

トピックス

新たな臨床的ビタミン D バイオマーカーについて

A new clinical biomarker of vitamin D

はじめに

ビタミン D の不足・欠乏は、日本のみならず世界的にも問題とされている¹⁾。ビタミン D の主たる働きは、カルシウム・リンの腸管からの吸収を促進することによる、骨・カルシウム代謝調節がある。これ以外にも、ビタミン D の不足・欠乏が、心血管疾患、自己免疫疾患、神経精神疾患、内分泌疾患などの発症や進行に関連することが、臨床研究や疫学研究でも報告されている。これに伴い、血中のビタミン D 濃度測定の需要も高まっている²⁾。

ビタミン D の栄養状態の最も良いバイオマーカーとして、一般的に 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] が用いられており、世界的にもコンセンサスが得られている。しかし、測定法によっては 25(OH)D 以外の種々の代謝物が含まれることもある³⁾。一方、25(OH)D 以外のビタミン D 代謝物のバイオマーカーとしての有用性を示唆するレビューも報告されている²⁾。本トピックス

では、従来ビタミン D 栄養状態の指標として用いられてきた 25(OH)D を含む、その他のビタミン D 代謝物の特徴と臨床的意義について紹介する。

ビタミン D の代謝経路

図 1 に示すように、ビタミン D は、食事から摂取したビタミン D₂ 及び D₃、あるいは皮膚で作られたビタミン D₃ は、血中のビタミン D 結合タンパク質 (VDBP) に結合して肝臓に運ばれ、シトクロム P450 (P450, CYP) スーパーファミリーの CYP2R1 ないしは CYP27A1 により 25 位が水酸化される。これにより 25(OH)D が生成され、25(OH)D は VDBP に結合して血中を流れる。腎臓に到達した VDBP は腎近位尿細管のメガリンに結合し、細胞内に取り込まれる。VDBP と共に細胞内に取り込まれた 25(OH)D は CYP27B1 により 1 α 位が水酸化され、活性型 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] が生成される⁴⁾。そして、1,25(OH)₂D は様々な組織で発現するビタミン D 受容体 (VDR) に結合して作用を示す。VDR に活性型ビ

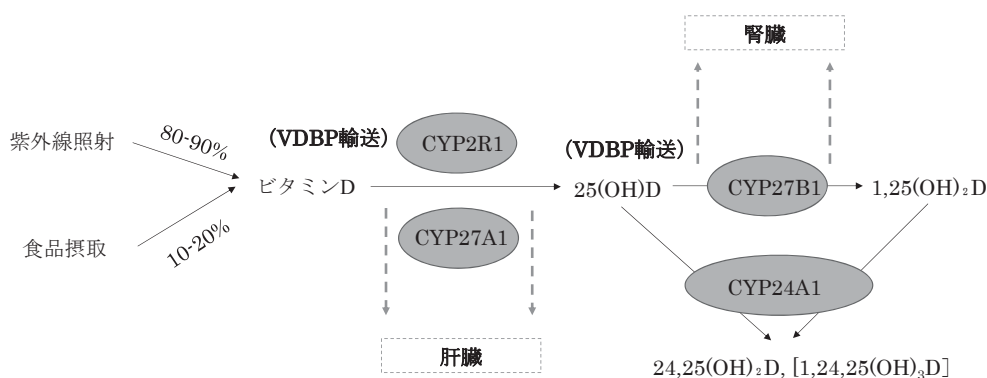


図 1 体内におけるビタミン D の生成および代謝

食品から摂取したビタミン D および皮膚で作られたビタミン D₃ は、ビタミン D 結合タンパク質 (VDBP) に結合して肝臓に運ばれ、肝臓で CYP2R1 あるいは CYP27A1 (CYP2R1 が主) より 25 位が水酸化され、25(OH)D が生じる。生じた 25(OH)D は VDBP に結合してさらに腎臓に運ばれ、腎臓で CYP27B1 により 1 α 位が水酸化され、活性型 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] が生じる。血中カルシウム濃度が正常または高い場合は、不活性型 24,25-dihydroxyvitamin D [24,25(OH)₂D] 及び 1,24,25-trihydroxyvitamin D [1,24,25(OH)₃D] へと代謝される。

タミンDが結合すると、不活性化酵素であるCYP24A1の著しい転写誘導が起こる⁵⁾。CYP24A1により、25(OH)Dは24,25-dihydroxyvitamin D [24,25(OH)₂D], 1α,25(OH)₂Dは1,24,25-trihydroxyvitamin D [1,24,25(OH)₃D]へと代謝される。

