

〈技術〉

## 全自動化学発光免疫測定装置 ARCHITECT<sup>®</sup> アナライザーを用いた日本人健診受診者の血清総25ヒドロキシビタミンD濃度の測定

田中 一平<sup>1)</sup>、坂巻 浩二<sup>2)</sup>、阿久澤 まさ子<sup>2)</sup>、吉村 徹<sup>1)</sup>、永野 伸郎<sup>3)</sup>

### Studies on measurement of serum total 25-hydroxyvitamin D concentration and investigation of Japanese reference range using a fully-automated chemiluminescent immunoassay ARCHITECT<sup>®</sup> ANALYZER

Ippei Tanaka<sup>1)</sup>, Koji Sakamaki<sup>2)</sup>, Masako Akuzawa<sup>2)</sup>, Toru Yoshimura<sup>1)</sup> and Nobuo Nagano<sup>3)</sup>

**Summary** In this study, we evaluated the performance of a newly developed reagent of 25-OH vitamin D • Abbott on ARCHITECT<sup>®</sup> i2000SR analyzer and investigated the Japanese reference range. The reproducibility test, sensitivity test and dilution linearity test results were all good. Furthermore, correlations with existing products, Liaison (Kyowa Co., Ltd.) and Elecsys (Roche Diagnostics K.K.), were good. This reagent showed good performance. Therefore, it was considered to be useful for routine clinical examinations. As to the results of examining the Japanese reference range of the serum 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) concentration, seasonal variations and gender differences were confirmed. When comparing the results of this Japanese health standard reference study with the "Assessment criteria for vitamin D deficiency/insufficiency in Japan", more than 90 % of the subjects had value below 30 ng/mL which was considered to represent vitamin D in the unbound state. It is speculated that more than 90 % of the

<sup>1)</sup> アボットジャパン株式会社 総合研究所  
(千葉県松戸市松飛台278)

<sup>2)</sup> 医療法人社団日高会 日高病院 健診事業部 健診センター  
(群馬県高崎市巾尾町886)

<sup>3)</sup> 医療法人社団日高会 日高学術研究センター  
(群馬県高崎市巾尾町886)

<sup>1)</sup> Research and Development, Abbott Japan Co., Ltd.  
(278, Matsuhidai, Matsudo-shi, Chiba, 270-2214, Japan)

<sup>2)</sup> Health Care Center, Hidaka Hospital, Hidaka-kai  
(886, Nakao-machi, Takasaki-shi, Gunma, 370-0001, Japan)

<sup>3)</sup> Hidaka Research Center, Hidaka-kai  
(886, Nakao-machi, Takasaki-shi, Gunma, 370-0001, Japan)

〒270-2214 千葉県松戸市松飛台278  
アボットジャパン株式会社 総合研究所  
Tel: 047-386-4602  
Fax: 047-386-4257  
E-mail: ippei.tanaka@abbott.com

受付日：2019年4月17日  
採択日：2019年6月13日

Japanese population is in a state of non-satisfactory vitamin D levels (deficiency or insufficiency).

**Key words:** 25-hydroxyvitamin D (25-OHD), Chemiluminescent immunoassay, Japanese reference range

## I. 緒言

ビタミンDは、皮膚での紫外線照射により生成されるとともに、食事により生体内に取り込まれる栄養素である。その割合は、皮膚での合成によるものが大部分を占め、食事からの摂取量は10-20%とされている<sup>1)</sup>。そのため、健康者でも日照時間の変化により血中濃度の季節変動が生じる<sup>2)</sup>。

ビタミンDは、肝臓で水酸化されて25-OHDとなり、血中ではほとんどがビタミンD結合タンパク質と結合した形で体内循環する。従って血中25-OHD濃度は、ビタミンDの充足度を反映する良好な指標とされている<sup>3-5)</sup>。25-OHDは、必要に応じて腎臓で活性型ビタミンD (1,25-OH<sub>2</sub>D) に変換される。活性型ビタミンDは、腸管カルシウム吸収亢進作用や副甲状腺ホルモン産生抑制作用を有するなど、骨・ミネラル代謝調節におけるホルモンとして知られていたが、最近ではビタミンD受容体の活性化による透析患者や慢性腎臓病患者の延命作用も明らかとされている<sup>6,7)</sup>。

