資 料

全血総ビタミン B₁ 値標準化に

関する報告書

——高速液体クロマトグラフィーによる

測定法を中心に——

橋 詰 直 孝*

*東邦大学医学部大橋病院臨床検査医学内
ビタミン標準化検討委員会事務局

Proposed Standard for Human Blood Thiamin Value Using High-Performance Liquid Chromatography

Naotaka HASHIZUME*

*Department of Laboratory Medicine, Ohashi Hospital,
Toho University School of Medicine, Japan
Committee for Vitamin Laboratory
Standard, Meguro-ku, Tokyo 153

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 50, 445~447 (1997)
Standard reference ranges for all laboratory test values are mandatory. This study was designed to establish a reference range for blood vitamin B₁ levels, since the normal range has not been determined in the Japanese population. We founded the Japan Committee for Vitamin Laboratory Standards, which was incorporated with the Vitamin Society of Japan and the Japanese Society of Nutrition and Food Science. We standardized whole blood vitamin B₁ levels using three HPLC techniques (post-column reverse-phase HPLC, pre-column reverse-phase HPLC, and precolumn GP-HPLC). The reference range was obtained in 54 volunteers administered a 1,800 kcal diet with 2 mg of vitamin B₁ (1.74 mg measured) daily to avoid marginal vitamin B₁ deficiency in the population. The range for each assay was 26~47 ng/ml, 28~51 ng/ml, and 28~56 ng/ml, respectively. Our data suggest that 26~28 ng/ml is the lower limit of normal for whole blood vitamin B₁, but

further studies in a larger population are needed in order to obtain more definitive results.

Key Words thiamin, HPLC, vitamin B₁ deficiency

(Received April 11, 1997)

臨床検査の基準値は国際的に標準化を試みる傾向にある。ビタミンに関しては国内でも基準値が統一されていないため臨床診断、潜在性ビタミン欠乏状態を判定する上にも混乱をきたしている。そこでビタミン標準化検討委員会**は全血総 B₁ 値の標準化を検討した。従来は全血総 B₁ の測定法をブロムシアンチオクロム法¹⁾で行われていたが、今日 HPLC 法が広く普及しているので HPLC 法を中心に全血総 B₁ 値標準化を検討した。なお、表 1 に示す委員の共同研究によって行われたもので、研究の計画立案と成績の評価は常任委員会が中心になって行った。

全血総 B₁ 測定法の検討

1. B₁ 標準試料の検討

わが国での B₁ (塩酸塩) 標準試料は国立衛生試験所製か和光純薬製のものが多く使用されている。HPLC 法 (カラム, TSKgel G3000 PWWL; 移動相, CH₃CN: 90 mM K₂HPO₄=15:85; 流速, 1.0 ml/min; 検出器, 日立 L-7480 蛍光検出器) を用いて比較したところ溶出時間が 15.5 分でピーク面積 (高さ) が両者ともに同じレベルであった。前者は粉末で使用する時に液体にせねばならず、その時の誤差や高価であるため今回の実験では後者を標準試料として用いた。

2. チオクロム化試薬の検討

チオクロム化試薬としてブロムシアン (BrCN), フェリシアン化カリウム [K₃Fe (CN)₆], 塩化第二水銀 (HgCl₂) がある。これらの検出感度を比較したところ, BrCN は塩酸チアミン 16 pg, チアミン 13 pg が検出限界であり, K₃Fe(CN)₆ は塩酸チアミン 26 pg, チアミン 20 pg, HgCl₂ 塩酸チアミン 17 pg, チアミン 13 pg であったので, BrCN や HgCl₂ に比べて K₃Fe(CN)₆ は 1.5 倍感度が劣ることになるが、一般的な血液試料を用いる場合の測定感度は三者ともに十分であった。

3. 測定法の検討

糸川がブロムシアンチオクロム法¹⁾, 橋詰, 石渡がプレカラム HPLC 法 (GPC, BrCN) 法²⁾, 門脇がプレカラム HPLC (ODP, HgCl₂) 法^{3,4)}, 窪田がポストカラム HPLC (ODS, K₃Fe(CN)₆ 法⁵⁾を担当した。HPLC 法の

