

新生児・乳児のビタミンD 補充必要性の評価  
-LC-MS/MS による検討-

慶應義塾大学病院小児科教室 助教

はら かわり  
原 香織

新生児・乳児のビタミン D 補充必要性の評価  
-LC-MS/MS による検討-

慶應義塾大学医学部 調査研究者氏名 (代表) 原 香織

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部小児科学教室  
電話：03-3353-1211

**【要旨】**

本研究では、ビタミン D 測定ゴールドスタンダードである液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、国内で初めて新生児・乳児及びその母親の血清 25 hydroxyvitamin D (25(OH)D) 濃度を測定し、ビタミン D 体内動態の評価を行った。

1 か月健診に来院した正期産児の血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は、192 例中 102 例 (53.1 %) で測定感度未満 (<4 ng/ml) であった。完全母乳栄養群では混合栄養群に比し、血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は有意に低かった。従来法を用いた過去の報告、成人での基準範囲 (5.1-41.4 ng/mL) よりも更に低い結果であり、乳児におけるビタミン D 欠乏がより深刻である事が示唆された。

正常単胎褥婦における血清 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は 205 例中 8 例 (4 %) で測定感度未満であった。また、97% が現在最も多く用いられているビタミン D 欠乏の基準 (25(OH)D < 20 ng/mL) を満たしていた。

LC-MS/MS と従来法 (RIA) の方法間比較も行った。生後 3 か月までの正期産児において、RIA による測定は、加算誤差及び比例誤差を示した。正常単胎褥婦においても、RIA による測定は、加算誤差を示した。これらの結果から、従来法では血清 25(OH) D 濃度を過大評価していた可能性が示唆された。

以上の結果から、国内における乳幼児及びその母親のビタミン D 欠乏は深刻な状況にある事が示唆された。天然型ビタミン D 単剤の保険適用薬がない日本において、現状を改善するためには、母児に対する的確な栄養指導はもちろん、新生児・乳児が服用可能な液状ビタミン D の一般医薬品 (たとえば BabyD 等) の開発、普及を進めていく事が重要と考える。

**1. 調査研究目的・背景**

近年、乳幼児及びその母親のビタミン D 欠乏は世界的な問題となってきた。

ビタミン D はカルシウム代謝調節に関わる脂溶性ホルモンである。主に皮膚の生合成

に由来する動物性のビタミン D3 と植物性のビタミン D2 が存在する。ビタミン D 欠乏症の診断には 25 hydroxyvitamin D (25(OH)D) 濃度、すなわち 25(OH)D2 と 25(OH)D3 の総和が測定される。従来、血清 25(OH)D 濃度は、抗体法 (RIA) または競合タンパク法 (CPBA) により測定されていた。しかし、これらには、① 25(OH)D2 と 25(OH)D3 の未分離、② エピ異性体を含む種々のビタミン D 代謝物による干渉 1, 2 といった課題があった。

液体クロマトグラフタンデムマス型質量分析計 (LC-MS/MS) は、① 25(OH)D2、25(OH)D3、及びそのエピ異性体である 3-epi-25(OH)D3 を分離できる、② 25(OH)D3 とその他のビタミン D 代謝物を分離できるといった特徴を持つ。本法は、25(OH)D2 と 25(OH)D3 を正確に定量できる方法として、ビタミン D 測定のゴールドスタンダードとなっている<sup>3</sup>。

本研究では、この LC-MS/MS を用いて、国内で初めて新生児・乳児のビタミン D 欠乏状態を正確に把握する事を目的とする。保険適応がない現状において、本研究の成果は、新生児・乳児が服用可能な一般用医薬品 (BabyD 等) の普及につながると期待できる。

## 2. 調査研究方法

慶應義塾大学病院及び関連施設で入院中あるいは健診時に採血を必要とした健常新生児・乳児及びその母親を対象とした。同意を得られた患者の残検体を使用し、LC-MS/MS により、血清 25 (OH) D 濃度を測定した。また、血清 Ca、P、ALP、intact PTH、1, 25 dihydroxyvitamin D (1,25(OH)2D) の濃度も同時に測定し、ビタミン D の欠乏状態を評価した。さらに、抗体法 (RIA) を用いて血清 25 (OH) D 濃度を測定し、LC-MS/MS の測定結果と比較した。検査結果から、以下の解析を行った。