ビタミンD欠乏により発症する典型的な疾患として、乳幼児期における骨基質の石灰化不全によって生じる“くる病”が良く知られている<sup>8,9)</sup>。1900年代に流行したくる病は、適切な日光への暴露や栄養状態の向上に伴い1930から1940年代に減少したものの、近年では再び世界的に増加している<sup>10)</sup>。日本小児内分泌学会によるガイドライン「ビタミンD欠乏性くる病・低カルシウム血症の診断の手引き」では、ビタミンD欠乏は15 ng/mL以下、ビタミンD低値は15-20 ng/mLと定義されている<sup>11)</sup>。

成人においても、ビタミンD不足・欠乏による、がん、自己免疫疾患、感染症、心血管イベント、転倒、骨折、死亡率の増加リスクが報告されている<sup>1,3,12-15)</sup>。海外では、アメリカ内分泌学会の「Clinical Practice Guideline」において、成人におけるビタミンD欠乏は血中25-OHD濃

度が20 ng/mL以下、ビタミンD不足は21-29 ng/mLと定義されている<sup>12)</sup>。一方、国内では、日本内分泌学会による「ビタミンD不足・欠乏の判定指針」では、血清25-OHD濃度が30 ng/mL未満をビタミンD非充足状態（ビタミンD不足：20 ng/mL以上30 ng/mL未満、ビタミンD欠乏：20 ng/mL未満）とする判定基準が示されている<sup>16)</sup>。本研究は、新たに開発された「25-OHビタミンD・アボット」試薬を用いて、日本人成人のビタミンD充足度を調査するための基準範囲を求めることを目的に実施した。

## II. 方法と材料

### 1. 試薬ならびに測定機器

25-OHD濃度は化学発光免疫測定法 (Chemiluminescent Immunoassay ; CLIA) である25-OHビタミンD・アボット (アボットジャパン株式会社 ; アボット) 試薬を用い、ARCHITECT<sup>®</sup>アナライザー i2000SR (アボット) により測定した。なお、本試薬は1ステップ競合免疫測定法であり、手順は以下のとおりである。検体に8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸を含むアッセイ希釈液と抗25-OHビタミンDウサギモノクローナル抗体固相化磁性粒子を含むマイクロパーティクルを添加しインキュベートする。この時、検体中の25-OHDはビタミンD結合蛋白から遊離し、マイクロパーティクルとの複合体を形成する。本反応液中に、アクリジニウム標識25-OHビタミンDを含むコンジュゲートを添加しインキュベート後、洗浄しプレトリガー (過酸化水素) およびトリガー (水酸化ナトリウム) を加え、コンジュゲートの標識物の化学発光を発光強度として測定する。

2015年に初めて海外で発売された本試薬 (5P02) について、製造元であるAbbott Laboratoriesは25-OHD測定の品質管理および標準化のために、Centers for Disease Control and Prevention (CDC, U.S.) が実施している

Vitamin D Standardization-Certification Program (VDSCP) に参加し、2016年以降毎年認証を得ている。また、National Institutes of Health (NIH、U.S.) が設立したVitamin D Standardization Program (VDSP) にも2016年から参加を開始した。

## 2. 検討試料

分析精度および相関性試験の検討には、各検体ベンダー (ProMedDx, LLC, Bioreclamation Inc., Discovery Life Sciences, LLC.) の倫理審査委員会で承認を受けた購入米国人血清検体を用いた。また、日本人健常者の参考値の検討には、ヘルシンキ宣言を遵守し、日高病院 (群馬県高崎市、北緯36.3度) の医療倫理委員会承認のもと、書面により同意が得られた人間ドック健診受診者の血清検体を用いた。

