



JN THE JOURNAL OF NUTRITION

journal homepage: www.journals.elsevier.com/the-journal-of-nutrition



Nutritional Methodologies and Mathematical Modeling

Determination of a Serum 25-Hydroxyvitamin D Reference Ranges in Japanese Adults Using Fully Automated Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

全自動液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた日本人成人における血清 25-ヒドロキシビタミン D の基準範囲の決定

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316623055876?via%3Dihub>

Hiroyasu Miyamoto 1,2,3, Daisuke Kawakami 4,5, Nobuhiro Hanafusa 4, Tsuyoshi Nakanishi 4, Masaki Miyasaka 1, Yutaka Furutani 1, Yuichi Ikeda 2, Kyoko Ito 6, Tomohiro Kato 6, Keitaro Yokoyama 7,8, Shoutaro Arakawa 9, Mitsuru Saito 9, Tadasu Furusho 3, Tomokazu Matsuura 1, Sae Ochi 1,*

1 Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, Minato City, Tokyo, Japan; 2 Department of Central Clinical Laboratory, The Jikei University Hospital, Minato City, Tokyo, Japan; 3 Department of International Food and Agricultural Science, Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture, Setagaya City, Tokyo, Japan; 4 Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation, Kyoto city, Kyoto, Japan; 5 Analytical Business Unit, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany; 6 Centre for Preventive Medicine, The Jikei University School of Medicine, Minato City, Tokyo, Japan; 7 Harumi Toriton Clinic of The Jikei University Hospital, Chuo City, Tokyo, Japan; 8 Department of Health Science, The Graduate School, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; 9 Department of Orthopedics, The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo, Japan

抄録

背景: ビタミンD状態への関心が高まっているにもかかわらず、この栄養素の基準範囲は完全には確立されていない。これは、処理能力の高い標準化された測定システムが不足していることが一因である。さらに、その範囲は集団によって異なり、生活様式の近代化に伴って変化する可能性がある。

目的: 本研究の目的は、日本の都市部に居住する健常者における25-ヒドロキシビタミンD(25(OH)D)の現在の基準濃度を算出することである。

方法: 新たに開発された完全自動液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)システムを用いて、血清中25(OH)D濃度を測定した。再現性は標準化された試料を測定することによって評価された。精度は市販の免疫測定法と比較することにより検証された。その後、2019年4月から2020年3月までに東京で健康診断を受けた参加者を対象に集団スクリーニングを実施し、基準範囲を算出した。

結果: 術者間および日差再現性の変動係数は、25-ヒドロキシビタミンD₂(25(OH)D₂)でそれぞれ4.1~8.5%および3.7~8.0%、25-ヒドロキシビタミンD₃でそれぞれ4.7~7.0%および4.0~6.9%であった。測定した総25(OH)D濃度はイムノアッセイによる測定値とよく相関していた。計5518名の被験者について25(OH)D濃度を測定したところ、98%の被験者で濃度が不十分(30 ng/mL未満)であった。合計25(OH)Dの基準範囲は、女性で7-30 ng/mL、男性で5-27 ng/mL、全被験者で6-29 ng/mLであった。腎機能および肝機能に異常のある患者を除外した後の範囲は6-30 ng/mLであった。

結論: 一見して健康な集団におけるビタミンD欠乏症の有病率の高さは、日本の都市部に住む人々の生活習慣の特徴(屋外で過ごす時間が短い、伝統的な食品の摂取量が少ないなど)に起因している可能性がある。異なる集団を対象とした長期的な追跡調査とマススクリーニングは、公式のガイドラインと観察された濃度との間に不一致がある理由を明らかにするのに役立つであろう。この不一致に対しては、十分に検証された測定システムが不可欠である。

キーワード: ビタミンD、基準範囲、LC-MS/MS、マススクリーニング、臨床検査

Abbreviations: 25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; ALB, albumin; ALT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval; CLAM, Clinical Laboratory Automation

Module; CLEIA, chemiluminescent enzyme immunoassay; CV, coefficient of variation; ECLIA, electrochemiluminescent immunoassay; FPG, fasting plasma glucose;

γ -GT, gamma-glutamyl transpeptidase; GFR, glomerular filtration rate; HbA1c, hemoglobin A1c; JCCLS, Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards; LC-

MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometer; LDL-C, LDL-cholesterol; NIST, National Institutes of Standards and Technology; PLT, platelet

count; SD, standard deviation; SDR, standard deviation ratio; TG, triglyceride; VDSP, Vitamin D Standardization Program.

* Corresponding author. E-mail address: ochisae1024@jikei.ac.jp (S. Ochi).

<https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.01.036>

Received 21 November 2022; Received in revised form 11 January 2023; Accepted 31 January 2023; Available online 3 February 2023

0022-3166/©2023 The Author(s). Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Nutrition. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

はじめに

ビタミン D は多臓器系で役割を果たす多面発現性の栄養素である。小児のくる病、成人の骨軟化症、高齢者の骨粗鬆症を予防するために十分なビタミン D が必要であることはよく知られている。最近の研究では、ビタミン D 欠乏が呼吸器疾患、自己免疫疾患、様々な癌、糖尿病、慢性腎疾患、痴呆症、うつ状態、不良な妊娠転帰、および身体能力の低下と関連していることも明らかにされている[1-3]。この薬剤の中心的な役割にもかかわらず、ビタミン D の不足および欠乏を評価する標準的な方法はまだ明確には確立されていない。

臨床検査医学の分野では、栄養状態を定義するカットオフ値が有用であるが、健康な集団でみられる範囲を記述する基準範囲も重要である。しかしながら、ビタミン D および他の栄養素の基準濃度は、しばしば人口統計学的背景の違いによって異なる。同様の人口統計学的背景を有する集団においても、屋外で過ごす時間や食習慣の変化などの生活習慣によって濃度が変化することがある[4]。

このばらつきにより、測定されたビタミン D 濃度と健康アウトカムとの間に乖離が生じる可能性がある。例えば、25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D) 濃度と健康状態との不一致は「ビタミン D のパラドックス」と呼ばれ、十分に確立されている。特に、実際に骨密度が高い集団では、血清 25(OH)D 濃度が低くなることがある[5]。ビタミン D 欠乏症の有病率が比較的高いことがアスリートでも報告されており、アスリートは通常、平均的な集団より健康である[6]。一部の報告では、25(OH)D 濃度の差は、皮膚の色素沈着の違いによる日光への機能的曝露の差では十分に説明できないこと、また、地理的に起源の異なる集団では 25(OH)D 濃度に関して他の遺伝的決定因子が存在する可能性があることも示唆されている[7, 8]。したがって、理論的には、個々の健康状態の評価における血清 25(OH)D の利用を改善するために、複数の健康な集団におけるビタミン D 濃度のマスキングを実施すべきである。

