

## 血中ビタミン D 濃度の測定法による差の検討

### —LC-MS/MS 法と CLIA 法の比較—

長岐 ゆい<sup>1)</sup>, 奥山幸一郎<sup>2)3)</sup>, 豊口 恵理<sup>1)</sup>

岩谷 幸栄<sup>1)</sup>, 多治見公高<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構秋田労災病院中央検査部

<sup>2)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構秋田労災病院整形外科

<sup>3)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構秋田労災病院労災疾病研究室

(2018 年 10 月 15 日受付)

**要旨**：(背景と目的)；血中ビタミン D は骨の代謝調節に作用し，体内のビタミン D 量を知るには 25 水酸化ビタミン D [25(OH)D] の測定が必要不可欠である．平成 28 年に免疫測定法 (CLIA 法, CLEIA 法) による血中 25(OH)D 濃度の測定が保険収載された．今回我々は，血中 25(OH)D 濃度について検体凍結前後の差と 2 種の測定方法による測定値への影響を比較検討した．

(方法)；LC-MS/MS 法で血中 25(OH)D 濃度を測定した秋田県在住の屋内勤労者 306 名の凍結保存血清検体から 100 検体を抽出して使用した．その 100 検体について LC-MS/MS 法と CLIA 法で血中 25(OH)D 濃度を測定した．

(結果)；LC-MS/MS 法による血中 25(OH)D 濃度は凍結前後で正の相関を認めた ( $r=0.916$ ,  $p<0.0001$ )．また凍結保存後の測定値は有意に低下した．凍結後も LC-MS/MS 法と CLIA 法での血中 25(OH)D 濃度は高い正の相関を認めた ( $r=0.924$ ,  $p<0.0001$ )．LC-MS/MS 法と比較し CLIA 法の測定値が有意に高値となった ( $p<0.0001$ )．

(考察と結語)；ビタミン D 欠乏症を診断するときには，その濃度測定方法間に差があることを考慮するべきである．また，血清検体を  $-30^{\circ}\text{C}$  で長期凍結保存すると 25(OH)D の測定値は有意に低下する事も注意する必要がある．今回の検討から検体の取り扱い方法や測定値の標準化が課題になると思われる．

(日職災医誌, 67 : 325—329, 2019)

#### —キーワード—

25(OH)D (25-hydroxyvitamin D), LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry), CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)

#### はじめに

ビタミン D は脂溶性ビタミンの一つで血中カルシウム，リンの代謝調節に関与しており，その低下は小児のくる病，骨軟化症や骨折リスクの上昇などにつながる．25 水酸化ビタミン D [以下, 25(OH)D] は血中で最も安定したビタミン D 代謝物質であり，その測定により体内のビタミン D 量を把握することができる．また，血中 25(OH)D 濃度の測定は平成 28 年 8 月に新規保険収載された．認められた測定方法は化学発光免疫測定 (Chemiluminescent Immunoassay : CLIA) 法と化学発光酵素免疫測定 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay : CLEIA) 法である．従来，基礎研究等では 25(OH)D の分

画 [25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>] を測定できる液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry : LC-MS/MS) 法がよく使用されている．血中 25(OH)D 濃度の測定法に関しては方法や施設間で差が認められることが報告されている<sup>1)2)</sup>．このため，今回我々は血中 25(OH)D 濃度について血清検体の凍結保存による測定値への影響と，従来研究で使用されていた LC-MS/MS 法と，新規保険収載された CLIA 法での測定値の比較検討を行った．

#### 対象と方法

平成 27 年度労災疾病臨床研究補助金事業「中高年層勤労者の腰痛症と転倒予防のためのデータベース作成

(HACHICO trial)<sup>3)</sup>で血中 25(OH)D 濃度を測定し解析を行った 306 名(年齢  $40 \pm 13.1$  歳, 男性 209 名, 女性 97 名)の凍結保存血清検体から, 無作為に抽出した 100 血清検体を使用した。