## 3. 分析精度の測定方法

再現性試験は、同一ロット (52954UH00) の試薬で、異なる3種類のコントロール (ARCHITECT 25-OH ビタミン D・コントロール L, M, H: アボット) を各2重測定で1日2回、3日間測定し、測定内再現性および総再現性として各CVを算出した。測定内再現性および総再現性はMicrosoft Excel 2016 MSO (Microsoft Corporation) を用いて、CLSI EP05-A3(October 2014)のSingle-Site Precision Evaluation StudyのData Analysisに従い、二元配置分散分析を行い、測定内の分散の平方根ならびに測定内の分散と測定間の分散と日差の分散の総和の平方根を全体の平均値で割ることで求めた。

感度試験は、定量限界 (Limit of Quantitation: LoQ) として、定量限界付近に調製した濃度の異なる4濃度の血清サンプル (購入米国人血清検体) を用い、各8重測定で5日間測定した。各濃度の平均値と標準誤差からCVを算出し、Y軸にCVを、X軸に真値 (期待値) の自然対数をプロットした。対数近似曲線より求めた式からCV20%を下回る最小濃度を算出し、LoQとした。

希釈直線性試験は、1種類の血清サンプル (購入米国人血清検体) を用い、リン酸緩衝液とビタミンD除去ヒト血清を含むキャリブプレートA (アボット) で5段階の希釈系列を作製し、各検体を2重測定後、それらの値をプロットした。

相関性試験は、購入米国人血清120症例を用

いてCLIA法であるリエゾン 25水酸化ビタミン D トータル (協和メデックス株式会社; リエゾン) ならびに購入米国人血清100症例を用いて電気化学発光免疫測定法 (Electro Chemiluminescence Immunoassay; ECLIA) であるエクルーシス試薬ビタミンDトータルII (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社; エクルーシス) の既承認品に対して評価した。

## 4. 日本人健常者の検討方法

日本人健常者の参考値は、日高病院において夏季 (2014年7月~9月)、冬季 (2015年1月~3月) の2回に分けて採血した合計388例のうち、①血清カルシウム、血清リン、インタクトPTH (以下、それぞれCa、P、iPTHとする) が基準値範囲 (Ca: 8.4-10.2 mg/dL, P: 2.4-4.3 mg/dL, iPTH: 10-65 pg/mL) 外の被験者、②直近で意図的な日焼けを行った被験者、③日高病院より入手した検体情報 (問診) から25-OHD濃度に影響があると考えられる疾患等 (骨疾患・リウマチ性疾患、腎疾患・糖尿病・高コレステロールなどの慢性疾患、食事制限、現在治療中の疾患) を有する被験者を除外した263例 (夏季123例、冬季140例) を測定し、2.5パーセンタイル値 (2.5 %tile) および97.5パーセンタイル値 (97.5 %tile) を求めた。

## 5. 統計解析

統計解析は、JMP Version 10.0.2 (SAS Institute Inc.) を用いて相関係数をSpearmanの相関係数ならびにAnalyse-it Version 4.95.5 (Analyse-it Software, Ltd.) を用いて回帰直線をPassing-Bablok法で行った。季節間および男女間の比較はAnalyse-it Version 4.95.5 (Analyse-it Software, Ltd.) を用いてMann-Whitney U検定を行った。

## Ⅲ. 結果

### 1. 測定精度

再現性は、濃度の異なる3種類のコントロールを用いて再現性を検討した結果、測定内再現性のCVは2.1~2.8%、総再現性のCVは2.3~2.9%であった (Table 1)。

定量限界は、定量限界付近の4濃度のサンプルを各8重測定で5日間測定することにより定量限界試験を検討した結果、LoQは1.04 ng/mLで

# 生物試料分析

Table 1 Precision

	Within-Run			Total reproducibility	
	Mean (ng/mL)	S.D. (ng/mL)	C.V. (%)	S.D. (ng/mL)	C.V. (%)
Control L	19.09	0.53	2.8	0.55	2.9
Control M	41.29	0.87	2.1	0.96	2.3
Control H	78.68	1.80	2.3	2.07	2.6

Control L, M and H of ARCHITECT 25-OH Vitamin D Controls were used.