マスキングの実施における重要な課題は、ビタミン D 濃度の測定方法が標準化されていないことである。同定されている 50 を超えるビタミン D 代謝物の中で、25(OH)D は、その生物学的安定性と体内での長い半減期のために、ビタミン D 状態の指標として最も頻繁に用いられている。米国のビタミン D 標準化プログラム (VDSP) は、英国および欧州のビタミン D 外部品質評価計画 (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) ならびに米国の米国標準技術研究所 (National Institutes of Standards and Technology: NIST) と協力して、25(OH)D 測定の国際標準化を確立するための基準測定システムを開発した。このように標準化されていても、研究室間で実施された最近の比較研究では、平均バイアスが最大 5% という VDSP の基準を満たす免疫測定法は 50% に過ぎなかったことが明らかにされている[9]。VDSP は、標準化されていないデータを使用すると、ビタミン D 不足の推定有病率が誤って高くなったり低くなったりする可能性があり、ビタミン D 摂取ガイドラインに影響を及ぼす可能性があることを警告している[10, 11]。したがって、ビタミン D の状態について国際的な合意を形成するために

は、ビタミン D の測定値を標準化することが不可欠である[12, 13]。

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) による定量分析法は、新たに開発された臨床検査システムであり、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) や電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) などの免疫学的方法と比較してバイアスが低いことが実証されている。したがって、LCMS/MS に基づく方法が 25(OH)D 測定のゴールドスタンダードとして推奨されている[9, 14-16]。それでも、LC-MS/MS には標準化の障壁となりうるいくつかの課題がある。これらの課題には、試料の前処理、カラムの種類と溶出条件の一貫性、標準化可能なイオン源などの問題が含まれる。比較的長い実行時間もまた、マスキングにおけるこれらの方法の利用を妨げている。そこで、島津製作所は前処理工程を全自動化した LC-MS/MS 統合システムを開発し、処理時間の大幅な短縮と LC-MS/MS を用いたマスキングの実施を可能とした。この完全に自動化された LC-MS/MS システムは、ステロイド[17]、抗生物質[18]、修飾ヌクレオシド[19]、5-FU[20]、有機酸[21]、および毒物学[22]の分析において妥当性が確認されている。

この研究では、自動化 LC-MS/MS システムを用いて 25(OH)D のマスキングが行われた。この解析では、日本の都市部に住む一見健康な人々を対象とした。この結果は、妥当性が確認された方法を用いてビタミン D の状態を測定することの重要性を強調している。我々の結果はまた、異なる地域および異なる人口集団におけるリスク患者のビタミン D 栄養状態の差を再評価する必要性を強調している。

材料と方法

全自動 LC-MS/MS システムによる測定 化学物質および試薬

キャリブレーターおよび対照は Golden West Diagnostics, LLC から供給された。内標準物質 2H6-ercalcidiol 及び 2 H 6 カルシフェジオールは Alsachim 社から購入した。超純水、ギ酸、アセトニトリル、メタノール及びイソプロパノールは富士フィルム和光純薬(株)から購入した。

測定手順

25(OH)D の測定には、全自動 LC-MS 前処理装置である Clinical Laboratory Automation Module (CLAM-2030; 島津製作所) と超高速三連四重極質量分析計 (LCMS-8050; 島津製作所) を組み合わせた LC システムを組み合わせて使用した。CLAM-2030 は血清試料を処理試薬と自動的に混合し、除たん白が完了した後、試料をオートサンプラーで LCMS-8050 に添加する。この組み合わせから CLAM/LC-MS/MS 法が得られた。

CLAM-2030 を用いた試料調製では、あらかじめ 75% イソプロパノール 20 μ L で調整したポリテトラフルオロエチレン製フィルターバイアル (孔径 0.45 μ m) にヒト血清 (30 μ L) を添加した。次に、それぞれの同位元素で標識された内標準物質を 50 ppb 含むアセトニトリル試料 (90 μ L) を加えた。この混合物を 149 \times g で 60 秒間攪拌した後、60 秒間真空圧 (55~60 kPa) を加えてろ

過し、採取バイアルに入れた。最後に、抽出物の試料(3 μ L)を LC-MS/MS システムに注入した。

クロマトグラフィーシステムは 2 台の Shimadzu LC30 AD ポンプ(Nexera X2),CTO-20AC オープン、および SIL-30 AC オートサンプラー(Shimadzu Corporation)から構成されている。クロマトグラフィーによる分離は、ガードカラムとして Shim-pack Velox PFPP カラム(2.7 μ m 3.0 5 mm;島津製作所)を、分析カラムとして Shim-pack Velox PFPP 2.7 μ m 3.0 100 mm カラム(島津製作所)を用いて行われた。緩衝液 A(0.1%ギ酸を含む水)と緩衝液 B(メタノール)のグラジエントを移動相として用い、流速は 700 μ L/min とした。この勾配は次のように作成された:0.00–2.40 min, 80%–86%B;2.41–3.40 min, 100%B;および 3.41–4.60 min, 80%B。オープンの温度は 30°C に設定した。

LC-MS/MS 分析は、LCMS-8050 三連四重極質量分析計を正の大気圧化学イオン化モードで用いて実施した。インターフェイスパラメータと一般的な設定は次のとおりであった。噴霧ガス流量:3.0 L/min, 界面温度:375°C, 脱溶媒線温度:225°C, 加熱ブロック温度:250°C すべての化合物は、滞留時間 40 ms での予定された複数反応モニタリングによって測定された。多重反応モニタリング法を用いて血清中の分析対象物と内部標準物質を検出したところ、25-ヒドロキシビタミン D₂(25(OH)D₂), 25-ヒドロキシビタミン D₃(25(OH)D₃), 2H625(OH)D₂ および 2H6-25(OH)D₃ の前駆体から産生への移行は、それぞれ m/z 395.3→269.3, m/z 383.4→257.2, m/z 401.3→209.2 および m/z 389.5→371.4 であった(補足図 1)。