### ① 1 か月健診に来院した正期産児の血清 25(OH)D3 定量的評価

完全母乳栄養群と混合栄養群における 25(OH)D3 濃度を Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。また、生年月日に基づき、各月の 25(OH)D3 濃度を Steel-Dwass 法で比較した。

### ② 正常単胎褥婦の血清 25(OH)D3 定量的評価

36 週以降に分娩となった正常単胎褥婦を対象とした。採血日に基づき、各月の 25(OH)D3 濃度を Steel-Dwass 法で比較した。

### ③ 生後 3 か月までの乳児における RIA と LC-MS/MS の方法間比較

### ④ 正常単胎褥婦における RIA と LC-MS/MS の方法間比較

血清 25(OH)D 濃度を RIA と LC-MS/MS 両方法で測定し、Bland-Altman 分析で 2 つの測定値の平均値と差 (RIA-LC-MS/MS) を解析した。

## 3. 調査研究成果

### 3-1. 1 か月健診に来院した正期産児の血清 25(OH)D 定量的評価

25(OH)D3 濃度は、192 例中 102 例 (53.1 %: 95% 信頼区間 45.8-60.3%) で測定感度未満 (<4 ng/ml) であった (図 1)。25(OH)D2、3-epi-25(OH)D3 濃度は、全例で測定感度未満であった。

全例無症状で、低 Ca 血症は認めなかった。25(OH)D3 濃度は、完全母乳栄養群では混合栄養群に比し、有意に低かった (図 2)。各月の 25(OH)D3 濃度は有意差を認めなかった。

### 3-2. 正常単胎褥婦の血清 25(OH)D 定量的評価

採血日は産褥 1-7 日目 (中央値 3) であった。25(OH)D3 濃度は 205 例中 8 例 (3.9%: 95% 信頼区間 1.7-7.5%) で測定感度未満であった (図 3)。205 例中 199 例 (97.1%: 95% 信頼区間 93.7-98.9%) が 20 ng/mL 未満であった。全例無症状であった。25(OH)D3 濃度と intact PTH 濃度には負の相関がみられた。8 月の 25(OH)D3 濃度は 1-4 月に比して有意に高かった (図 4)。

### 3-3. 生後 3 か月までの正期産児における RIA と LC-MS/MS の方法間比較

採血日齢は 3-71 (中央値 30) であった。140 検体中 138 検体で、RIA の測定値は LC-MS/MS の測定値よりも高値であった。RIA-LC-MS/MS は  $5.9 \pm 4.1$  ng/mL (95% 信頼区間 5.3-6.6) であり、加算誤差を認めた。回帰式は  $r=0.53$ ,  $p<0.01$  であり、比例誤差を認めた (図 5)。なお、採血日齢と RIA-LC-MS/MS に一定の関係はみられなかった。

### 3-4. 正常単胎褥婦における RIA と LC-MS/MS の方法間比較

採血日は産褥 1-6 日目 (中央値 3) であった。120 検体中 116 検体で、RIA の測定値は LC-MS/MS の測定値よりも高値であった。RIA-LC-MS/MS は  $4.5 \pm 2.4$  ng/mL (95% 信頼区間 4.0-4.9) であり、加算誤差を認めた。回帰式は  $r=0.13$ ,  $p=0.15$  であり、比例誤差は認められなかった (図 6)。なお、採血日と RIA-LC-MS/MS に一定の関係はみられなかった。

## 4. 考察

本研究は、LC-MS/MS を用いて新生児・乳児及びその母親の 25(OH)D 濃度測定を行った国内で初めての研究である。

1 か月児の 25(OH)D3 濃度は、半数以上で 4 ng/mL 未満であった。LC-MS/MS による成人 80 例の報告では、基準範囲は 5.1-41.4 ng/ml で 4 ng/ml 未満となるものはみられていない<sup>4</sup>。また、従来法を用いた頭蓋瘻合併の 1 か月健診児における検討では、完全母乳栄養児の 25(OH)D 濃度は、17% で 5 ng/ml 未満であった<sup>5</sup>。本研究では、無症状の 1 か月児の 25(OH)D3 濃度は、半数以上で 4 ng/mL 未満となり、従来報告よりも明らかに低値である事が示された。また、完全母乳栄養児では混合栄養児に比して、25(OH)D3 濃度は有意に低値であり、従来法を用いた過去の報告と矛盾しない結果であった<sup>5</sup>。これは、母乳中のビタミン D3 濃度が人工乳中の約 1/3 しかない事に起因していると考えられる。したがって、特に母乳栄養児ではビタミン D 欠乏により注意が必要である。成人における報告では、25(OH)D3 濃度は日照時間を反映し、冬に比して夏に高いという季節性がみられていたが

