

《ノート》

## 血漿のミニカラムによる精製を用いた 1,25-Dihydroxy-vitamin D の測定

—高速液体クロマトグラフィによる精製との比較検討—

An Assay for Circulating 1,25-dihydroxy-vitamin D Employing Purification with a Mini-column—Comparison with a Method Using Purification by High Performance Liquid Chromatography—

高田 政彦\* 山本 逸雄\* 大中 恭夫\* 浜津 尚就\*  
森田 陸司\* 青木 悅雄\*\* 游 逸明\*\*\*

Masahiko TAKADA\*, Itsuo YAMAMOTO\*, Yasuo ONAKA\*, Masanari HAMAZU\*, Rikushi MORITA\*, Etsuo AOKI\*\* and Itsuaki YU\*\*\*

\*Department of Radiology, Shiga University of Medical Science,  
\*\*Takashima County Hospital and \*\*\*Ohmi Onsen Hospital

### I. はじめに

活性型ビタミンD(1,25-dihydroxyvitaminD)はカルシウム、骨代謝においてきわめて重要なホルモンであり、その血中濃度の測定は諸種の病態の診断、理解においてきわめて重要であるだけでなく<sup>1)</sup>、近年広く治療薬として用いられている、活性型ビタミンDの血中濃度の観察に不可欠である。現在、1,25-dihydroxyvitaminDの血中濃度の測定は、諸種の抽出操作後、さらにそれを精製し、レセプターアッセイを行なうという方法<sup>2)</sup>が用いられている。この様な測定法は、精製法として高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いるため、きわめて煩雑であり、大量の検体を処理でき

ず、費用もかかるという欠点がある。このように測定法の煩雑さとその費用の高価なことは1,25-dihydroxyvitaminD測定の普及の妨げともなっている。近年、米国にて開発された、HPLCを用い、一度のミニカラムによる前処置で測定を行う方法<sup>3)</sup>は、測定が、なお他のキットなどに比し複雑とは言え、従来のものに比し、きわめて簡便であり、大量のサンプルを処理できるという長所を持っている。今回このような測定法の一つである、ニコルス社製の1,25-dihydroxyvitaminD測定キットを使用する機会を得、HPLCによる精製法との比較検討を行ったのでその成績について報告する。

### II. 方 法

#### 1) 血清のミニカラムによる前処置

血清処理方法の概略をFig.1に示すが、血清0.5ないし1.0ml(0.5mlの時は生食を加え1ml

**Key words:** 1,25-Dihydroxy-vitamin D, Radio-receptor assay, Calcium metabolism.

\* 滋賀医科大学放射線科

\*\* 公立高島総合病院放射線科

\*\*\* 近江温泉病院放射線科

受付:3年1月20日

最終稿受付:3年2月25日

別刷請求先:大津市瀬田月輪町(番520-21)

滋賀医科大学放射線科

山 本 逸 雄

にする)をパイレックスガラス管にとり回収率計算用  $^3\text{H}-1,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) 50  $\mu\text{l}$  (約 1,500 dpm) をいれ攪拌後 10 分放置しアセトニトリル 1  $\text{mL}$  を加え 30 秒間攪拌し 1,500 × g にて 4°C, 10 分間遠沈し上清を 0.4 M リン酸バッファ (pH 10.5) 1  $\text{mL}$  をいれたパイレックス試験管にいれ攪拌後再び 1,500 × g, 4°C, 15 分間遠沈した。その上清を前処置されたミニカラムに注入した。C<sub>18</sub>-OHミニカラム (8 × 20 mm) は 400 mmHg 程度の真空にて吸引できるようにセットしておき検体を注入する前に 5  $\text{mL}$  ヘキサン, 5  $\text{mL}$  イソプロパノール, 5  $\text{mL}$  メタノール, 5  $\text{mL}$  蒸留水の順序にて加え、それぞれ、吸引洗浄しておく。このように前処理されたミニカラムに先ほどの血清の抽出物を注入した。そして、さらに 5  $\text{mL}$  蒸留水, 5  $\text{mL}$  70% メタノール/水 (v/v), 5  $\text{mL}$  10% 塩化メチレン/ヘキサン (v/v), 5  $\text{mL}$  1% イソプロパノール/ヘキサン (v/v) をこの順序にてくわえそれぞれ吸引洗浄した。最後にパイレックスガラス管をカラムの出口にセットし 5  $\text{mL}$  5% イソプロパノール/ヘキサン (v/v) をミニカラムに注入しその流出液をガラス管に収集した。このようにして得た抽出液を窒素ガス下に蒸発乾固させ、200