1.1.5

CLAM/LC-MS/MS 測定装置の性能評価

25(OH)D₂ 及び 25(OH)D₃ の測定の特異性は、3-epi-25 ヒドロキシビタミン D₂(3-epi-25(OH)D₂)及び 3-epi-25 ヒドロキシビタミン D₃(3-epi-25(OH)D₃)を表すピークを分離を測定することにより評価した。この 2 種類の分析対象物は、安定同位体で標識された 25(OH)D₂ と 25(OH)D₃ で標識された 25(OH)D₂ と 25(OH)D₃ から生成されたもので、set of NIST に準拠した濃度既知の 25(OH)D₂ と 25(OH)D₃ の血清である Inordertoevaluation of the accuracy of the measurement method (Golden West Diagnostics 社) をキャリブレーターとして用いた (25(OH)D₂:4.5–122.1 ng/mL, 25(OH)D₃:4.9–125.9 ng/mL)。各試料を 1 回測定し、精度(%)を算出した。

再現性(検者間の再現性)を測定するために、4 つの異なる濃度の対照試料(Golden West Diagnostics 社)中の 25(OH)D の総濃度を合計 10 回連続で測定し、平均値、標準偏差(SD)および変動係数(CV, %)を算出した。日間再現性のために、同じ対照群の 25(OH)D 濃度を 1 日 1 回 10 日間測定し、平均値、SD, CV(%)を算出した。

自動免疫測定法と CLAM/LC-MS/MS 法による測定値の比較

25(OH)D₂ と 25(OH)D₃ の濃度の合計を 25(OH)D 濃度とし、この値を、日本の医薬品医療機器総合機構によって公式に承認された 2 つの異なる免疫学的試験法によって測定された同等の値と比較した。比較に用いられた方法の 1 つは、測定機器 Lumipulse 25(OH)D(富士レビオ社)を用いた CLEIA であった。

*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等を行っておりません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めていただきますようお願いいたします。

もう 1 つの方法は、Eclisus Reagent Vitamin D Total II と測定装置 Cobas 8000 e801(Roche Diagnostics)を用いた ECLIA 法であった。

50 検体をランダムに選択し、CLAM/LS-MS/MS 法の結果を CLEIA および ECLIA 法の結果と比較した。

25(OH)D のマススクリーニング

研究対象集団

2019 年 4 月から 2020 年 3 月(2019 年 12 月を除く)までに Centre for Preventive Medicine, the Food and Drug Administration(慈恵医大), and Toriton Clinic of Asthma(東京慈恵会医科大学附属病院)で健康診断を受けた全ての人々が連続して登録された。余剰血清を臨床研究に使用することについては、健康診断の前に参加者全員からインフォームドコンセントを得た。研究への参加に同意した人の残りの血清を研究に使用した。

残留血清の採取

健康診断時に参加者から全血を採取した。採血後直ちに、遠心分離により血清中の AFP を測定した。残りの血清はプラスチック製の密閉チューブに分注し、80°C の冷凍庫で暗所で保存した。ビタミン D 測定のための処理の直前に、凍結した血清検体を室温で解凍した。

情報収集

健康診断時に測定された典型的な生化学検査値は、健康診断の結果から得られたものである。対象とした項目は、身長、体重、BMI(kg/m²), 血球数、血清クレアチニン値、糸球体濾過量(GFR), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GT), アルブミン(ALB), LDL コレステロール(LDL-C), トリグリセリド(TG), 空腹時血漿血糖値(FPG), およびヘモグロビン A1c(HbA1c)であった。

25(OH)D 濃度の分類

25(OH)D 濃度は、日本骨代謝学会、日本内分泌学会、日本骨粗鬆症学会による定義「血清 25(OH)D が 30 ng/mL 未満の場合をビタミン D 欠乏、血清 25(OH)D が 20 ng/mL 未満の場合をビタミン D 欠乏」を用いて分類された[23]。

基準範囲の計算

濃度分布を正規分布に対数変換することにより、試料間の 25(OH)D の基準範囲[95%信頼区間(CI)]を求めた。ビタミン D 濃度は肝機能、脂質プロファイル、および DM の影響を受ける可能性があるため、GFR, ALT, γ -GT, ALB, LDL-C, TG, FPG, HbA1c, ヘモグロビン、および血小板数が日本臨床検査標準協議会(JCCLS)の基準範囲内であった症例について、健康診断の結果からデータを収集し、基準範囲を算出した[24]。

統計解析

CLAM/LC-MS/MS 法と CLEIA または ECLIA 法との間の一致試験は、Bland-Altman プロットによって行われた。この相関を表す式は Passing Bablok 法によって計算される。

Bonferroni 型の補正法を用いて、25(OH)D 濃度と他の因子との相関を算出した。スチューデントの t 検定を用いて、25(OH)D の平均値を性別、季節、年齢別に比較した。

25(OH)D の基準範囲を算出するために、値の分布を対数変換により正規化し[25]、3 SD で 2 回切り捨てて、潜在的な病態による極端な値を除外した。95%CI はパラメトリックに算出され、その区間の下限値と上限値は逆変換された。

ビタミン D は日光に暴露すると皮膚から産生されるため、血清濃度は季節によって変化することがあり、この潜在的な関係を明らかにするために SD 比(SDR)が分析された。地域、性別および年齢による検査結果のばらつき(SD)を定量するため、3 水準のネスト ANOVA が用いられた。SDR は、特定の factor to the residual SD における SD の比 (representing the net between 個体間変動)として算出された。SDR が 0.3 を超える場合を有意とみなした。0.5 を超える SDR 値については、典型的な推奨に従って層別化を行った[26]。さらに、自動化 LC-MS/MS 法の技術的水準に関する以前の研究[27]を参照して、4 ng/mL のバイアスを有意な値として設定した。

統計解析は StstFlex.ver7(Artec) および Stata/SE 16.0(StataCorp LLC)を用いて実施された。0.05 未満の P 値は統計学的に有意であると考えられた。

TABLE 1
Accuracy of the measurement of 25(OH)D2 and 25(OH)D3 by CLAM/LC-MS/MS

25(OH)D2	Sample number	1	2	3	4	5	6
	Reference value (ng/mL)	4.5	14.8	30.1	60.8	91.4	122
	Measured concentration (ng/mL)	4.4	15.1	32.4	58.7	88.6	120
	Accuracy (%)	97.8	102	108	96.5	96.9	98.2
25(OH)D3	Sample number	1	2	3	4	5	6
	Reference value (ng/mL)	4.9	15.4	31.2	62.7	94.3	126
	Measured concentration (ng/mL)	4.9	15.1	31.0	63.8	94.0	127
	Accuracy (%)	100	98.1	99.4	102	99.7	101

A set of NIST-compliant serum with known concentrations (Golden West Diagnostics) was used as a calibrator and each sample was measured once. 25(OH)D2, 25-hydroxyvitamin D₂; 25(OH)D3, 25-hydroxyvitamin D₃; CLAM, Clinical Laboratory Automation Module; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometer; NIST, National Institutes of Standards and Technology.