*〒153 東京都目黒区大橋 2-17-6

**ビタミンの栄養状態判定のための標準設定に必要な検討を行うことを目的とし、1996年3月に日本ビタミン学会と日本栄養・食糧学会を母体としてビタミンの臨床検査に携わっている者を中心に組織された委員会である。

表 1. ビタミン標準化検討委員会

委員長 糸川嘉則
副委員長(事務局) 橋詰直孝
常任委員 浅野真智子, 石田幸久, 五十嵐脩, 岡崎光子 門脇久治, 窪田規一, 美濃 真
監 事 奥田邦雄, 千畑一郎
委 員 荒木正勝, 五林正満, 佐藤忠司, 佐山義克, 末木一夫 下村恭一, 白川吉一, 高野 晋, 中村哲也, 埴 雅明 新村弘正, 林 敏慶, 森尾恒久

条件を表2に示す。 B_1 濃度の異なる同一試料を測定した結果を表3に示す。プロムシアンチオクロム蛍光法が高値を示し、ポストカラム HPLC (ODS, $K_3Fe(CN)_6$) 法が低値にでた。

全血総 B_1 基準値 (参考値) の検討

大阪国際女子大学, 女子栄養短期大学の228名に橋詰の作製した不定愁訴調査を遂行し, スコアの少ない54名を対象に両大学で同一の食事内容ではないが1,800 kcal/日で B_1 は0.5, 1, 2 mg/日とし, 3日ごとに B_1 含有量を変えた食事を摂取してもらい, その都度食事時の B_1 含有量を実測し, 計算値と比較した。その結果, 計算値0.59, 1.13, 2.29 mg/日に対して実測値は0.57, 0.81, 1.74 mg/日であり母集団に潜在性 B_1 欠乏状態の者を加えないために試験前を合わせて4回採血したが実

表 3. 各測定法による全血総ビタミン B_1 測定値

測定法	A (ng/ml)	B (ng/ml)	C (ng/ml)
プロムシアンチオクロム 蛍光法	39	83	100
ポストカラム逆相 HPLC	31	58	83
プレカラム逆相 HPLC	38	61	92
プレカラム GP-HPLC	37	63	90

測値1 mg/日を超えた最終の採血 (B_1 2 mg/日食) をもって B_1 基準値の母集団とした。なお, 本実験は女子栄養大学の倫理委員会で承認を受けた (倫委第37号, 平成8年5月30日)。

全血総 B_1 濃度を表4に示す。プロムシアンチオクロム蛍光法が高値に, ポストカラム HPLC 法が低値にでた。また, プレカラム HPLC (GCP, BrCN) 法とプレカラム HPLC (ODP, $HgCl_2$) 法は $y=0.85X+10.4$ ($r=0.62$) の相関, プレカラム HPLC (ODP, $HgCl_2$) 法とポストカラム HPLC 法は $y=0.93X+5.1$ ($r=0.91$) の相関であった。

B_1 欠乏症のアンケート調査

1990年以降に B_1 欠乏症を経験した施設に対して全血総 B_1 濃度, 測定法をアンケート調査を施行した (回収率30%)。表5に示すようにプロムシアンチオクロム蛍光法8名で, HPLC 法8名で, 測定法不明3名であった。

プロムシアンチオクロム蛍光法での基準値を95%信頼区間にとると B_1 欠乏症4名 (50%) の値が基準範囲に入ってしまう。68.2%の信頼区間ならば B_1 欠乏例の B_1

表 2. HPLC 条件

	ポストカラム逆相 HPLC	プレカラム逆相 HPLC	プレカラム GP-HPLC
カラム	Inertsil ODS-2 (4.6×250 mm)	Shodex ODP-50 (4.6×150 mm)	TSKgel IG3000PWXL (7.8×300 mm)
カラム温度	47°C	室温	40°C
移動相	5% MeOH/0.001 mol/l KH_2PO_4	K_2HPO_4 (pH 8.4)/ CH_3CN	15% CH_3CN /90 mmol/l K_2HPO_4
反応液	15% NaOH/0.024% $K_3[Fe(CN)_6]$	—	—
流速	1.0 ml/min	0.8 ml/min	1.0 ml/min
検出	Ex. 375 nm, Em. 450 nm	Ex. 360 nm, Em. 450 nm	Ex. 365 nm, Em. 430 nm
注入量	40 μ l	25 μ l	25 μ l