解析を行った 306 名は, 平成 26 年 11 月 1 日から平成 27 年 11 月 1 日の期間に当院で採血を実施した。検体は遠心分離後, 血清を 2 本に分注し 1 本は血中 25(OH)D 濃度を LC-MS/MS 法で測定し, 残りの 1 本は  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。今回, 凍結保存していた 306 血清検体から 100 血清検体を無作為に抽出し血中 25(OH)D 濃度を LC-MS/MS 法と CLIA 法で測定し, 採血直後の測定値と比較をした。血中 25(OH)D 濃度の測定は外部業者 (LSI メディエンス) に委託して行い, 測定は平成 28 年 5 月に行った。CLIA 法の測定試薬はリエゾン 25 水酸化ビタミン D トータルを使用した。統計学的処理は SPBS Ver. 9.67 を使用し, 対応のある t 検定, Wilcoxon 符号付順位検定を用い,  $p < 0.01$  を有意とした。本研究はヘルシンキ宣言並びに医学的研究の倫理的原則に従い, 秋田労災病院倫理審査委員会の承認 (No. 32) を受けて実施した。

表 1 LC-MS/MS 法による 25(OH)D 濃度 (ng/ml)

	採血直後	凍結保存後
25(OH)D <sub>2</sub>	<4.0	<4.0
25(OH)D <sub>3</sub> mean $\pm$ SD	16.0 $\pm$ 7.58*	14.4 $\pm$ 6.51*
median [IQR]	14.6 [11.5 ~ 20.7]	13.3 [10.4 ~ 18.0]
range	4.0 ~ 41.1	4.1 ~ 32.7

\*有意差あり  $p < 0.01$

対応のある t 検定

## 結 果

LC-MS/MS 法の CV (変動係数) は, 25(OH)D<sub>2</sub> が 7.5~9.5% (2 濃度,  $n=10$ ), 25(OH)D<sub>3</sub> が 5.3~8.6% (3 濃度,  $n=10$ ) であった。CLIA 法の CV は 25(OH)D が 1.7~2.7% (3 濃度,  $n=20$ ) で両方法とも同時再現性は良好であった。

血清検体の凍結保存期間は検体により 195 日から 560 日 (mean  $\pm$  SD =  $378 \pm 113$  日) とばらつきがあった。検体ごとの保存日数と凍結前後での 25(OH)D 濃度の変動の大きさに相関関係は認められなかった。

採血直後の血中 25(OH)D<sub>2</sub> 濃度はすべての検体で測定下限値である 4.0ng/ml 未満で, 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は  $16.0 \pm 7.6$ ng/ml であった。凍結保存後の 25(OH)D<sub>2</sub> 濃度もすべて 4.0ng/ml 未満で, 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は  $14.4 \pm 6.5$ ng/ml であった (表 1)。凍結前後の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度で高い正の相関を認めた ( $r=0.916$ ,  $p < 0.0001$ ) (図 1)。しかし, 採血直後に比較し凍結保存後の測定値は有意に低下した ( $p < 0.0001$ )。

一方, 凍結保存後の測定値で比較すると, 両方法間で正の相関を認めた ( $r=0.924$ ,  $p < 0.0001$ ) (図 2)。LC-MS/MS 法の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は  $14.4 \pm 6.5$ ng/ml, CLIA 法の 25(OH)D 濃度は  $17.3 \pm 8.0$ ng/ml であり, LC-MS/MS 法に比較し CLIA 法の測定値は有意に高値となった ( $p < 0.0001$ ) (表 2)。