CLAM/LC-MS/MS 法による結果は、この方法で測定した総 25(OH)D 量と自動免疫測定法で測定した総 25(OH)D 量を比較することによってさらに検証された。Bland-Altman プロットによる一致率検定の結果を図 1 に示すが、CLEIA では、平均差が 0.50 ng/mL、95%一致限界が 3.93~4.93 mg/mL であり、2 検体(4%)が一致限界外であった(図 1A)。ECLIA については、平均差は 1.07 ng/dL、95%一致限界は 4.05~6.19 ng/mL で、4 検体(8%)が限界値外であった(図 1B)。CLEIA との相関は r 値 0.965(P<0.01)であり、この相関を表す式は $y = 1/4 \cdot 1.088x + 0.755$ であった(図 1C)。ECLIA との相関は r 値 0.949(P<0.01)であることが明らかにされ、この相関を表す式は $y = 1/4 \cdot 1.000x + 0.850$ であった(図 1D)。明らかな系統誤差は認められなかった。

CLAM/LC-MS/MS 法を用いた 25(OH)D のマスキリング

この方法を検証した後、CLAM/LC-MS/MS システムを用いて血清試料中の 25(OH)D2 および 25(OH)D3 の濃度を測定した。

倫理的な承認

本試験は Declaration of Helsinki に準拠しており、慈恵医大 Ethics Committee により承認された[承認番号:31-049(9548)および 31-090(9589)]。

結果

CLAM/LC-MS/MS 測定装置の性能のバリデーション

25(OH)D2 および 25(OH)D3 の濃度を測定することに加えて、25(OH)D3 と 3-epi-25(OH)D3 の分離についても検討した(補足図 2)。25(OH)D2 及び 25(OH)D3 のピークは約 2.0 分の溶出時間で安定同位体標識した 25(OH)D2-D3 及び 25(OH)D3-d6 の別々のピークとして同定された。これらの分子の分離は、CLAM/LC-MS/MS 法の測定戦略の機能的特異性を示している。

この方法の精度を分析した結果、25(OH)D2 および 25(OH)D3 の測定濃度は、検討した全濃度範囲において既知濃度の 96.5~108%であった(表 1)。術者間及び日差再現性の CV は、25(OH)D2 では 4.1~8.5%及び 3.7~8.0%、25(OH)D3 では 4.7~7.0%及び 4.0~6.9%であった(表 2)。

参加者のベースライン特性

健康診断の参加者全員からインフォームドコンセントを取得し、計 5518 人(男性 3400 人、女性 2118 人)の検体で 25(OH)D を測定した。患者選択のフローチャートを補足図 3 に示す。

参加者のベースライン特性を表 3 に示した。被験者の平均 SD および年齢中央値は、男性でそれぞれ 50.6 13.2 および 51 歳、女性でそれぞれ 45.6 14.7 および 47 歳であった。糖尿病(HbA1c>6.5%)と過体重(BMI>25)の有病率は、男性でそれぞれ 7.24%と 23.6%、女性でそれぞれ 5.26%と 22.0%であり、全国平均(男性でそれぞれ 19.7%と 33%、女性でそれぞれ 10.8%と 22.3%)より低かった[28]。

25(OH)D の濃度

5518 検体中 5516 検体で、25(OH)D₂ の濃度が検出限界の 5 ng/mL を下回った。2 検体のみが検出可能な濃度の 25(OH)D₂ を示し、25(OH)D₂ の濃度は両検体とも 10 ng/mL 未満であった。25(OH)D₃ は全ての血清サンプルで検出された。

驚くべきことに、被験者 5396 人(98%)がビタミン D 不足(1092 人、19.8%)またはビタミン D 欠乏(4334 人、78.5%)に分類された。25(OH)D 濃度の平均および標準偏差は 15.5~5.96 ng/mL であった。総 25(OH)D 濃度の分布は対数正規分布を示した(歪度:0.99;尖度:2.93)(図 2)。方法に記載された分類を参照すると、参加者の 79%がビタミン D 不足と分類され、98%がビタミン D 欠乏症と分類された。

年齢および性別による 25(OH)D 濃度の分布

年齢群別の 25(OH)D の 95 パーセンタイル値および中央値を図 3 に示す。25(OH)D 濃度は年齢と正の相関を示した($r_{1/4}=0.22, P<0.01$)。各年齢群間の比較を補足図 4 に示す。いずれの年齢区分においても、男性は女性より中央値が高かった(補足表 1)。

基準範囲の計算

試料中の 25(OH)D の基準範囲(95%CI)は、濃度分布(図 2)を対数変換により正規分布(歪度:0.04;尖度:0.29)に変換することにより求めた。基準範囲は、女性被験者で 7-30 ng/mL、男性被験者で 5-27 ng/mL、被験者全体で 6-29 ng/mL であった(図 4)。女性被験者の 25(OH)D 値は男性よりも有意に低かった($P<0.01$)。

ビタミン D 濃度は肝機能、脂質プロファイル、および糖尿病の影響を受ける可能性があるため、GFR、ALT、 γ -GT、ALB、LDL-C、TG、FPG、HbA1c、Hb、および PLT の値が JCCLS が設定した共通の基準範囲内であった 1630 例(29.5%)についても基準範囲を算出したところ、6-30 ng/mL であった(データは示していない)。

1.1.8 季節的変動

血清 25(OH)D 濃度の季節的変動を図 5 に示す。25(OH)D 濃度は 9 月に採取された検体で最も高く(平均:17.8;95%CI:8, 30 ng/mL)、1 月に最も低かった(平均:13.1;95%CI:5, 26 ng/mL)。9 月と 1 月の間の 25(OH)D 濃度の差は有意であった($P<0.001$)。興味深いことに、血清 25(OH)D 濃度の月別の変化は、2 月と 5 月に最も高くなる日照時間とは関係がないようであったが、8 月と 5 月に最も高くなる平均気温とは密接に関連していた。9 月。ただし、統計解析は実施できない。