25(OH)D

血清中の25(OH)Dは、体内のビタミンDの大部分を占め、血中で安定的に存在し、かつ半減期も長いいため、ビタミンD状態を評価するための最適なバイオマーカーと考えられている⁶⁾。臨床現場では、血清や血漿中の25(OH)Dの測定に、電気化学発光免疫測定(ECLIA)法、化学発光酵素免疫測定(CLEIA)法などが用いられている。しかし、ECLIA法とCLEIA法では25(OH)D以外のビタミンD代謝産物との交差反応により、特異性に欠けることがある。例えば、3-epi-25(OH)D₃や24,25(OH)₂D₃との交差反応が挙げられる。またビタミンD₂が栄養補助食品として摂取されている場合、見かけの25(OH)D濃度に対する25(OH)D₂濃度の寄与を過小評価することがある⁷⁾。一方、ゴールドスタンダード法の液相クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)法では、25(OH)D₂、25(OH)D₃、3-epi-25(OH)D₃、24,25(OH)₂D₃を正確に分離測定できる³⁾。ただし、LC-MS/MSで分離測定した代謝物質濃度であっても、臨床または研究でも、各代謝物を足し合わせて、total 25(OH)D濃度としてビタミンD栄養状態

の評価に用いられる場合も多い。

また、25(OH)D濃度については、遊離型25(OH)Dの臨床的有用性を示唆する報告もある。血清中の大部分の25(OH)Dは、85%がVDBP(ビタミンD結合タンパク質)および15%がアルブミンと結合している⁸⁾。ビタミンDも他のステロイドホルモンと同様、遊離部分のみが細胞内に入り、生物学的な効果を発揮すると考えられている。そのため、遊離型25(OH)D濃度は、従来の25(OH)D測定よりも優れたビタミンD活性のマーカーになる可能性があるという報告もある⁹⁾。特に、遊離型25(OH)D濃度での評価が望ましいと考えられる対象者のひとつとして妊婦が挙げられる。VDBPの発現は、エストロゲンによって増加し、妊娠や経口避妊薬の使用によりVDBPの生成が増加する¹⁰⁾。そのため、妊娠中はVDBPレベルの上昇による見かけ上の25(OH)D濃度の上昇が起こる¹¹⁾。また、慢性腎臓病(CKD)患者では、VDBPやアルブミン、これらのタンパク質と結合したビタミンD代謝物が尿中に失われやすいため、血中25(OH)D濃度も低値となる。つまり、VDBPの血清濃度の変動は、25(OH)Dのレベルに影響を与えるため、妊婦、CKD患者以外にも血液透析患者、肝不全患者といったタンパク質の代謝変動の大きい対象者で、遊離型25(OH)D濃度が、従来の25(OH)D濃度よりも適切なビタミンD栄養状態の指標となることが考えられる¹²⁾。しかしながら、健常人の血清25(OH)Dのうち遊離型は0.1%未満である。そのため、

表1 血清ビタミンDバイオマーカーの特徴

血清ビタミンD バイオマーカー	25(OH)D, 遊離型25(OH)Dまたは 生物利用可能な25(OH)D	1,25(OH) ₂ D	VMR [24,25(OH) ₂ D/25(OH)D]
特徴	25(OH)Dは、血中で最も多いビタミンD代謝物であり、ビタミンD貯蔵量の指標として有用である。 遊離型25(OH)D濃度は、妊婦、CKD患者など、タンパク質代謝変動の大きい対象者で、従来の25(OH)D濃度よりも適切なビタミンD栄養状態の指標である可能性がある。 遊離型25(OH)D濃度の測定は難しいため、VDBPやアルブミン値を用いて算出する生物利用可能な25(OH)Dを用いることもある。 ただし、遊離型25(OH)Dの基準値はまだ確立されていないため測定は推奨されていない。	1,25(OH) ₂ DはビタミンDの活性型である。 1,25(OH) ₂ Dの測定は、重篤な慢性小児腎疾患、遺伝性リン酸排泄異常症、癌性骨軟化症、偽性ビタミンD欠乏性くる病、ビタミンD耐性くる病、サルコイドーシスや一部のリンパ腫などの慢性肉芽腫性疾患など、非常に限られた臨床状況でのみ適用される。	24,25(OH) ₂ Dは、25(OH)Dの異化代謝物であり、両者の血中濃度には強い相関がある。 25(OH)Dと24,25(OH) ₂ Dの同時定量、もしくは24,25(OH) ₂ Dと25(OH)Dの比率(VMR)は、高カルシウム血症を鑑別診断(CYP24A1欠損症、ビタミンD過剰症、肉芽腫症等)での有用性が示されている。 また、24,25(OH) ₂ DとVMR共に、骨折リスクや死亡リスクとの関連も示唆されている。 ただし、両者の臨床意義は十分に確立されていない。