あった。

直線性は、血清サンプルを用い、キャリブレーションAで5段階の希釈系列を作製し、測定値（2重測定）をプロットした結果、原点を通る良好な直線性を示した（Fig. 1）。

## 2. 相関性試験

血清120症例を用いて、リエゾン（X軸）とアボット（Y軸）における25-OHD濃度を比較した（Fig. 2a）。Spearmanの相関係数は、 $r=0.968$ と高い正の相関性が認められた。Passing-Bablok法の回帰による傾きは1.02であった。

血清100症例を用いて、エクルーシス（X軸）とアボット（Y軸）における25-OHD濃度を比較した（Fig. 2b）。Spearmanの相関係数は、 $r=0.972$ と高い正の相関性が認められた。Passing-Bablok法の回帰による傾きは1.13であった。

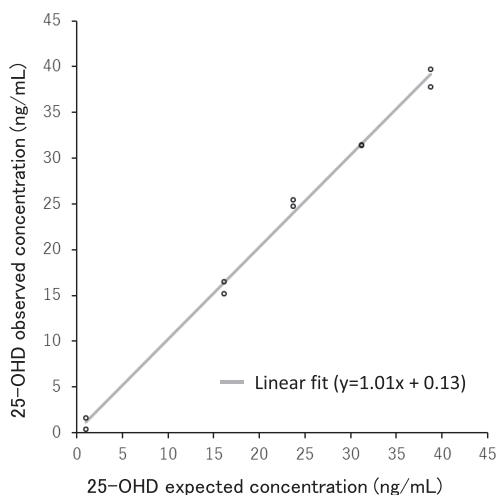


Fig. 1 Dilution linearity

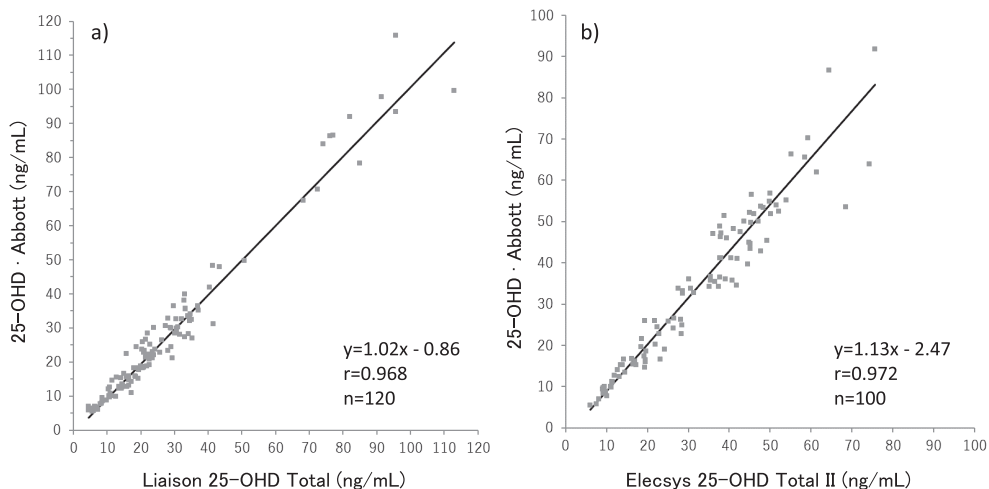


Fig. 2 Correlation of serum total 25-OHD concentrations between Abbott and other commercially available products

3. 日本人健診者の測定値

除外基準に該当した症例を除き、夏季123例（男性78例、女性45例）、冬季140例（男性66例、女性74例）、総数263例（平均年齢49歳、最少～最高；28～75歳）の検体を測定した結果、血清総25-OHD濃度は平均値16.1 ng/mL、中央値

15.1 ng/mLであった。2.5 %tileは7.1 ng/mL、ならびに97.5 %tileは31.8 ng/mLであった。アボット 25-OHD濃度の頻度の季節分布をFig. 3に示した。最小値は5.5 ng/mL、最大値は35.5 ng/mLで、全体の74.5 %が20 ng/mL以下および全体の97.0 %が30 ng/mL以下であった（Table 2, Fig. 3）。