SDR の計算

性別、年齢、採取月、採取季節などの要因が基準範囲の変動にどの程度寄与しているかは、SDR を計算することによって決定された。性別、年齢、採取月、採取季節に関する SDR 指数は、それぞれ 0.303, 0.247, 0.270, 0.258 であった。性別の基準範囲は異なると考えられるが、この SDR は 0.5 未満であり、男女の範囲の 95%CI のバイアスは 4 以内であり、下限は 2、中央値は 3、上限は 3 であった。したがって、血清 25(OH)D 濃度の基準範囲をこれらの因子によって層別化する必要はなく、全体の基準範囲を全ての被験者に用いることができると判断した。

討論

ビタミン D のカットオフ値は十分に研究されているが、健康な集団におけるマスキングが不足しているため、この栄養素の基準範囲は明確には確立されていない。この研究は、日本の都市部に住む一見健康な集団における血清 25(OH)D 濃度の基準濃度を算出した最初の研究である。

TABLE 2
Reproducibility of the measurement of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ by CLAM/LC-MS/MS

		Sample number	1	2	3	4
25 (OH)D ₂	Interoperator reproducibility	Mean (ng/mL)	15.2	30.9	51.3	108
		SD (ng/mL)	1.29	1.92	2.08	6.12
		CV (%)	8.5	6.2	4.1	5.6
	Interday reproducibility	Mean (ng/mL)	16.1	29.5	48.7	102
		SD (ng/mL)	1.29	1.08	2.85	4.65
		CV (%)	8.0	3.7	5.8	4.5
25 (OH)D ₃	Interoperator reproducibility	Mean (ng/mL)	31.4	15.4	71.7	101
		SD (ng/mL)	1.48	1.05	5.02	5.63
		CV (%)	4.7	6.8	7.0	5.6
	Interday reproducibility	Mean (ng/mL)	30.7	16.7	71.1	94.5
		SD (ng/mL)	1.40	1.15	2.83	5.46
		CV (%)	4.5	6.9	4.0	5.6

CLAM/LC-MS/MS 法による 25(OH)D₂ 及び 25(OH)D₃ の測定再現性

手術間の再現性を調べるために、4 つの異なる濃度の対照検体(Golden West Diagnostics 社)における 25(OH)D の総濃度を合計 10 回連続で測定した。日間再現性を調べるために、同じ対照群の 25(OH)D 濃度を 1 日 1 回 10 日間測定した。

25(OH)D₂:25-ヒドロキシビタミン D₂、25(OH)D₃:25-ヒドロキシビタミン D₃、CLAM:Clinical Laboratory Automation Module、CV:変動係数、LC-MS/MS:液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置、SD:標準偏差

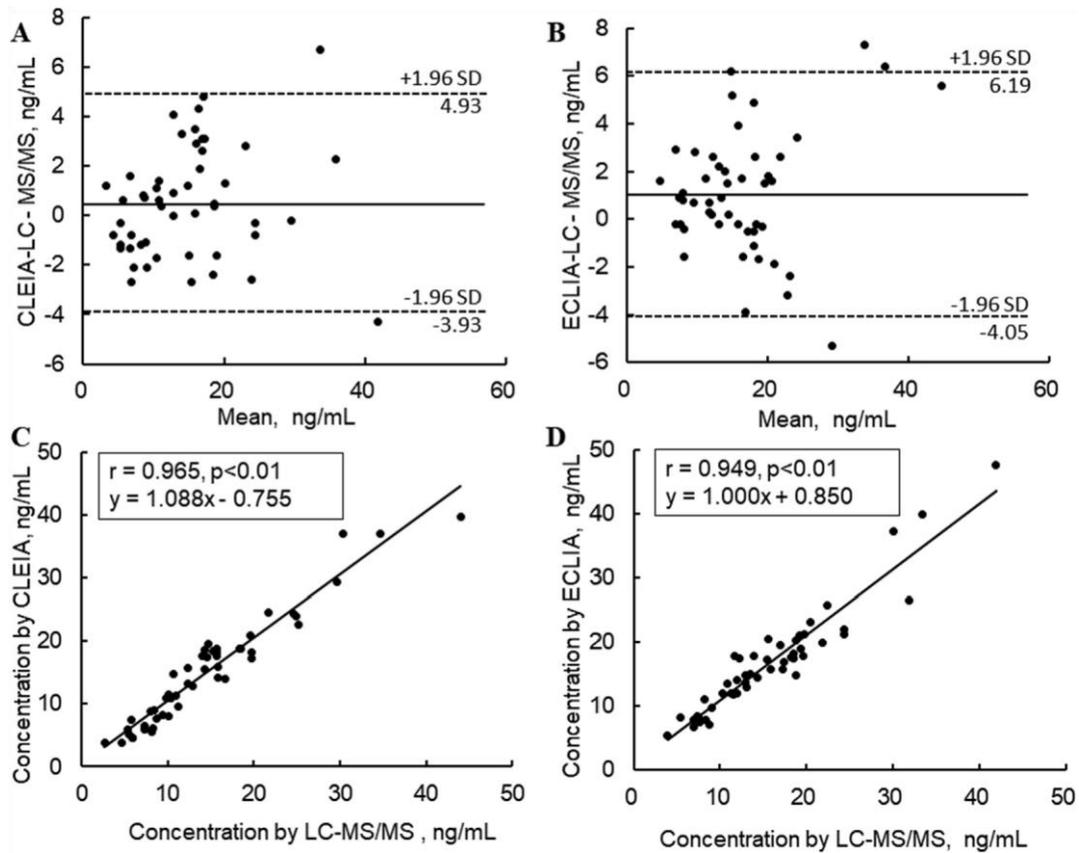


図 1 LC-MS/MS で測定した血清中 25(OH)D 濃度と免疫測定法で測定した血清中 25(OH)D 濃度の相関 LC-MS/MS, CLEIA(A)及び ECLIA(B)で測定した 25(OH)D の濃度と r 値及び相関式(実線)。LC-MS/MS, CLEIA(C)及び ECLIA(D)の Bland-Altman プロット、平均差(実線)及び 95%一致限界(点線)を示す。25(OH)D:25-ヒドロキシビタミン D、CLEIA:化学発光酵素免疫測定法、ECLIA:電気化学発光免疫測定法、LC-MS/MS:液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置

