析法を構築することを目的とする。前述の通り、ビタミンDはその構造上イオン化し難いため、Diels-Alder 反応により Cookson 型試薬と共有結合させることにより、イオン化効率が上昇し感度の増大が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分析法の構築

##### 質量分析計の最適化

三連四重極質量分析計 (TSQ vantage) の最

適化を行う。イオン化法には汎用性の高い ESI positive ion モードを用いる。まず、精製物質を用いてビタミンD代謝物の誘導体化による質量の変化を確認する。誘導体化に用いる Cookson 型試薬は東京理科大学の東達也教授・小川祥二郎助教らによって開発された、4-(4'-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD)を使用する。定量分析には選択反応モニタリング (SRM) モードを使用する為、MS/MS スペクトルを分析し、最適な SRM トランジションを選択する。さらに、SRM の感度を最大限に引き出す為、ESI および開裂エネルギーの最適化を行う。

#### HPLC の最適化

HPLC (Nanospace SI-2) による分離条件の最適化を行う。精確な定量の為に HPLC の分離は重要であり、構造が非常に類似しているビタミンD代謝物がしっかりと分離する条件を探索する。移動相にはアセトニトリル/0.1% 蟻酸と水/0.1% 蟻酸を使用し、カラムには汎用性の高い C18 coreshell column を用いる。特に構造の類似している 25(OH)D3 と 3-epi-25(OH)D3 の分離が重要であり、さらに、検体処理能力を上げる為、5分/1分析で行えるよう、さらにカラム長やグラジエントの検討を行っていく。

#### 前処理の選択および最適化

LC-MS/MS を用いた血中薬物濃度分析や微量ペプチド分析で使用報告のある supported liquid extraction (SLE) および immunoextraction を用いる。血清 25(OH)D3、-D2、3-epi-25(OH)D3、24,25(OH)2D3 分析の前処理法には簡便かつ効率的な方法(所要時間、約 30 分)として SLE を選択し、その抽出条件の最適化を行う。一方、1,25(OH)2D の血清濃度は 25(OH)D のおよそ 1000 分の 1 であり、分析にはさらに高い感度が要求されるため、抗体を用いた immunoextraction (抗体反応、1 時間)により 1,25(OH)2D を特異的に抽出する。Immunoextraction では 1,25(OH)2D 以外の代謝物が交差反応する可能性があるが、LC-MS/MS の選択性によりそれぞれを弁別することができるので交差反応性は問題にならない。

#### (2) 基礎性能評価

同時再現性および日差再現性を N=20 で求め、分析法の安定性を、さらに米国の NIST が認証する標準物質 (SRM972a) を分析し、測定系の正確さを検証する。最小定量感度および検出感度を求める為に、段階希釈試料を用いた希釈試験を行う。再現性はいずれも CV<10%、SRM972a の実測値と理論値のズレが 5%未満、最小定量感度は 25(OH)D, <1 ng/mL; 24,25(OH)2D3, <0.5 ng/mL; 1,25(OH)2D, <10 pg/mL を目標とする。検体種(血清、EDTA 血漿、ヘパリン血漿)による分析安定性の検討も行なっていく。

#### 4. 研究成果

##### (1) 分析法の構築

質量分析、HPLC、検体前処理法の最適化を行った。Cookson 型試薬によりビタミン D 代謝物を誘導体化することで、イオン化効率が上昇することを確認した。2 種類の Cookson 型試薬 (PTAD および DAPTAD) を検討し、25(OH)D に比べて 25(OH)D-PTAD では約 10 倍、25(OH)D-DAPTAD では約 100 倍のイオン強度の上昇がみられた (図 1)。また、HPLC では C18 コアシェルカラムを使用することにより、25(OH)D3 と 3-epi-25(OH)D3 の分別定量が可能になった。検体前処理法については、まず、血清 25(OH)D3、-D2、3-epi-25(OH)D3、24,25(OH)2D3 分析の前処理のために SLE の抽出条件の最適化を行った。血清 20  $\mu$ L を 30% 2-propanol 280  $\mu$ L で希釈し、SLE に添加し、酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 溶液で溶出することにより、回収率が良く安定して分析できる結果であった。