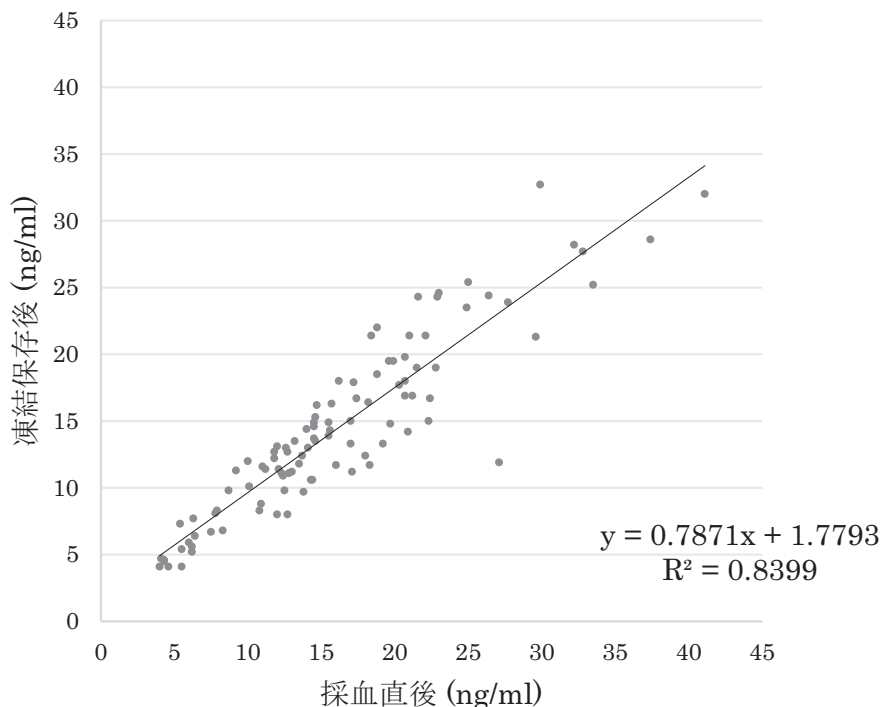


図 1 採血直後と凍結保存後の 25(OH)D 濃度の比較 (LC-MS/MS 法)

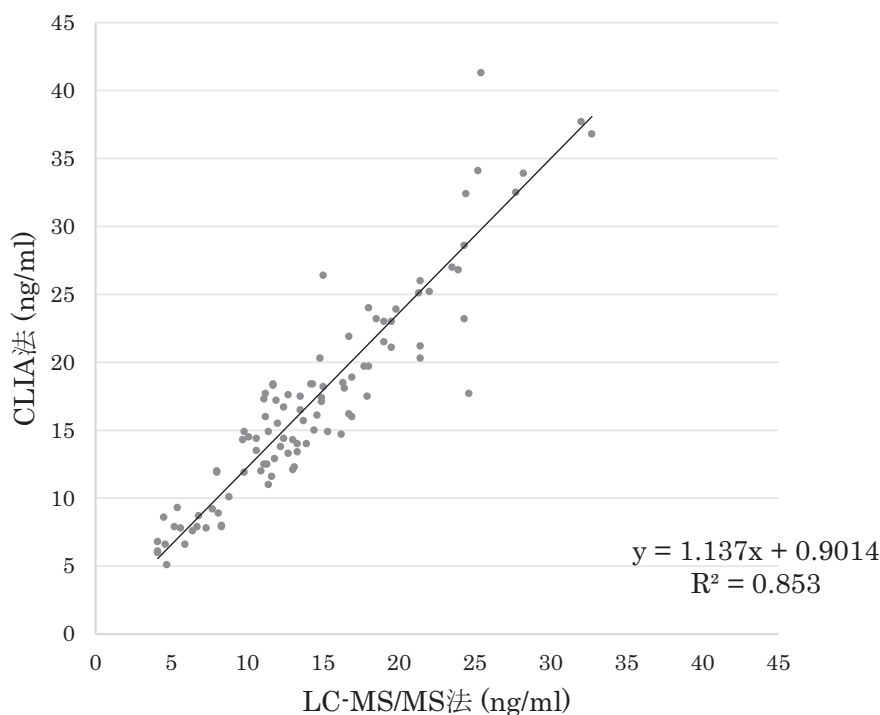


図2 測定法による差 (LC-MS/MS法とCLIA法)

表2 各測定法の25(OH)D濃度 (ng/ml)