表 3
マスクリーニング参加者の性別によるベースライン特性

	Male (N = 3400)			Female (N = 2118)			Total (N = 5518)		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Age (y)	50.6	13.2	51	45.6	14.7	47	48.7	14.0	50
Height (cm)	167.9	8.1	168.6	164.5	8.6	163.8	166.6	8.5	167
Body weight (kg)	65.2	12.4	64.9	60.8	12.7	58.7	63.5	12.7	62.8
BMI	23.0	3.4	22.7	22.3	3.5	21.8	22.7	3.5	22.4
White blood cell ($10^3/\mu\text{L}$)	5.49	1.53	5.3	5.28	1.46	5.1	5.4	1.5	5.2
Red blood cell ($10^6/\mu\text{L}$)	4.81	0.40	4.82	4.38	0.32	4.38	4.6	0.4	4.63
Hemoglobin (g/dL)	14.9	1.0	14.9	13.1	1.0	13.2	14.2	1.4	14.3
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	237.5	51.3	233	257.0	58.1	251	245.0	54.8	240
Creatinine (mg/dL)	0.88	0.39	0.85	0.64	0.10	0.63	0.79	0.34	0.77
Alanine aminotransferase (IU/L)	25.5	19.4	20	15.4	8.8	13	21.6	16.9	17
γ -glutamyl transpeptidase (IU/L)	45.6	49.2	30	21.9	21.8	16	36.5	42.5	23
Albumin (g/dL)	4.3	0.3	4.3	4.2	0.2	4.2	4.2	0.3	4.2
LDL-cholesterol	122.7	29.5	121	116.5	31.1	113	120.3	30.3	118
Triglyceride	115.5	87.0	96	74.3	39.7	64	99.7	75.3	81
Fasting plasma glucose	95.2	17.4	92	88.3	13.2	87	92.6	16.3	90
Hemoglobin A1c	5.7	0.6	5.6	5.5	0.4	5.5	5.6	0.5	5.5
Diabetes ¹	N	%		N	%		N	%	
Overweight ²	246	7.24		44	2.08		290	5.26	
	801	23.6		413	19.5		1214	22.0	

¹ Hemoglobin A1c > 6.5%.

² BMI > 25.

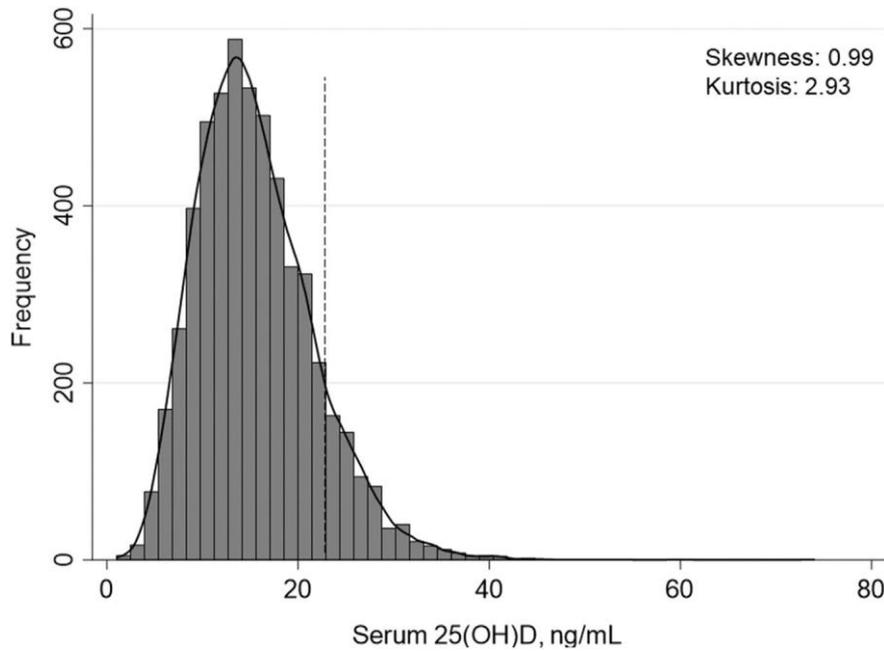


図 2. LC-MS/MS で測定した 25(OH)D 濃度の分布点線はビタミン D 不足の閾値を示す (30 ng/mL)であった。25(OH)D, 25-ヒドロキシビタミン D。

これを可能にしたのは、完全に自動化された新規の LC-MS/MS 法である CLAM/LC-MS/MS であり、これにより高い処理能力と良好な精度が達成された。具体的には、この方法の精度は、米国食品医薬品局 (United States Food and Drug Administration) によって提案された検証ガイドラインの標準である 7.6%未満 (15%未満)の誤差を特徴とすることが明らかにされた。著者らの研究により、この基準範囲は、集団内の多くの個人の濃度が世界的に推奨されている濃度 (20 ng/mL 未満) よりも低いことを示していることが明らかにされた。[29, 30]。

東京居住者における 25(OH)D の基準範囲は低い

健常者の血清から求めた 25(OH)D 濃度の基準範囲を報告した研究はほとんどない。しかし、いくつかの報告により、比較に使用できる平均血清中濃度が確立されている。例えば、地中海沿岸のある集団における 25(OH)D の平均濃度と SD は、男性で 19.48 9.51 ng/mL, 女性で 18.01 9.01 ng/mL と算出された [31, 32]。さらに、米国の被験者を対象としたある研究では 25(OH)D の基準範囲は 9.4~49.6 ng/mL であったが [33]、別の研究では 6.0~43.5 ng/mL と算出されている [34]。重要なことに、25(OH)D の血清中濃度は被験者の出身地域によって異なることが判明した [35]。