$\mu\text{l}$  のイソプロパノールに再溶解した。このまま測定まで -20°C にて保存した。あるいはこれをさらなる検討のための高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 用検体とした。

### 2) 高速液体クロマトグラフィによる精製

ミニカラムにて抽出された検体を窒素ガスにて溶媒を蒸発させた後、HPLC 用溶媒に再溶解した。すなわち、HPLC は 4 × 15 cm の C<sub>18</sub> 逆層カラム (メルク社製) を装着した東ソー株式会社製 HPLC 装置を用い 1.5 mL/min の流速にてヘキサン / メタノール / イソプロパノール (v/v/v: 88/7/5) の溶媒にて流した。前もって決定された 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> の流出画分 (約 1 分間) の前後 30 秒間を含めて計 2 分間の分画をガラス管に採取した。その分画を窒素ガス下で蒸発させ 200  $\mu\text{l}$  のイソプロパノールに再溶解し測定まで -20°C にて保存した。

### 3) 胸腺レセプターによるレセプター・アッセイ

パイレックス試験管に 50  $\mu\text{l}$  の検体あるいは標準として既知量の 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> の 50  $\mu\text{l}$  をいれ、それに胸腺レセプター試薬 500  $\mu\text{l}$  を加え攪拌後室温にて 1 時間放置した。1 時間後にさらに  $^3\text{H}-1,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  50  $\mu\text{l}$  (約 10,000 dpm) を加え攪拌後 1 時間室温にて放置した。その後 100  $\mu\text{l}$  の 3%

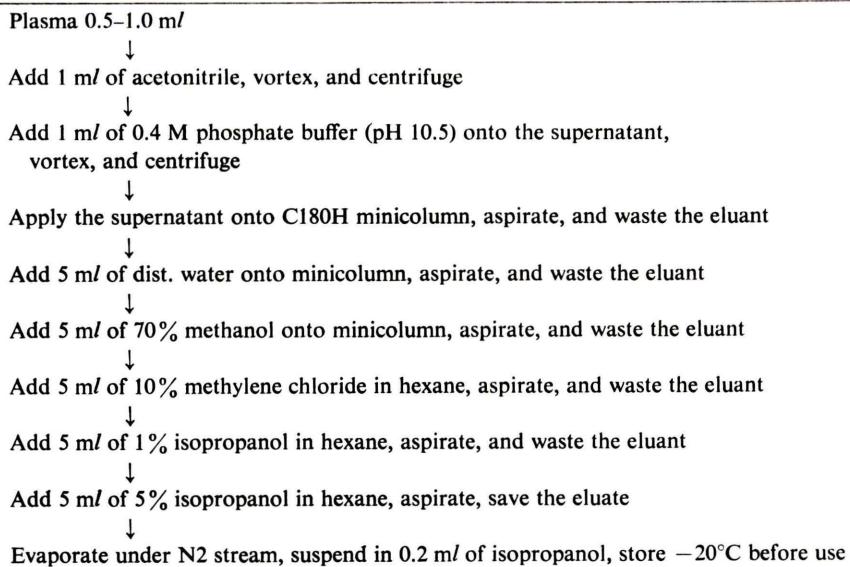


Fig. 1 Protocol for extraction and purification from serum samples.

チャコール試薬を加え 4°C にて 30 分静置後 1,500 ×g にて 4°C, 20 分間遠沈しその上清を 5 ml シンチレーションバイヤルにうつした。

2 ml のシンチレータをくわえ 液体シンチレーションカウンタ (Packard Ins.) にてその放射能を計測した。また回収率計算のため測定に用いたのと同量を別にシンチレーションバイヤルにとり同様に計測した。測定値の計算は標準曲線より計測値の量を読みとり、回収率を補正することにより行った。なお一部の測定はニワトリ腸管レセプター(ヤマサ醤油社製)キットを用いることにより胸腺レセプターとの比較を行ったが、この場合測定条件はすでに報告した 4°C, 24 時間の条件にて行った<sup>1)</sup>。