遊離型 25(OH)D 濃度の測定は難しく、生物利用可能な 25(OH)D という計算式で推定する方法もある。これは、ビタミン D 結合タンパク質 (VDBP) の濃度およびその遺伝子多型が、血液中の 25(OH)D の生物学的利用能を決定する重要な因子であるとして、これらを用いた式で求められる¹³⁾。VDBP は LC-MS/MS であれば、一定の感度と特異度を持って測定ができるが、現状では、遊離型 25(OH)D 及び VDBP の基準値は確立されていないこともあり、臨床的にはこれらの定期的な測定の有用性は十分ではないとしている。

1,25(OH)₂D

1,25(OH)₂D はビタミン D の活性型であり、VDR と結合することでその生物学的な機能を発揮する¹⁴⁾。1,25(OH)₂D の循環レベルは 25(OH)D よりもはるかに低く、半減期はわずか 4～6 時間であるため、1,25(OH)₂D の測定は非常に難しく、またこの濃度は厳密に調節されているため、いわゆるビタミン D 栄養状態の指標とはなりにくい。従って、臨床では 1,25(OH)₂D を定期的に測定することはなく、1,25(OH)₂D の測定は、慢性腎臓病、遺伝性リン酸排泄異常症、癌性骨軟化症、偽性ビタミン D 欠乏性くる病、ビタミン D 耐性くる病、サルコイドーシスや一部のリンパ腫などの慢性肉芽腫性疾患など、後天性または遺伝性のビタミン D およびリン酸代謝疾患の場合にのみ有用とされている²⁾。

24,25(OH)₂D と VMR

24,25(OH)₂D は 25(OH)D の主要な代謝産物であり、25(OH)D に比べて約 10 分の 1 程度の量であるが、LC-MS/MS によって高い精度をもって測定することができる。なお、血中 24,25(OH)₂D は 25(OH)D 濃度と強い相関を示す¹⁵⁾。近年、24,25(OH)₂D と 25(OH)D の同時定量は、ビタミン D 代謝の動的な評価法として提案されており、高カルシウム血症を引き起こす CYP24A1 欠損症とビタミン D 中毒や肉芽腫症等との鑑別診断での有用性が示されている¹⁶⁾。24,25(OH)₂D 濃度の考え方として、1 つはビタミン D 欠乏症の患者において、CYP24A1 の調節機能が低下することで、24,25(OH)₂D の生成が著しく減少し、あるいはほとんど産生されなくなることが考えられる。Cavalier らの研究によると、25(OH)D 濃度が低いほど、24,25(OH)₂D 濃度が検出されない可能性が高くなり、おそらく機能性ビタミン D 欠乏症を示すとしている¹⁷⁾。反対に、25(OH)D 濃度が高い場合には、25(OH)D 濃度が過剰とならないように CYP24A1 による異化代謝が高まることで、高カルシウム血症を回避する。つまり、ビタミン D

を高用量投与した際に 24,25(OH)₂D 濃度が検出されない場合、ビタミン D 欠乏症というよりもむしろ酵素異常を示唆するものと考えられる¹⁸⁾¹⁹⁾。また、24,25(OH)₂D と 25(OH)D の比率の算出値は、ビタミン D 代謝比率 (VMR) とも呼ばれている。地域在住高齢者を対象としたコホート研究では、24,25(OH)₂D が高いと大腿骨近位部骨密度が高いという有意な正の関係が見られたものの、VMR は骨密度とは有意な関連がなかった。また、24,25(OH)₂D と VMR 共に、この値が高いと大腿骨近位部骨折のリスクが低いことも示された²⁰⁾。さらに、CKD 患者では、血清 24,25(OH)₂D 濃度が対象集団の中央値 (2.4 ng/ml) 未満、すなわち機能的なビタミン D 不足状態の患者では、糸球体濾過機指標の estimated Glomerular Filtration Rate, (eGFR) が有意に低く、死亡リスクが高いことも示されている¹⁵⁾。しかし、まだこのような臨床アウトカムとの関係を検討した報告は乏しく、基準値を検討するにも至らない状況にある。