6,7, 1 か月児において季節性はみられなかった。日本においては、生後1 か月までは外出を控えて自宅で過ごすよう指導している施設が多く、季節による日光暴露の差がないため、季節性が確認できなかったと考えられる。

正常単胎褥婦の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は、4% で 4 ng/mL 未満であった。本法導入後に測定してきた健常成人の結果では、9800 例中 120 例 (1.2%) が 4 ng/mL 未満であった。褥婦では、健常成人に比して血清 25HD<sub>3</sub> 濃度が 4 ng /mL 未満となる頻度が多いと考えられる。また、97% が現在最も多く用いられている成人におけるビタミン D 欠乏の診断基準 (< 20 ng/mL) を満たしており、褥婦のほとんどがビタミン D 欠乏状態にある可能性が示唆された。また、抗体法を用いた過去の報告 6, 7, 8 と同様に、LC-MS/MS を用いた本研究においても、25OHD<sub>3</sub> と intact PTH には負の相関がある事、夏季に高いという季節性が存在する事が確認された。

検索し得る限り、無治療の新生児における RIA と LC-MS/MS の比較を行った報告はない。本研究は、新生児・乳児の RIA による 25(OH)D 測定は、加算誤差、比例誤差を認める事を初めて明らかにした。これは、RIA で用いられる抗体が、3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> をはじめとする種々のビタミン D 代謝産物と交差反応してしまった結果と考えられる。

健常成人では、RIA と LC-MS/MS の結果は有意差がない事が報告されている<sup>4</sup>。しかしながら、本研究では褥婦において、RIA による 25(OH)D 測定は、加算誤差を認めた。ビタミン D 代謝物が原因であれば、新生児・乳児と同様に比例誤差も認めるはずであるが、褥婦において、比例誤差は認められなかった。したがって、健常成人よりも褥婦の血中に多く存在するビタミン D 代謝物以外の未知の物質、たとえば、褥婦で高値を示す事が知られているプロゲステロンなどのステロイド代謝産物による交差反応による影響が考えられた。

方法間比較の結果、新生児・乳児及びその母親において、RIA による測定は偽高値を示す事が明らかとなった。従来法では 25(OH)D 濃度を過大評価してしまっていた可能性、ビタミン D 欠乏が過去の報告よりもより深刻である可能性が示唆された。

なお、本研究の限界として、25(OH)D<sub>3</sub> 濃度の測定感度が 4 ng/mL である事が挙げられる。この為、4 ng/mL 未満の値を全て 4 ng/mL として統計処理せざるを得なかった。本研究で用いた LC-MS/MS 測定系の定量下限 (LOQ) は、ノイズに対する分析対象成分シグナルの比率、シグナル/ノイズ比 (S/N 比) に基づいて設定されている。本測定系では、S/N 比 = 10 となる濃度を定量下限として設定しており、これが 4 ng/mL に相当する為、4 ng/mL 未満の濃度を測定する事はできなかった。現在、より低濃度の検体も測定もできるよう、誘導体化してイオン化強度を上げるなどの取り組みを行っている。

## 5. まとめ

LC-MS/MS を用いて、新生児・乳児及びその母親の 25(OH)D 濃度を理論的に正しく測定した結果、新生児・乳児の 25(OH)D<sub>3</sub> 濃度は約半数で測定感度未満である事、褥婦のほとんどがビタミン D 欠乏の診断基準を満たす事、従来法 (RIA) による測定は偽高値を示す事