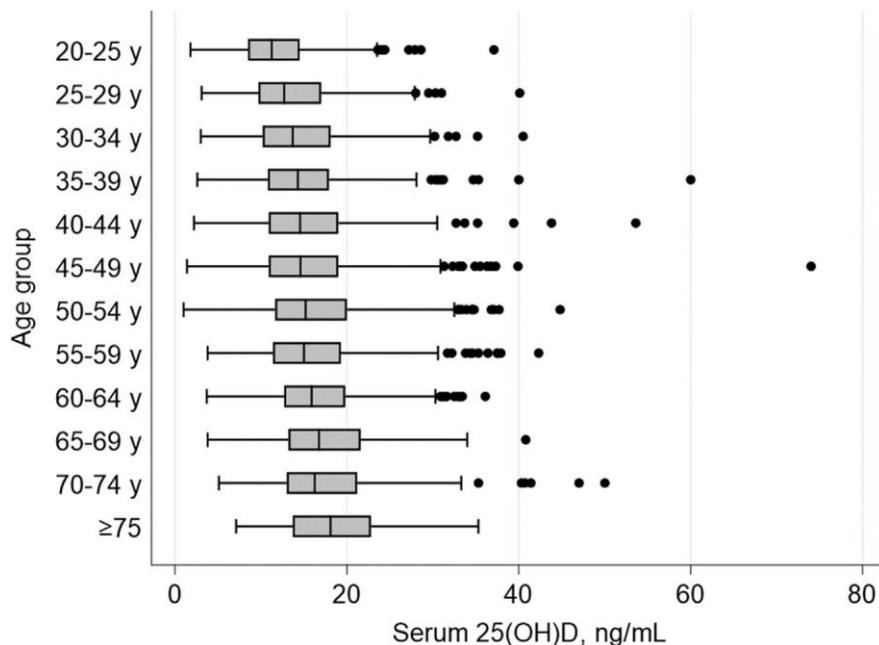
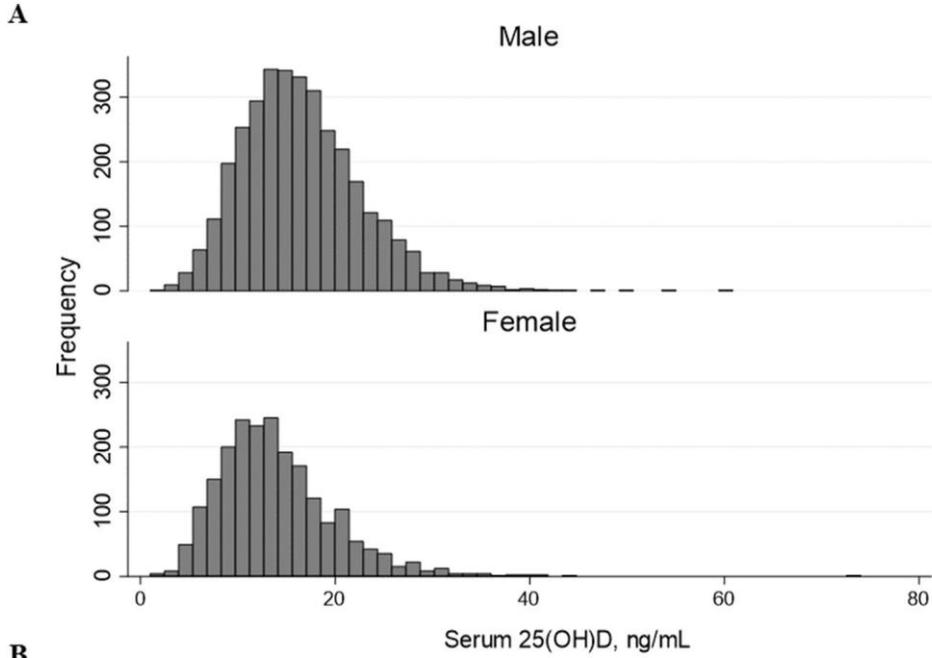


図 3. 年齢群ごとの 25(OH)D 濃度の四分位値および中央値 25(OH)D:25-ヒドロキシビタミンD、CI:信頼区間、SD:標準偏差



B

	N	Mean ± SD	Reference range (95% CI)	Minimum	Median	Maximum
Male	3380	16.5 ± 5.92	7 - 30	7	16	30
Female	2101	13.9 ± 5.55	5 - 27	5	13	27
Total	5481	15.5 ± 5.96	6 - 29	6	15	29

図 4. 男女別の 25(OH)D 濃度の分布および基準範囲(95%CI)

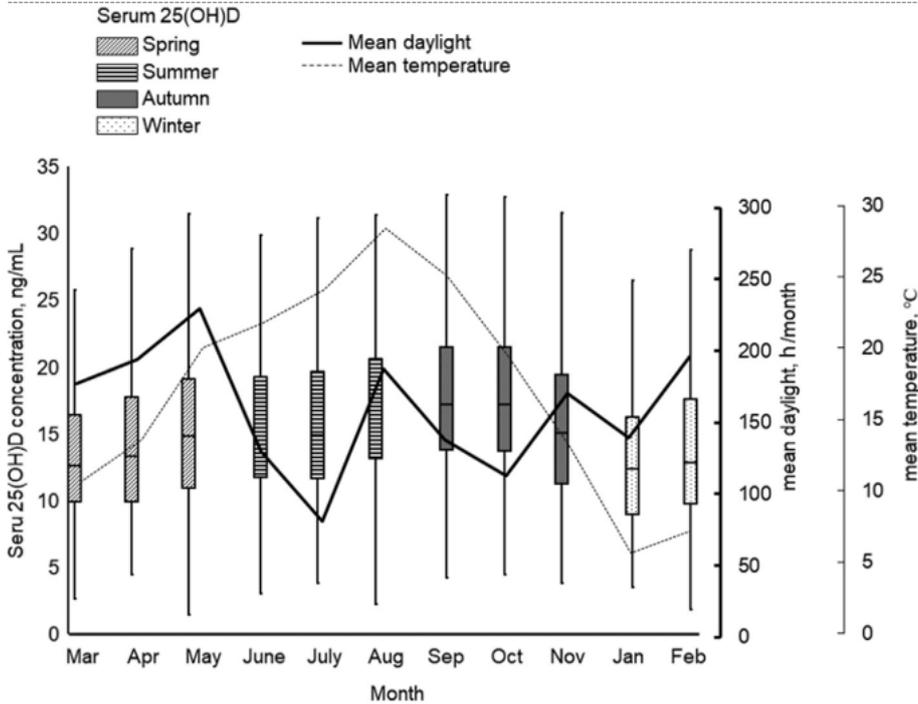


図 5. 東京における血清 25(OH)D 濃度、平均気温、平均日照時間の月毎の変動。我々の新しい方法で測定した 25(OH)D 濃度(ボックス)を、血清を採取した月に従ってプロットする。収集期間中の東京における各月の平均昼光(実線)および平均日気温(点線)は、気象庁から入手した。12月に血清が採取されなかった。25(OH)D、25-ヒドロキシビタミンD。†

日本では、20-69 歳の健康な成人を対象とした研究で、平均血清中 25(OH)D3 濃度が 20.5 ng/mL と報告されている [36]。日本の西部都市部に住む 649 人の被験者を対象とした別の研究では、25(OH)D の中央値および四分位範囲はそれぞれ 19.1 ng/mL および 14.7-24.5ng/mL で、ビタミン D の検出率は 54.1%であった [37]が、これらの報告では基準範囲は提示されていない。