おわりに

ビタミン D 栄養状態の評価は、多くの代謝物の存在やそれらが VDBP やアルブミンと結合していることにより複雑である。代替マーカーに関する研究が進展しているにもかかわらず、25(OH)D は依然としてビタミン D の状態を評価するための第一選択肢とされている。一方、LC-MS/MS 法では、24,25(OH)₂D のような代謝物も含め、高い精度をもって測定することが可能である。以前に比べ、LC-MS/MS 法での定量が広がってきたことから、今後さらにビタミン D 代謝物質の臨床的機能に関する情報が提供されるものと思われる。このことを通じて、さらにビタミン D の臨床的意義が明確にされるものと考えられる。

Key words: vitamin D, 25-hydroxyvitamin D[25(OH)D],
1,25-dihydroxyvitamin D[1,25(OH)₂D],
24,25-dihydroxyvitamin D[24,25(OH)₂D],
vitamin D metabolic ratio (VMR)

Department of Nutrition, Graduate School of Human Life and Ecology, Osaka Metropolitan University

Cai Yu, Akiko Kuwabara

大阪公立大学大学院 生活科学研究科 食栄養学分野
蔡 榆, 榎原 晶子

利益相反: 本稿に関して、申告すべき利益相反はない。

(2024.9.5 受付)

文 献

- 1) Holick MF (2017) The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord* **18**, 153–165
- 2) Alonso N, Zelzer S, Eibinger G, Herrmann M (2023) Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcif Tissue Int* **112(2)**, 158–177
- 3) Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS (2015) Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev* **34(1)**, 2–23
- 4) 榎 利之 (2010) ビタミン総合事典 (日本ビタミン学会編集), pp.51–55, 朝倉書店
- 5) Ohyama Y, Ozono K, Uchida M, Yoshimura M, Shinki T, Suda T, Yamamoto O (1996) Functional assessment of two vitamin D-responsive elements in the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. *J Biol Chem* **271**, 30381–30385
- 6) Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **96(12)**, 3908
- 7) Fraser WD, Milan AM (2013) Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and developments. *Calcif Tissue Int* **92(2)**, 118–127
- 8) Bikle DD, Schwartz J (2019) Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 317
- 9) Makris K, Sempos C, Cavalier E (2020) The measurement of vitamin D metabolites part II-the measurement of the various vitamin D metabolites. *Hormones (Athens)* **19(2)**, 97–107
- 10) Rozmus D, Ciesielska A, Płomiński J, et al (2020) Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms-The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int J Mol Sci* **21(21)**, 7822
- 11) Best CM, Pressman EK, Queenan RA, Cooper E, O'Brien KO (2019) Longitudinal changes in serum vitamin D binding protein and free 25-hydroxyvitamin D in a multiracial cohort of pregnant adolescents. *J Steroid Biochem Mol Biol* **186**, 79–88
- 12) Heureux N, Lindhout E, Swinkels L (2017) A Direct Assay for Measuring Free 25-Hydroxyvitamin D. *J AOAC Int* **100**, 1318–1322
- 13) Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG (1986) Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* **63(4)**, 954–959
- 14) Pike JW, Christakos S (2017) Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* **46(4)**, 815–843
- 15) Bosworth CR, Levin G, Robinson-Cohen C, et al (2012) The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease. *Kidney Int* **82(6)**, 693–700
- 16) Zelzer S, Meinitzer A, Enko D, et al (2020) Simultaneous determination of 24,25- and 25,26-dihydroxyvitamin D₃ in serum samples with liquid-chromatography mass spectrometry - A useful tool for the assessment of vitamin D metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1158**, 122394
- 17) Cavalier, Etienne, Huyghebaert, Loreen, Rousselle, Olivier, Bekaert, Anne-Catherine, Kovacs, Stéphanie, Vranken, Laura, Peeters, Stéphanie, Le Goff, Caroline and Ladang, Aurélie (2020) Simultaneous measurement of 25(OH)-vitamin D and 24,25(OH)₂-vitamin D to define cut-offs for CYP24A1 mutation and vitamin D deficiency in a population of 1200 young subjects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **58**, 197–201
- 18) Herrmann, Markus (2020) Towards a personalized assessment of vitamin D status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **58**, 149–151
- 19) Adriana S. Dusso, Carlos Gomez-Alonso, Jorge B. Cannata-Andia (2015) The hypercalcaemia of CYP24A1 inactivation: new ways to improve diagnosis and treatment. *Clinical Kidney Journal* **8**, 456–458
- 20) Ginsberg C, Katz R, de Boer IH, et al (2018) The 24,25 to 25-hydroxyvitamin D ratio and fracture risk in older adults: The cardiovascular health study. *Bone* **107**, 124–130