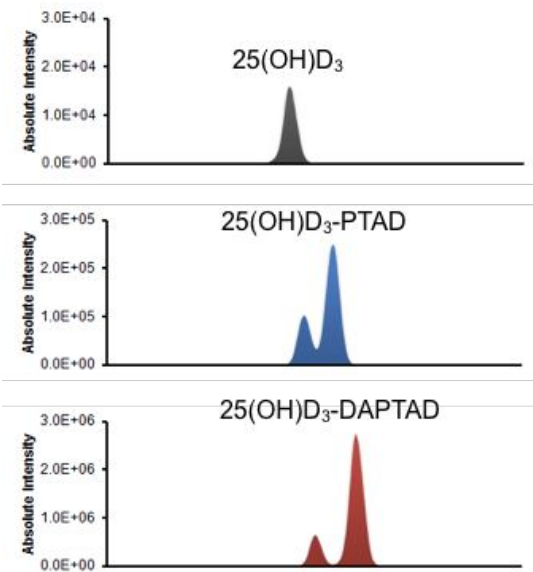


図 1. 誘導体化によるイオン強度の上昇

##### (2) 基礎性能評価

血清 25(OH)D3、3-epi-25(OH)D3、25(OH)D2、24,25(OH)2D3 の同時分析 (図 2) の基礎性能評価を行なった。同時再現性はそれぞれ、0.9%、3.0%、4.4%、3.8%であった。日差再現性はそれぞれ、2.2%、3.4%、4.4%、9.2%であった。SRM972a を分析し求めた正確さはそれぞれ、98.8%、102.2%、99.0%、99.4%であった。本法の再現性、正確性は共に良好な結果であった。最小血清 25(OH)D3、3-epi-25(OH)D3、25(OH)D2、24,25(OH)2D3 の同時分析の最小定量感度はそれぞれ、0.091 ng/mL、0.020 ng/mL、0.013 ng/mL、0.024 ng/mLであった。血清 25(OH)D は健常者では、10-40 ng/mL と言われており、ビタミン D 代謝動態を評価するのに十分な感度を有していると考えられる。また、検体種 (血清、EDTA 血漿、ヘパリン血漿) による分析安定性の検