Table 2 Seasonal variations of serum total 25-OHD concentration in healthy subjects

Season	Gender	25-OHD concentration (ng/mL)						Ratio (%)	
		Mean (SD)	Median	Minimum	Maximum	2.5 %tile	97.5 %tile	< 30 ng/mL	< 20 ng/mL
Year-round	All (n=263)	16.1 (6.1)	15.1	5.5	35.5	7.1	31.8	97.0	74.5
	Men (n=144)	18.5 (6.2)	18.3	6.2	35.5	8.5	33.1	94.4	63.2
	Women (n=119)	13.3 (4.7)	12.9	5.5	28.2	6.5	23.5	100.0	88.2
Summer	All (n=123)	18.9 (6.2)	18.7	5.9	35.5	8.1	33.3	94.3	57.7
	Men (n=78)	20.9 (6.0)	20.3	9.6	35.5	11.1	34.5	91.0	46.2
	Women (n=45)	15.4 (5.1)	14.8	5.9	28.2	7.5	25.5	100.0	77.8
Winter	All (n=140)	13.7 (5.0)	13.1	5.5	32.2	6.5	25.8	99.3	89.3
	Men (n=66)	15.6 (5.3)	15.1	6.2	32.2	7.6	27.3	98.5	83.3
	Women (n=74)	12.1 (4.0)	11.0	5.5	25.7	6.5	20.5	100.0	94.6

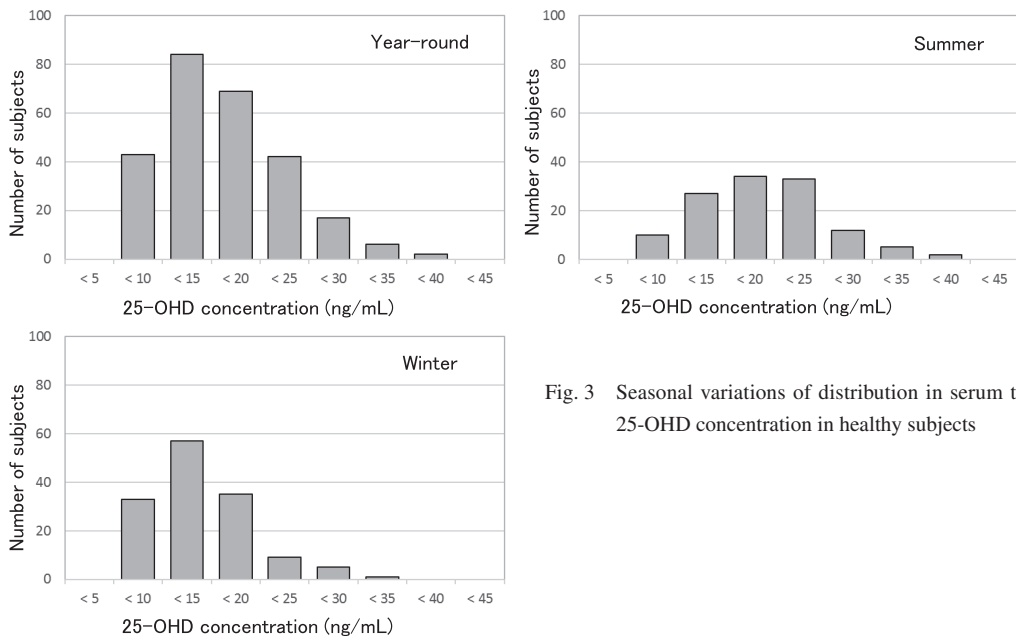


Fig. 3 Seasonal variations of distribution in serum total 25-OHD concentration in healthy subjects