が国内で初めて明らかとなった。欧米諸国と異なり、現在日本には天然型ビタミンD単剤の保険適用薬が存在しない。現状を改善するためには、新生児・乳児が服用可能な液状ビタミンDの一般医薬品(たとえばBabyD等)の開発、普及を進めていく事が重要と考える。

## 6. 調査研究発表

<学会発表>

- 第60回新生児成育医学会

「1か月健診に来院した完全母乳栄養児のLC-MS/MSによる血清25(OH)D定量的評価」

原香織、池田一成、長谷川奉延

慶應義塾大学医学部小児科学教室

日本新生児成育医学会雑誌: 2015; 27 (3): 161

- 第61回新生児成育医学会

「正常単胎褥婦のLC-MS/MSによる血清25(OH)D定量的評価」

原香織、池田一成、長谷川奉延

慶應義塾大学医学部小児科学教室

日本新生児成育医学会雑誌: 2016; 28 (3): 216.

「正常単胎褥婦のLC-MS/MSによる血清25(OH)D定量的評価 -RIAとLC-MS/MSの比較-」

原香織、池田一成、長谷川奉延

慶應義塾大学医学部小児科学教室

日本新生児成育医学会雑誌: 2016; 28 (3): 216.

- 第52回日本周産期・新生児医学会

「生後3か月までの正期産児の血清25(OH)D定量的評価 -RIAとLC-MS/MSの比較-」

原香織、池田一成、長谷川奉延

慶應義塾大学医学部小児科学教室

日本周産期新生児学会雑誌: 2016; 52 (2): 554.

- The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Society

「Serum 25-Hydroxyvitamin D3 levels of one-month-old term infants in Tokyo using liquid chromatography tandem mass spectrometry.」

Kaori Haral<sup>1</sup>), Kazushige Ikeda<sup>1</sup>), Tomonobu Hasegawa<sup>1</sup>), Yuhei Koyama<sup>2</sup>), Yasuhiro Wada<sup>2</sup>)