表 4. 各測定施設の全血ビタミン B_1 濃度参考値

担当施設	Mean $\pm$ SD	68.2%信頼区間 (mean $\pm$ 1SD)	95.0%信頼区間 (mean $\pm$ 2SD)
プロムシアンチオクロム蛍光法	50 $\pm$ 10 ng/ml	40~60 ng/ml	31~69 ng/ml
ポストカラム HPLC 逆相	36 $\pm$ 5 ng/ml	31~42 ng/ml	26~47 ng/ml
プレカラム HPLC 逆相	39 $\pm$ 6 ng/ml	33~45 ng/ml	28~51 ng/ml
プレカラム HPLC GPC	40 $\pm$ 7 ng/ml	33~47 ng/ml	28~56 ng/ml

表 5. ビタミン B₁ 欠乏症の全血総ビタミン B₁ 濃度 (アンケート調査)

診断名	性	年齢	B ₁ 濃度 (ng/ml)	測定法
アシドーシス (胃がん)	男	53	11	BrCNThc 蛍光法
アシドーシス (胃がん)	男	69	10	BrCNThc 蛍光法
アシドーシス (胃がん)	男	42	25	BrCNThc 蛍光法
アシドーシス (直腸がん)	男	52	37	BrCNThc 蛍光法
アシドーシス (胃がん)	男	36	36	BrCNThc 蛍光法
アシドーシス (胃がん)	女	68	22	BrCNThc 蛍光法
Wernicke 脳症	男	47	39	BrCNThc 蛍光法
アルコール性多発性神経炎	男	不明	36	BrCNThc 蛍光法
Wernicke 脳症	男	65	23	HPLC 法
Wernicke 脳症	男	67	16	HPLC 法
Wernicke 脳症	男	51	22	HPLC 法
Wernicke 脳症	男	65	27	HPLC 法
Wernicke 脳症	男	23	26	HPLC 法
Wernicke 脳症	男	43	21	HPLC 法
Wernicke 脳症	女	不明	25	HPLC 法
脚 気	女	36	6	HPLC 法
アシドーシス	女	60	10	不明
心 不 全	男	57	10	不明
アシドーシス	男	32	13	不明

値が基準範囲に入ることはない。HPLC 法ではポストカラム HPLC 法が基準値 95%信頼区間をとると B₁ 欠乏症 2 名 (25%) の値が基準値範囲に入ってしまう。68.2%信頼区間をとれば B₁ 欠乏症例の B₁ 値が基準範囲に入ることはない。プレカラム HPLC 法では 95%信頼区間をとっても B₁ 欠乏症は基準範囲に入らない。

お わ り に

今回は母集団数が少ないので参考値としたが、基準母集団数を増した上で基準範囲を設定しなければならない。また、現在各測定法の相関をさらに良いものにするため検討を続けている。健常者と B₁ 欠乏患者の全血総 B₁ 濃度の重複をどのように考え対処するかを決めることが今後に残された問題である。

ご協力賜りました東邦大学医学部大橋病院臨床検査部

渭原 博博士, 石渡幸久学士, また, 活動基金を協賛して下さいました, アサヒビール薬品株式会社, エーザイ株式会社, 大塚製薬株式会社, 三共株式会社, 塩野義製薬株式会社, 第一製薬株式会社, 大正製薬株式会社, 田辺製薬株式会社, 中外製薬株式会社, 日本化薬株式会社, 日本ロシュ株式会社, 藤沢薬品工業株式会社, 山之内製薬株式会社, 和光純薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 糸川嘉則: ビタミン, 56, 543 (1982)
- 2) 安田和人, 石渡幸久: 臨床検査, 36, 240 (1992)
- 3) 勝又増幸: 生化学, 28, 368 (1956)
- 4) 安田和人, 池田律子, 川田明子: 臨床病理, 157, 564 (1989)
- 5) 木村美恵子, 藤田登美雄, 糸川嘉則: ビタミン, 55, 185 (1981)

(1997 年 4 月 11 日受理)