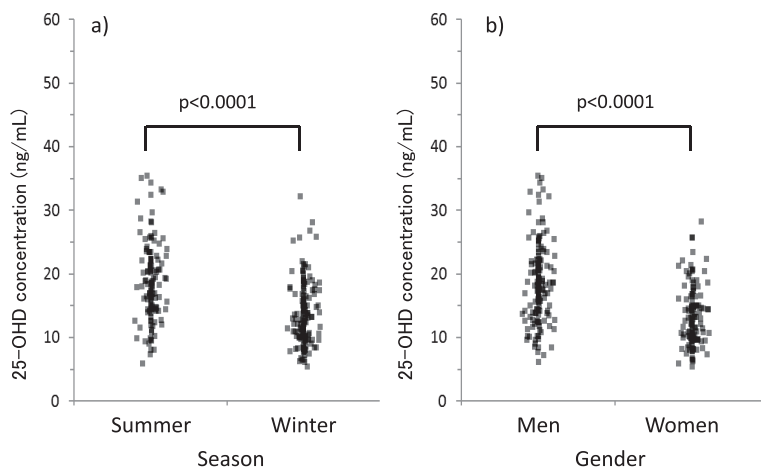


Fig. 4 Comparison by season (a) and by gender (b) of distribution in serum total 25-OHD concentration

季節間では、夏季の中央値が18.7 ng/mLであったのに対し、冬季の中央値は13.1 ng/mLであり、冬季が有意に低値であった (Fig. 4a)。また本検討では、男性の中央値が18.3 ng/mLであったのに対し、女性の中央値は12.9 ng/mLであり、女性が有意に低値であった (Fig. 4b)。

#### Ⅳ. 考察

25-OHビタミンD・アボット試薬の再現性および希釈直線性は良好であり、感度に関しても十分な性能を有していることが示された。また、相関性試験により、既存製品との良好な相関が得られたことから、日常検査において既存製品と同様に適用できると考えられた。

日本人健常者の血清総25OHD濃度を測定した結果、季節変動ならびに性差が顕著に示された。季節変動は日照時間の差が考えられるが、一方で性差が認められるのは、25-OHDが貯蔵される脂肪細胞が女性に多い以外にも近年UVカットの化粧品が流行していることも一因と考えられる。Nanriら<sup>17)</sup>は北九州(北緯33.4-33.5度)の市職員の健診受診者において、季節変動(2006年7月と11月)と性差を検討し、冬季は夏季に比べ低値を、いずれの季節においても女性の方が男性より低値を示したことを報告した。男性では7月および11月の25-OHD値がそれぞれ28.0 ng/mLおよび22.9 ng/mL、女性では7月および11月の25-OHD値がそれぞれ26.3 ng/mLおよび19.4 ng/mLと我々の結果より全体的に高値ではある

が、傾向は同様であった。今回の通年の測定結果を「ビタミンD不足・欠乏の判定指針」の判定基準<sup>16)</sup>と比較すると、90%以上の症例がビタミンD非充足状態とされている30 ng/mL未満であり、更に50%以上の症例がビタミンD欠乏とされている20 ng/mL未満という結果となった。Yoshimuraらは<sup>18)</sup>変形性関節症/骨粗鬆症に関する研究(ROAD:2005-2007年)において、東京都(北緯35.8度)および和歌山県(北緯33.6-33.9度)の1683例(男性595例、女性1088例)を用いて一般集団におけるビタミンD欠乏症の有病率を調査した。その結果、すべての対象者の81.3%がビタミンD非充足状態であり、その割合は男性(72.1%)に比べ女性(86.3%)で高かった。なお、我々の結果の方が若干高い割合ではあったが、多くの日本人がビタミンD非充足状態である結果は同様であった。なお、Yoshimuraらの検討は10月から1月に行われ、10月26.2 ng/mL、11月23.9 ng/mL、12月23.1 ng/mLおよび1月22.0 ng/mLと、月毎の25-OHD濃度を報告しており、短期間においても季節変動があることも見出している。また、Mithal Aら<sup>19)</sup>は血清総25OHD濃度を世界各国で調査した内容をまとめている。結論として、アジア、ヨーロッパ、中東、アフリカ、ラテンアメリカ、北アメリカおよびオセアニアの地域によって総血清25OHD濃度の非充足状態の定義は異なるが、研究された世界のほとんどすべての地域においてビタミンD非充足状態の蔓延を示し、年齢、性別、民族、緯度、衣服、栄養、肌の色素