#### 4) 対象および検討項目

他の各種ビタミン D の影響を調べる目的で 1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, 23,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-23,26 lactone(以上帝人より提供), 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, 25-OH-D<sub>3</sub>, 1α-OH-D<sub>3</sub>(以上中外製薬より提供)等のビタミン D 代謝物、アナログの測定への交差を検討した。血清の前処理における抽出率と他の代謝物の除去の効果および HPLC による精製との相関について検討した。

健常人(15名, 21-52歳), 人工透析患者15名(1α-OH-D<sub>3</sub>服用者を含む), 諸種の疾患患者18名(この中には 1α-OH-D<sub>3</sub>を 30 μg/日 服用中のビタミン D 抵抗性骨軟化症例も含まれている)の血清検体、および2名の健常者に 1α-OH-D<sub>3</sub> 10 μg を服用させたのちの血清検体を検討検体とした。

### III. 結 果

本測定キットにおける標準曲線を Fig. 2 に示す。比較対照としてほぼ同等の Bo/T を示す従来のニワトリ腸管レセプター<sup>アッセイ</sup>系における標準曲線を示す。特異的結合はほぼ同等であるが感度は最大結合 50% 抑制濃度でみると胸腺レセプター系の方が約 3 倍高かった。

各種ビタミン D の測定に対する交差能について検討した結果を Fig. 3 に示す。1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> は 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> とほぼ同等の結合能を示したが

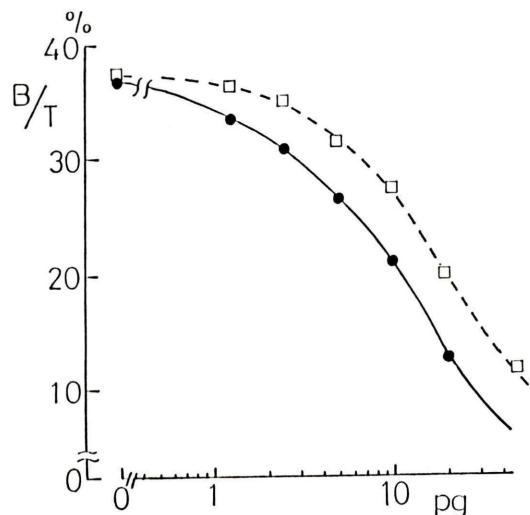


Fig. 2 Standard curves of radioreceptor assay for 1,25-dihydroxyvitamin D using chick intestinal cytosol (□) or bovine thymus (●) as receptor. Horizontal axis shows concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.

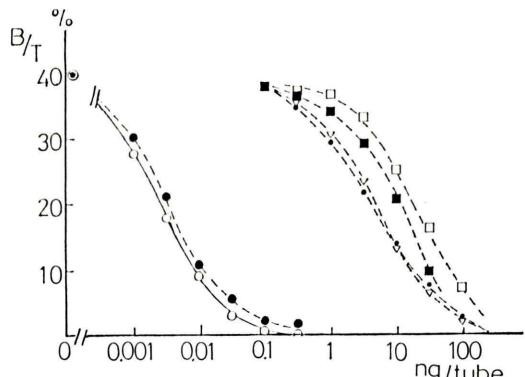


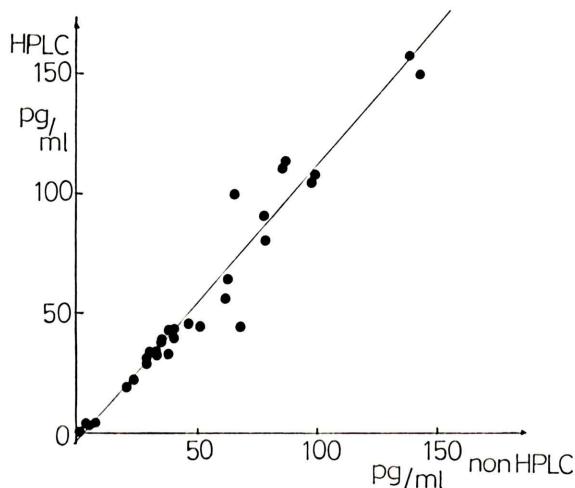
Fig. 3 Competition of binding to bovine thymus receptor by various vitamin D metabolites or analogs. ○: 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, ●: 1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, △: 25-OH-D<sub>3</sub>, ▽: 1α-OH-D<sub>3</sub>, ■: 23,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-23,26 lactone, □: 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>