		LC-MS/MS法	CLIA法
25(OH)D	mean ± SD	14.4 ± 6.51*	17.3 ± 8.01*
	median [IQR]	13.3 [10.4 ~ 18.0]	16.1 [12.1 ~ 20.7]
	range	4.1 ~ 32.7	5.1 ~ 45.6

\*有意差あり p&lt;0.01

Wilcoxon 符号付順位検定

## 考 察

血中25(OH)D濃度の測定において、血清検体を $-30^{\circ}\text{C}$ で長期凍結保存することにより測定値は有意に低下する結果となった。LC-MS/MS法による血中25(OH)D濃度の測定を依頼した業者では、検体安定性を $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で4週間まで保証している。また生化学検査等の一部項目の測定値は、採取直後から経時的に変化することが一般的に知られている。今回測定した検体の凍結保存期間は平均378日であり、検体ごとの保存期間と凍結前後の25(OH)D濃度差の間には相関が認められなかった。さらに測定値の変動には個体差がみられた。保存温度に関して、検体の安定性を保つには $-80^{\circ}\text{C}$ での保存が必要であるとの報告がある。<sup>4)</sup>検体中に含まれる種々の成分が測定値を変動させる要因となり、 $-30^{\circ}\text{C}$ よりさらに低温で保存することでそれらが測定値へ影響することを回避できるのではないかと考えられる。血中25(OH)D濃度の測定において検体を長期保存する場合には適切な検体管理が重要である。

測定法の比較を行った結果、LC-MS/MS法に比べ

CLIA法の測定値が有意に高値となった。CLIA法の測定に使用した試薬の添付文書には、健常人検体を用いたLC-MS/MS法との相関性は $[\text{CLIA法測定値}] = 0.98 \times [\text{LC-MS/MS法測定値}] + 2.10$ と良好な相関性が得られたとされている。CLIA法は測定原理により目的物質の異性体や異好抗体などとの反応が測定値へ影響することがあり、血中25(OH)D濃度の測定では特に小児検体中に存在する3-epi25(OH)D<sub>3</sub>により測定値が偽高値となることが知られている。<sup>5)6)</sup>一方、LC-MS/MS法は血中25(OH)D濃度の基準測定法に認められており、特異性が高く、今回はこれを分離定量している。LC-MS/MS法は信頼性の高い測定法であるといえる。また、CLIA法で測定した25(OH)D濃度は25(OH)D<sub>2</sub>と25(OH)D<sub>3</sub>を合わせて25(OH)Dとして測定する試薬であった。LC-MS/MS法で測定した血中25(OH)D<sub>2</sub>濃度は全検体が測定下限値である4.0ng/ml未満となり定量できなかった。血中25(OH)D<sub>2</sub>濃度は一般的には低いとされるが、CLIA法で血中25(OH)D濃度を測定する場合は考慮する必要があると考えられる。本研究ではCLIA法で測定した25(OH)D濃度とLC-MS/MS法で測定した25(OH)D<sub>3</sub>濃度を比較し両方法間で相関を認めたが、測定法により原理、測定物質が異なるため測定値に差が生じたものと考えられる。

厚生労働省難治性疾患克服研究事業ホルモン受容機構異常に関する調査研究班、日本骨代謝学会、日本内分泌学会により策定された「ビタミンD不足・欠乏の判定指針」で、<sup>7)</sup>ビタミンD充足とされる血中25(OH)D濃度の

表3 ビタミンD不足・欠乏の判定指針

厚生労働省難治性疾患克服研究事業ホルモン受容機構異常に関する調査研究班  
 一般社団法人 日本骨代謝学会  
 一般社団法人 日本内分泌学会

判定基準
1) 血清 25(OH)D 濃度が 30ng/ml 以上をビタミン D 充足状態と判定する
2) 血清 25(OH)D 濃度が 30ng/ml 未満をビタミン D 非充足状態と判定する
a. 血清 25(OH)D 濃度が 20ng/ml 以上 30ng/ml 未満をビタミン D 不足と判定する
b. 血清 25(OH)D 濃度が 20ng/ml 未満をビタミン D 欠乏と判定する