沈着、文化的慣習、および生活状況といった様々な要因が複合的に関与していることを報告している。

以上より、本結果は先行研究と相違しない結果であり、多くの日本人がビタミンD非充足状態（欠乏または不足）にあることが推測された。

製造元であるAbbott LaboratoriesはVDSCPおよびVDSPに参加して、25-OHD測定の高品質管理および標準化に努めている。一方、日本臨床化学会栄養専門委員会から報告された自動分析法による血清総25OHD測定の標準化の検討では、我が国における自動分析法の血清総25OHD測定の標準化は達成されておらず、自動分析法の特性を周知したうえでのビタミンD栄養の評価を啓発したいと述べられていることから<sup>20)</sup>、本試薬の特性を理解したうえでの使用が推奨される。

## V. 結語

25-OHビタミンD・アボット試薬の基礎的な性能は良好であった。日本人健常者の90%以上の症例がビタミンD非充足状態とされている30 ng/mL未満であることから、国内においても、海外と同様にビタミンD欠乏の高リスク群を対象としたスクリーニングが望まれる。

## COI

COI 報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

## 文献

- 1) Pilz S, Tomaschitz A, Ritz et al: Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol*, 6: 621-630, 2009.
- 2) Hyponen E, Power C: Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr*, 85: 860-868, 2007.
- 3) Souberbielle JC, Friedlander G, Kahan A et al: Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine*, 73: 249-253, 2006.
- 4) Cavalier E, Delanaye P, Chapelle JP et al: Vitamin D:

- current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med*, 47: 120-127, 2009.
- 5) Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA et al: Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 1911-1930, 2011.
- 6) Andress DL: Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int*, 69: 33-43, 2006.
- 7) Kovacs CP, Kalantar-Zadeh K: Vitamin D receptor activation and survival in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 73: 1355-1363, 2008.
- 8) Moncrieff MW, Lunt HRW, Arthur LJH: Nutritional rickets at puberty. *Arch Dis Child*, 48: 221-224, 1973.
- 9) Preece MA, Ford JA, McIntosh WB et al: Vitamin-D deficiency among Asian immigrants to Britain. *Lancet*, 1: 907-910, 1973.
- 10) Holick MF: Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, 116: 2062-2072, 2006.
- 11) 日本小児内分泌学会: ビタミンD欠乏性くる病・低カルシウム血症の診断の手引き, 2013.
- 12) Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357: 266-281, 2007.
- 13) Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC et al: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*, 84: 18-28, 2006.
- 14) Grant WB, Boucher BJ: Current impediments to acceptance of the ultraviolet-B-vitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res*, 29: 3597-3604, 2009.
- 15) Pilz S, Dobnig H, Fischer JE et al: Low vitamin D level predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke*, 39: 2611-2613, 2008.
- 16) 一般社団法人日本内分泌学会、一般社団法人日本骨代謝学会、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: ビタミンD不足・欠乏の判定指針. *Folia endocrinologica Japonica*, 93 Suppl, 2017.
- 17) Nanri A, Foo LH, Nakamura K et al: Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and season-specific correlates in Japanese adults. *J Epidemiol*, 21: 346-353, 2011.
- 18) Yoshimura N, Muraki S, Oka H et al: Profiles of vitamin D insufficiency and deficiency in Japanese men and women: association with biological, environmental, and nutritional factors and coexisting disorders: the ROAD study. *Osteoporos Int*, 24: 2775-2787, 2013.
- 19) Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP et al: Global vitamin

## 生 物 試 料 分 析

- D status and determinants of hypovitaminosis D.  
Osteoporosis Int, 20: 1807-1820, 2009.
- 20) 渭原 博、木内 幸子、西村 基、他：自動分析  
法による血清総25ヒドロキシビタミンD測定値  
の標準化に関する現状調査. 臨床化学、47：  
413-424、2018.