25-OH-D<sub>3</sub> および 1α-OH-D<sub>3</sub> は 1/1000 以下, 24, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> は約 1/10000 の結合能であった。

ミニカラムによる血液前処理の検討のために各種ビタミン D の大量を前もって血清に添加しておき、その測定への影響を検討したが Table 1 に示すごとく 25-OH-D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, 1α-OH-

**Table 1** Effect of various vitamin D metabolites on assay results. Significant amounts of vitamin D metabolites were added in the same plasma sample before extraction and assay was performed as protocol. Except 1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, assay results were not affected

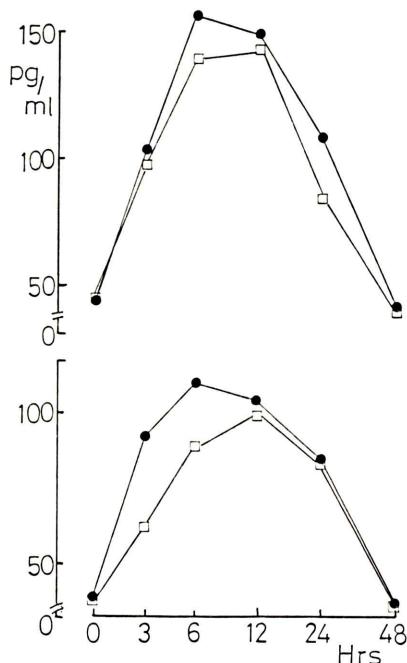
Control plasma	37.8 pg/ml
+25-OH-D <sub>3</sub> 100 ng	36.2
+24,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> 10 ng	34.4
+1 $\alpha$ -OH-D <sub>3</sub> 10 ng	42.3
+23,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> -23,26 lactone 10 ng	35.5
+1,24R-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> 100 pg	171
+1,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> 100 pg	113



**Fig. 4** Correlation between the presence and absence of HPLC purification. A good linear relationship was obtained ( $y = 1.25x - 3.71$ ;  $r = 0.97$ ;  $p < 0.05$ ).

D<sub>3</sub>, 23,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-23,26 lactoneなどの大量添加は、測定結果に有意の影響を与えたかったが、1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>は強く影響を与えた。また<sup>3</sup>H-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>添加による回収率の検討では、 $82.7 \pm 4.7\%$ (平均±1 SD, n=44), 一方<sup>3</sup>H-25-OH-D<sub>3</sub>の回収率は $1.09 \pm 0.17\%$ (平均±1 SD, n=7)であった。

健常人、腎不全例、1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>服用例、各種悪性腫瘍患者例の血清検体をミニカラムにて抽出後その半分をHPLCにて精製し一方残りの半分はHPLCにて精製せずにそのまま測定を行い比較検



**Fig. 5** Plasma 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D levels after administration of 10  $\mu$ g of 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> in two healthy men. Plasma samples were assayed with (●) or without (□) HPLC purification.

討した。その成績をFig. 4に示す。測定は同一のウシ胸腺レセプターを用いて行った。Fig. 4に示すように同一検体をHPLCによる精製を加えたのち測定したものとミニカラムによる精製のみで測定した測定値のあいだに相関係数0.97と良好な相関を得た。また2例の1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>大量(10  $\mu$ g)服用例の血清についても同様の検討を行ったが、Fig. 5に示すようにそれらの値はよく相関を示し、このような大量1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>の服用にても、測定値に影響を与えないことが認められた。

#### IV. 考案

主要なカルシウム調節ステロイドホルモンである活性型ビタミンD、1,25-(OH)<sub>2</sub>-Dは諸種の代謝性骨疾患や内分泌疾患においてその測定がきわめて重要である<sup>4)</sup>。また近年わが国において広く用いられている治療薬としての活性型ビタミンDの血中濃度測定はその効果を判定する上において

も重要なことであるにもかかわらず、測定の煩雑さという問題により広く行われるに至っていない。1,25-(OH)<sub>2</sub>-D の測定上の大きな問題点は、血中 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D の値が他の代謝物の値に比較して 100 倍以上低いと言うことに加えて、1,25-(OH)<sub>2</sub>-D レセプターも 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> に特異的とはいえない 1000 倍位の特異性であるということにある<sup>5)</sup>。このために、血中に存在する他の多くの代謝物の測定値への影響を避けるためには、なんらかの精製操作が必要となる。従来の方法は、血清脂質を抽出後、更に精製のために HPLC を用いていた<sup>2)</sup>。HPLC は一検体当たり最低 30-60 分かかり、大量の同時処理は不可能であり測定の価格も高くつく。今回開発されたニコルス社のキットは抽出および精製にミニカラムを用いようとするものである。したがって今回の検討は HPLC が省けるかどうかという点に注目して行われた。