注

- 血清 25(OH)D 濃度は、測定法によって差異がある。将来的には標準化が求められる。
- 小児、周産期に関しては、異なる基準が必要になる可能性がある。また、小児の栄養性くる病に関しては国際コンセンサス指針がある。
- 本指針は、骨・ミネラル代謝関連事象の観点から策定されたものである。
- ビタミン D 非充足と悪性腫瘍、疾患、心血管疾患、さらに免疫機能などとの関連が数多く報告されている。しかし本邦での検討は少なく、また海外のガイドラインでも非骨・ミネラル代謝関連事象は考慮されていない。従って本指針でも、これら非骨・ミネラル代謝関連事象については考慮していない。

表4 「ビタミンD不足・欠乏の判定指針」による分類

25(OH)D 濃度 (ng/ml)	LC-MS/MS 法			計	
	<20	≥20, <30	≥30		
CLIA 法	<20	72	1	0	73
	≥20, <30	10	9	0	19
	≥30	0	6	2	8
	計	82	16	2	100 (人)

カットオフ値は 30ng/ml に設定されている(表3)。この指針をもとに凍結保存後の測定値を欠乏、不足、充足で判定をしてみると、LC-MS/MS 法と CLIA 法の判定が一致した割合は 83.0% であり、ビタミン D 充足状態の人数は LC-MS/MS 法では 2 名、CLIA 法では 8 名であった(表4)。血中 25(OH)D 濃度の測定法の違いがビタミン D 不足、充足の判定に影響していた。平成 28 年 8 月に新規保険収載された CLIA 法では若干高値傾向となることを念頭におき、総合的に体内のビタミン D 量を把握することが必要となる。

近年、ビタミン D は骨疾患のみならず転倒、精神障害、心疾患や糖尿病など様々な分野に関連しているとの報告もされている。<sup>3)8)~10)</sup>日本人データが集約することで国内のビタミン D の臨床応用のさらなる可能性が明らかになると思われる。また、今後は測定施設や検査件数の増加が予想されるため、早急な測定値の標準化作業が課題となる。<sup>11)</sup>

## 結 語

1) LC-MS/MS 法では血清検体を -30℃ で長期保存することで血中 25(OH)D 濃度の測定値に影響を与えない。

2) LC-MS/MS 法と CLIA 法で血中 25(OH)D 濃度の測定値に有意に差を認めない。

利益相反：利益相反基準に該当無し

## 文 献

- 高岡宣子, 長尾匡則, 梅澤光政, 他: 日本人の再生産年齢女性における血中ビタミン D の分布. 日本公衆衛生雑誌 64: 133—142, 2017.
- Enko D, Fridrich L, Rezanka E, et al: 25-hydroxy-Vitamin D status: limitations in comparison and clinical interpretation of serum-levels across different assay methods. Clinical Laboratory 60: 1541—1550, 2014.
- Okuyama K, Miyakoshi N, Sasaki H, et al: What is Deficiency or Inadequacy of 25-Hydroxyvitamin D? How does it Harm Healthy Individuals Physically and Mentally? Austin Journal of Musculoskeletal Disorders 4: 1042, 2017.
- 池田勝義, 大久保滋夫, 松下一之, 他: 検査目的に適合した検体の質を確保するための検体保存評価法の検討—標準化委員会プロジェクト報告—. 臨床病理 63: 120—120, 2015.
- Strathmann FG, Sadikova K, Laha TJ, et al: 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. Clin Chim Acta 413: 203—206, 2012.
- Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK: C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. J Clin Endocrinol Metab 91: 3055—3061, 2006.
- 岡崎 亮: 25 水酸化ビタミン D 測定の意義. モダンメデシア 63: 47—50, 2017.
- Sepehrmanesh Z, Kollahdooz F, Abedi F, et al: Vitamin D Supplementation Affects the Beck Depression Inventory, Insulin Resistance, and Biomarkers of Oxidative Stress in Patients with Major Depressive Disorder: A Randomized, Controlled Clinical Trial. J Nutr 146: 243—248, 2016.
- Grübler MR, Gaksch M, Kienreich K, et al: Effects of vitamin D supplementation on glycosylated haemoglobin and fasting glucose levels in hypertensive patients: a randomized controlled trial. Diabetes obesity and Metabolism 18: 1006—1012, 2016.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al: Vitamin D defi-

ciency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 117: 503–511, 2008.