1) Keio University School of Medicine Department of Pediatrics

2) LSI Medience Corporation Medical Solution Segment

- 第10回新生児内内分泌研究会学術集会

「1か月健診に来院した正期産児のLC-MS/MSによる血清25(OH)D定量的評価」

原香織、池田一成、長谷川奉延

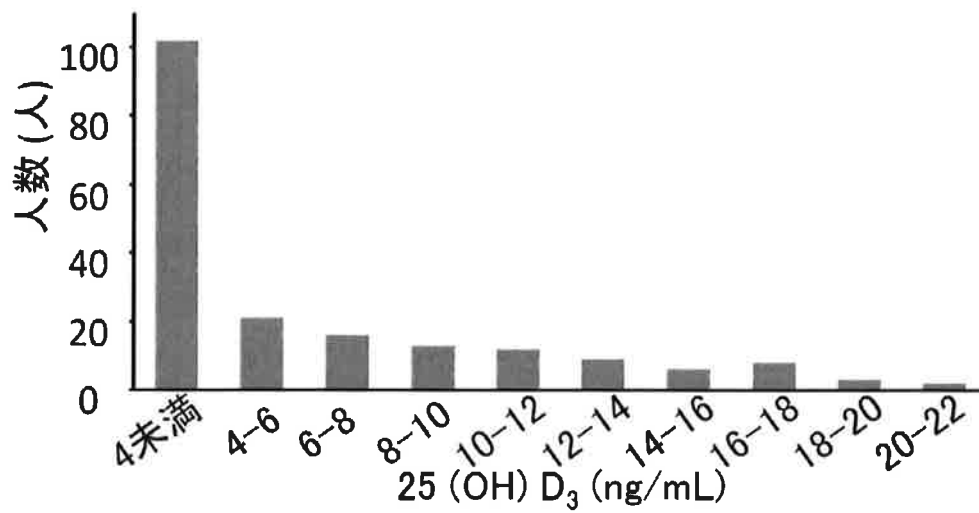
慶應義塾大学医学部小児科学教室

<論文投稿>

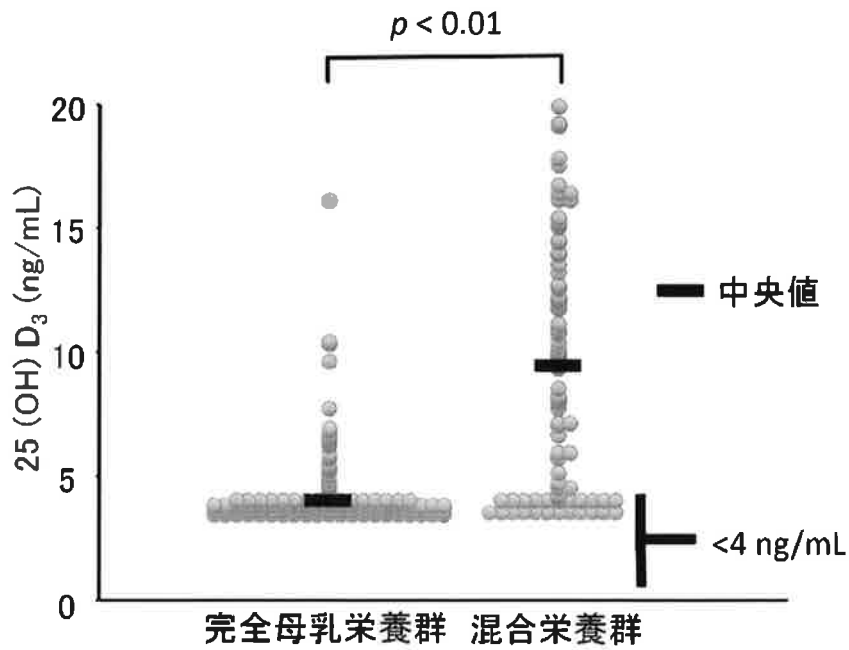
Kaori Hara, Kazushige Ikeda, Tomonobu Hasegawa, Yuhei Koyama, Yasuhiro Wada. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels of one-month-old term infants in Tokyo using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Journal of Pediatrics* (in submission).

## 7. 引用文献

1. Ben Schottker, Eugene H. J. M. Jansen, Ulrike Haug, Lutz Schomburg, Josef Kohrle, et al. Standardization of misleading immunoassay based 25-hydroxyvitamin D levels with liquid chromatography tandem-mass spectrometry in a large cohort study. *PLoS ONE* 7 (11): e48774.
2. Johannes M. W. van den Ouweland, Antonius M. Beijers, Henny van Daal, Marc G. L. M. Elisen, Gerard Steen, et al. Evaluation of 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 cross-reactivity in the Roche Elecsys vitamin D total protein binding assay. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52 (3): 373-380.
3. Dietrich A. Volmer, Luana R.B.C. Mendes, Caroline S. Stokes. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrometry Reviews* 2015; 34: 2-23.
4. Amy K. Saenger, Thomas J. Laha, Deborah E. Bremner, Sayed M. H. Sadzadeh. Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D2 and D3 using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 914-920.
5. Junko Yorifuji, Tohru Yorifuji, Kenji Tachibana, Shizuyo Nagai, Masahiko Kawai, Toru Momoi, et al. Craniotabes in normal newborns: the earliest sign of subclinical vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (5): 1784-88.
6. Kazutoshi Nakamura, Mitsue Nashimoto, Masaharu Yamamoto. Summer/winter differences in the serum 25-hydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone levels of Japanese women. *Int J Biometeorol* 2000; 44: 186-9.
7. Yasunaga Ono, Atshushi Suzuki, Motoko Kotake, Xiaoli Zhang, Keiko Nishiwaki-Yasuda, Yoko Ishiwata et al. Seasonal changes of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels in a normal Japanese population. *J Bone Miner Metab* 2005; 23: 147-51.
8. 中山聡一郎、加地剛、安井敏之、七條あつ子、米谷直人他. 日本人正常単胎妊婦における血中および臍帯血 25(OH)D3 濃度と季節変動. *日本周産期・新生児学会雑誌* 2016; 52 (2): 648.