討を行なった結果、どの検体種においても測定値に有意な差はみられなかった。

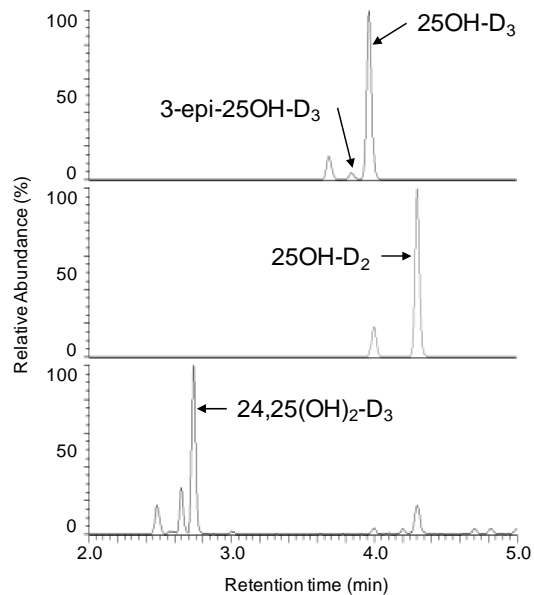


図 2. 血清 25(OH)D3; 3-epi-25(OH)D3; 25(OH)D2; 24,25(OH)2D3 の同時分析

110 名の健常者検体を用いて LC-MS/MS と RIA による 25(OH)D 測定値の比較を行なった結果、RIA では LC-MS/MS に比べて約 30% 高値傾向を示すことがわかった。他の代謝物 [3-epi-25(OH)D3、24,25(OH)2D3] を加えると、この傾向は約 10% 程度に下がるため、RIA 法では 25(OH)D 以外の代謝物も測り混んでいる可能性が示唆された。今後は、より多数の健常者データを集め、基準範囲を構築すると共に、1,25(OH)2D についても同様に分析法の構築および基礎性能評価を行っていく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Satoh M, Ishige T, Ogawa S, Nishimura M, Matsushita K, Higashi T, Nomura F. Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC-MS/MS for clinical laboratory applications. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408: 7617-7627. DOI: 10.1007/s00216-016-9821-4. (査読あり)

Ishige T, Itoga S, Matsushita K, Nomura F. Locked nucleic acid probe enhances Sanger sequencing sensitivity and improves diagnostic accuracy of high-resolution melting-based KRAS mutational analysis. *Clin Chim Acta.* 2016; 457: 75-80. DOI:

10.1016/j.cca.2016.04.005. (査読あり)

Ishige T, Nishimura M, Satoh M, Fujimoto M, Fukuyo M, Semba T, Kado S, Tsuchida S, Sawai S, Matsushita K, Togawa A, Matsubara H, Kaneda A, Nomura F. Combined Secretomics and Transcriptomics Revealed Cancer-Derived GDF15 is Involved in Diffuse-Type Gastric Cancer Progression and Fibroblast Activation. Sci Rep. 2016; 6: 21681. DOI: 10.1038/srep21681. (査読あり)

石毛崇之, 佐藤守, 小川祥二郎, 西村基, 東達也, 野村文夫. LC-MS/MSによるビタミンD代謝動態の評価. 臨床病理. 2015; 63: 457-464. (査読なし)

[学会発表](計 6 件)

石毛崇之, 糸賀栄, 西村基, 野村文夫, 松下一之. サンガー法の検出感度向上のための野生型アレレル阻害サイクルシーケンス反応. 第23回日本遺伝子診療学会大会, イイノホール&カンファレンスセンター(東京都千代田区), 2016年10月6-8日.

石毛崇之, 糸賀栄, 北村浩一, 西村基, 松下一之, 野村文夫. Long-PCRと大量並列シーケンシングによる家族性地中海熱の原因遺伝子MEFVの遺伝学的検査. 日本臨床検査自動化学会第48回大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年9月21-23日.

Ishige T, Nishimura M, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. Integrated secretome and transcriptome analyses for identification of functional secreted molecules involved in diffuse-type gastric cancer progression. MSACL2016EU, Salzburg Congress Center (Salzburg, AUSTRIA), Sep 12-15, 2016.

石毛崇之, 糸賀栄, 松下一之, 野村文夫. LNA-PCR Sequencingによる高感度KRAS遺伝子変異解析. 日本臨床検査自動化学会第47回大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2015年10月9-10日.

佐藤守, 石毛崇之, 小川祥二郎, 西村基, 松下一之, 東達也, 野村文夫. LC/MS/MSの臨床検査応用 - ビタミンD代謝物測定を基盤に -. 日本臨床検査自動化学会第47回大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2015年10月9-10日.

佐藤守, 石毛崇之, 小川祥二郎, 西村基, 松下一之, 東達也, 野村文夫. LC/MS/MSの臨床検査応用 - ビタミンD代謝物測定を基盤に -. 第40回日本医用マススペクトル学会年会,

アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市), 2015年9月17-18日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石毛崇之 (ISHIGE, Takayuki)  
千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師  
研究者番号: 30757315

(2) 研究協力者

佐藤 守 (SATO, Mamoru)  
千葉大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 20401002

野村 文夫 (NOMURA, Fumio)  
千葉大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号: 80164739

西村 基 (NISHIMURA, Motoi)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80400969

小川 祥二郎 (OGAWA, Shoujiro)  
東京理科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 30546271

東 達也 (HIGASHI, Tatsuya)  
東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90272963