まず基礎的検討では、胸腺レセプターの感度がきわめて高いことが示された。ニワトリ腸管に比し高いかどうかはそれぞれの測定の条件が違うので厳密には比較できないが、少なくとも本キットの条件下では約 3 倍高かった。感度は 1 pg/tube にも達するがこのことは、測定に要する血清が 0.5 ml で充分であるということを示している。従来のものは最低でも 1 ml 要した。血清に諸種のビタミン D を加えてその測定値への影響を検討したが、臨床的に用いられると考えられるそれらの最大量添加でなんら影響を与えなかった。ただ 1,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> は完全に交差したが、これは従来の HPLC を用いる測定においても同様である<sup>6)</sup>。諸種の疾患における相関を示した Fig. 4 では、HPLC を用いた測定値群と用いない測定値群との間にきわめて良好な相関がえられ、HPLC が不要であることが示されている。諸種の代謝物が混在すると考えられる腎不全例や、1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> 投与例においてもなんら差は認められなかった。特に臨床上問題となり易いと考えられる 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> 大量投与例について検討を加えたが 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> 10  $\mu$ g という大量投与例(通常の 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> の投与量の約 10 倍量)や、30  $\mu$ g という超大量投与例

においても HPLC を用いたものと同様の値が得られたということは、1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> 剤やおそらく 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 剤を投与されている例においても測定に影響を与えることはないと結論される。もちろん多くの例による検討が残されているが、この系において測定に影響を与えるものがあるとすればそれはおそらく 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D と化学的にも、生物学的にもきわめてよく似た物質が含まれているということであり、それはそれでまた、そのスクリーニングとして意味があることである。そして臨床的に判断して不合理に異常高値を示すような例がもしあればそのような検体に対して HPLC を用いさらに詳細に検討するべきであろう。ミニカラムによる 1 段階の精製は測定時間を従来の約 1/20 にも短縮し、抽出、測定を含めてすべての測定を一日で終えることもできる。本測定は、日常の測定として充分用いることが可能であり、従来の HPLC 法に取って換わるものと考えられる。

本測定法は従来のものに比しきわめて簡便になったとはいえる、なお <sup>3</sup>H 標識ホルモンを用いまた有機溶媒系を用いるなど他の測定系に比しなお煩雑と言える。これらの問題点を解決していくのが今後の課題と思われる。

以上ミニカラムを用いる簡便な 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D の測定系の検討について報告したがこのような簡便な測定法の発展により 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D の臨床的検討がもっと深められることを期待したい。

謝辞：1,25-(OH)<sub>2</sub>-D 測定キットを提供くださった日本メジフィジックス社および腸管 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D レセプターを提供くださったヤマサ醤油株式会社に感謝致します。

## 文 献

- 1) 山本逸雄、滋野長平、日野 恵、他：各種疾患における血中ビタミン D 代謝物の測定——特に血中 1,25-dihydroxyvitamin D 濃度について——。ビタミン 61: 1-11, 1987
- 2) 土光茂治、森田陸司、福永仁夫、他：人血中 vitamin D 誘導体の測定に関する研究 II、諸種 vitamin D 誘導体の同一試料からの同時測定に関する基礎的研究。日内分泌学誌 57: 1223-1238, 1981

- 3) Hollis BW: Assay of circulating 1,25-dihydroxy-vitamin D involving a novel single cartridge extraction and purification procedure. *Clin Chem* **32**: 2060-2063, 1986
- 4) DeLuca HF: The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutrition Rev* **37**: 161-193, 1979
- 5) Reinhhardt TA, Horst RL, Littledike T, et al: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in bovine thymus gland. *Biochem Biophys Res Comm* **106**: 1012-1018, 1982
- 6) Shigeno C, Yamamoto I, Dokoh S, et al: Identification of 1,24R-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-like bone resorbing lipid in a patient with cancer associated hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* **61**: 761-768, 1985