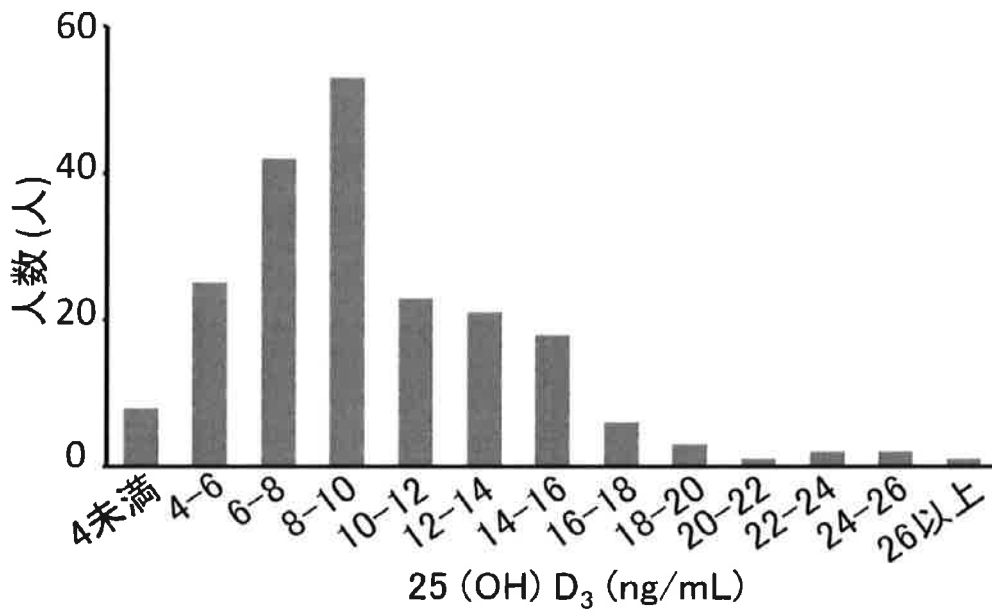


【図1】1か月健診に来院した正期産児の血清 25(OH)D<sub>3</sub>濃度

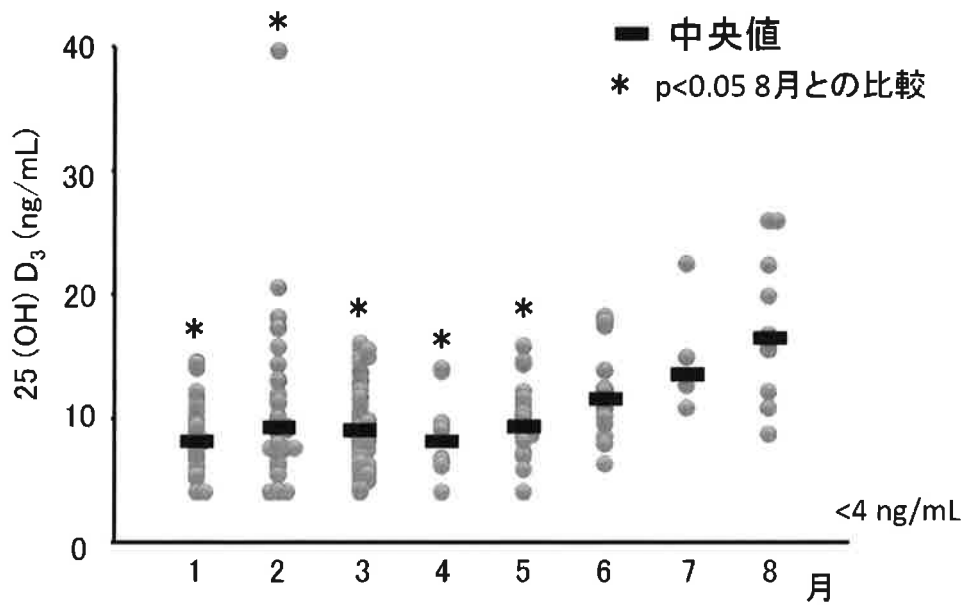


【図2】完全母乳栄養群と混合栄養群における血清 25(OH)D<sub>3</sub>濃度

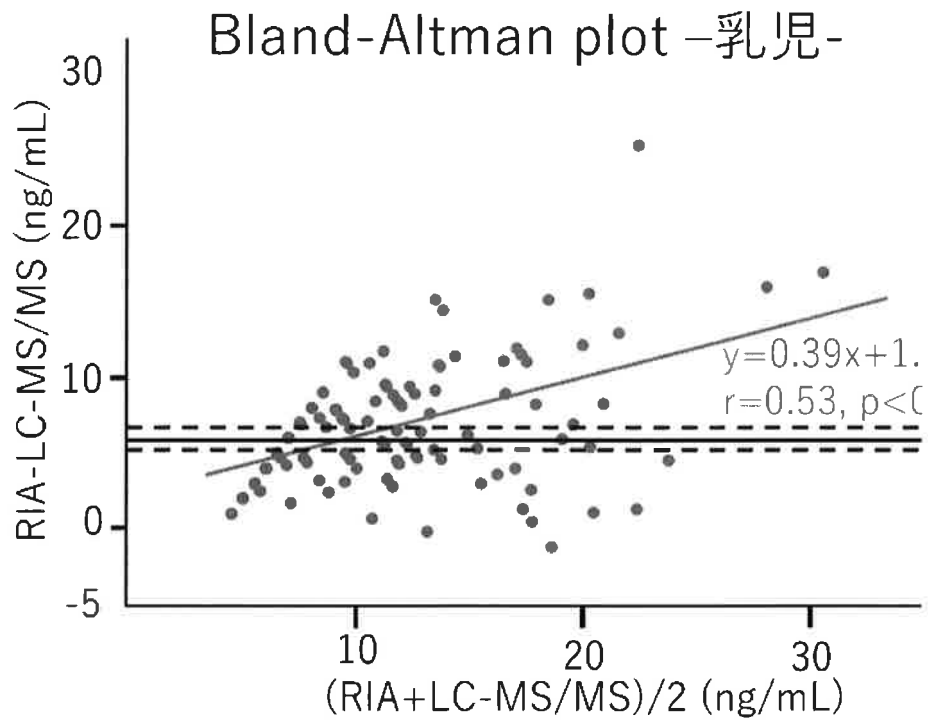