11) 高木潤一：25水酸化ビタミンD—測定意義と今後の可能性—。 *Bone Joint Nerve* 7: 231–237, 2017.

**Reprint request:**

Yui Nagaki

Department of Clinical Laboratory, Akita Rosai Hospital, 30, Shimotai, Karuizawa, Odate city, Akita, 018-5604, Japan

別刷請求先 〒018-5604 秋田県大館市軽井沢字下岱30番地  
独立行政法人労働者健康安全機構秋田労災病院  
中央検査部  
長岐 ゆい

## An Analysis of Discrepancies in Vitamin D Concentrations by Measurement Methods —Comparison of LC-MS/MS and CLIA—

Yui Nagaki<sup>1)</sup>, Koichiro Okuyama<sup>2,3)</sup>, Eri Toyoguchi<sup>1)</sup>, Koei Iwaya<sup>1)</sup> and Kimitaka Tajimi<sup>3)</sup><sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Akita Rosai Hospital<sup>2)</sup>Department of Orthopedic Surgery, Akita Rosai Hospital<sup>3)</sup>Clinical Research Division of Occupational Health, Akita Rosai Hospital

(Background and Purpose); Vitamin D is a collective structurally related to metabolites obtained from dietary foods, supplements and sunlight. It regulates calcium and phosphorus level in the blood by promoting their absorption from the intestine, and also stimulates bone formation and mineralization. The importance of vitamin D is well recognized in the skeleton. 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) is a stable form of vitamin D metabolized in the liver, and it sharply reflects a nutrition status of vitamin D. Therefore, measurement of 25(OH)D is necessary to know the amount of vitamin D in the body. Measurement of 25(OH)D by immunoassay (CLIA, CLEIA) has been listed on National Medical Insurance of Japan in 2016. The purpose of the current study is to disclose influence of sample cryopreservation and discrepancy between CLIA and LC-MS/MS method on 25(OH)D.

(Materials and Methods); A hundred samples were analyzed out of 306 cryopreserved serum samples which were taken from indoor employees in Odate, Akita. 25(OH)D was measured by LC-MS/MS before the cryopreservation. The mean cryopreservation period was 378 ± 110 (Mean ± SD) days, the samples 25(OH)D were measured by LC-MS/MS and CLIA after cryopreservation.

(Results); In LC-MS/MS method, a high positive correlation was found between 25(OH)D before and after cryopreservation ( $r=0.916$ ,  $p<0.0001$ ). It was also found that the mean value of 25(OH)D was significantly decreased after cryopreservation ( $p<0.0001$ ). In the status after cryopreservation, a high positive correlation was found between 25(OH)D by LC-MS/MS and CLIA method ( $r=0.924$ ,  $p<0.0001$ ). It was also disclosed that the mean value of 25(OH)D by CLIA was significantly increased than that by LC-MS/MS ( $p<0.0001$ ).

(Discussion and Conclusions); For diagnosis of vitamin D deficiency, it should be considered that there are discrepancies of 25(OH)D values among measurement methods. Furthermore, when serum samples are preserved at  $-30^{\circ}\text{C}$ , it should be always kept in mind that the 25(OH)D values are significantly decreased for a long period. Therefore, standardization in handling of the serum samples and the measured values of 25(OH)D should be discussed for a consensus.

(JJOMT, 67: 325–329, 2019)

**—Key words—**

25(OH)D (25-hydroxyvitamin D), LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry), CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)