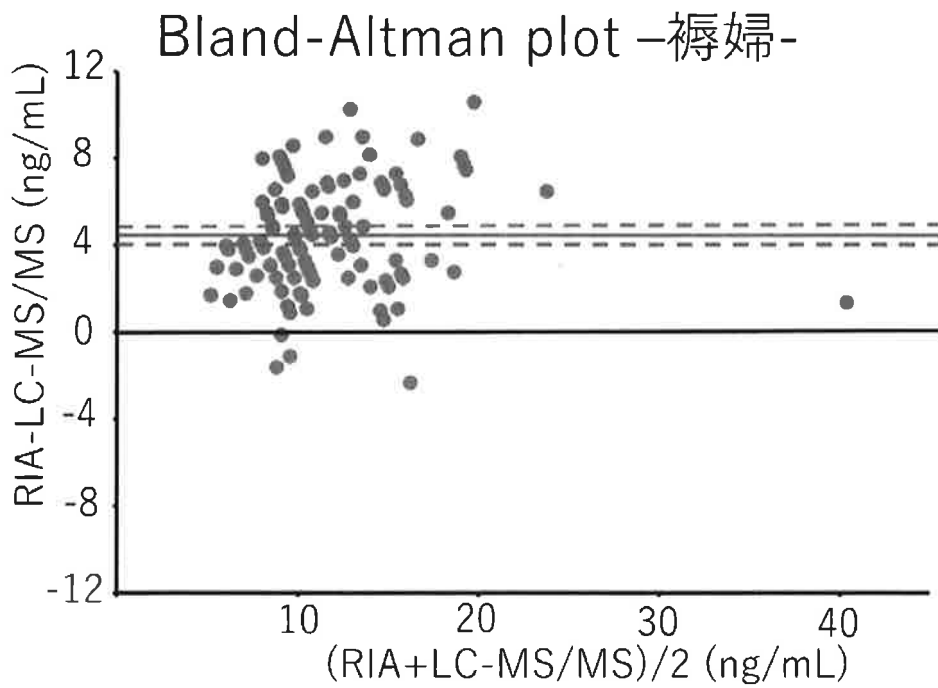
【図3】正常単胎褥婦の血清 25(OH)D<sub>3</sub>濃度



【図4】各月の血清 25(OH)D<sub>3</sub>濃度



【図5】 生後3か月までの正期産児におけるRIAとLC-MS/MSの比較



【図6】 正常単胎褥婦におけるRIAとLC-MS/MSの比較