患者を対象とした研究では、日本の糖尿病および慢性腎臓病患者 410 例を対象とした研究において、52 例(13%)が活性型ビタミン D を服用していたにもかかわらず、25(OH)D の中央値および四分位範囲はそれぞれ 23 ng/dL および 16-29 ng/dL であった [3]。神経性無食欲症患者 63 例を対象とした別の研究では、86%の患者の血清中 25(OH)D 濃度が 30 ng/dL 未満であった [38]。今回の研究では、血清 25(OH)D 濃度の平均値と基準範囲はこれら全ての研究で報告された値よりもはるかに低く、ビタミン D 不足と欠乏の有病率は高かった。

我々の研究におけるこれらの低いビタミン D 濃度は、地理的条件によるものではないようである。北緯 36 度に位置する東京の日照時間(年間 2019 時間)は、日本の平均(年間 1969 時間)よりも長い [39]。東京が受ける日光の量と強度は、適切なビタミン D の生成を誘導するのに十分な量である。具体的には、東京で顔面および両手背に近い皮膚領域(600 cm²)から午後 12:00 に 5.5 μg の 25(OH)D を安全に産生するのに必要な日光の持続時間は、7 月で 3.5 分、12 月で 22.4 分と短いと推定されている [40, 41]。

したがって、東京の日照量では相対的なビタミン D 欠乏を説明できない可能性が高いことから、25(OH)D 濃度の低値は典型的な都民の生活習慣によるものである可能性がある。第一に、健康診断の参加者のほとんどが事務職員であったため(データは示されていない)、一般的な日本人よりも日光への曝露が少なかった可能性が高い。さらに、9 月中の 25(OH)D 濃度は気温と強い関係があることも明らかになった。この相関関係は、検査した集団で観察された 25(OH)D 濃度に衣服が関与していることを示唆している可

能性がある。具体的には、気候が温暖な時期に被験者がより軽い衣服を着用した場合、25(OH)D 濃度の上昇に日光がより効果的となる可能性がある。したがって、参加者の 25(OH)D 濃度が低かったことは、サンスクリーン剤や日傘の使用、屋内で過ごす時間の増加など、現代の生活習慣の側面によって説明できる可能性がある。特に、我々の研究では、高齢者の血清 25(OH)D 濃度は比較的高いことが示された。このことは、日本の退職者は戸外で運動する傾向があるという事実によって説明できるかもしれない。

欧州諸国および米国では、人々はサプリメントを介してビタミン D を積極的に摂取しており、25(OH)D2 はしばしば食品に添加されている;したがって、これらの地域の集団で検出された 25(OH)D2 濃度は、我々の研究で観察された濃度よりも高い。しかし、筆者らの研究では、ほとんどの被験者の 25(OH)D2 濃度が検出限界未満であったことから、日本ではビタミン D サプリメントが普及していないことが示唆される。かつては、乾しいたけには 100 g 中 12.7 μg のビタミン D が含まれており、多くの人々が摂取していた。キノコは今でも人気があるが、最近の食物輸送の改善により、ビタミン D 含有量の少ない生のシイタケの供給が増加している。したがって、日本の都市部における栄養習慣やその他の生活習慣の変化が血清 25(OH)D 濃度低値の原因である可能性がある。

異なる時期に異なる集団で基準範囲を計算する必要性

日本の若年層を対象とした過去の研究では、2016 年から 2020 年の間に平均 25(OH)D 濃度が約 8.5 ng/mL 低下したことが示されており [4]、これはおそらく COVID-19 パンデミック中の生活習慣の変化によるものと考えられる。この結果は、25(OH)D の基準範囲が生活習慣の影響を受ける可能性があることを強く示唆している。したがって、同じ集団であっても、血清 25(OH)D 濃度のマスキングを標準化された方法で繰り返し実施する必要がある。

しかしながら、これらの生活習慣の変化を考慮しても、現在の人口の98%がビタミンDの推奨濃度を満たしていないことが判明したことは驚きであった。健常者におけるビタミンD欠乏症の有病率が高いことは、サウジアラビア(98.5%)[42]、韓国(男性64%,女性77%)[43]、イラク(56%)[44]など、世界の他の地域でも時折報告されている。このような高い有病率は軍隊の新兵にも認められ(47.7%がビタミンD欠乏症、31.6%がビタミンD欠乏症)[45]、一部の研究者は、世界中の健康な集団におけるビタミンD欠乏症およびビタミンD欠乏症の高い有病率は、血清25(OH)Dの不当に高いカットオフ値によって人為的に作り出されたものであると指摘している[7]。したがって、30 ng/mLの25(OH)濃度が何らかの病理学的状態と関連しているかどうかを評価することが重要である。特に、内臓脂肪の増加に伴い血清25(OH)D濃度が低下するとの報告があることから[46]、体脂肪不足に悩む人が増加する現代においては、基準値が低くなる可能性がある。標準化された方法を用いたビタミンD濃度のマスキングによって促進されるであろう、複数の集団におけるビタミンDの基準濃度に関するさらなる研究が必要である。

25(OH)D濃度自体の違いに加えて、ビタミンDの他の代謝物の比率も集団によって異なる可能性がある。これらの代謝物と人口統計学および臨床的特徴との相関を分析することで、25(OH)D濃度の違いについての洞察が得られる可能性がある。例えば、血清中の24,25(OH)2Dと25(OH)Dの比の変化は、ビタミンDの状態をより特異的に測定できる可能性があり、この比はビタミンD結合タンパク質に結合していない遊離25(OH)Dの濃度をより正確に反映するため、人口統計学的な差に対する感度が低い可能性がある[5]。これらの代謝物を効率的かつ正確な方法で同時に測定する方法を開発するには、さらなる研究が必要である。

ビタミンDの状態をプロファイリングするための全自動LC-MS/MSの適用

LC-MS/MS,特に自動LC-MS/MSは、起源の異なる被験者のビタミンDプロファイルの違いを解明する上で、抗体ベースの方法を含む従来の方法と比較していくつかの利点がある。第一に、前処理から結果までの全プロセスを自動化することにより、測定時間を大幅に短縮することができ、本手法を用いることで、5.5時間で60回の試験を実施することが可能となる。この高い処理能力は、集団内の基準濃度を決定するために不可欠なマスキングにとって極めて重要である。

第二に、LC-MS/MS法は精度と特異性の点で優れていることが実証されている。これまでの報告では、イムノアッセイは20 ng/mLを超える25(OH)D2濃度の定量には使用できないことが示唆されていた[47]が、LC-MS/MSではより高濃度の25(OH)D2を正確に測定できる。また、LC-MS/MS法では、3-epi-25(OH)D2と3-epi-25(OH)D3を完全に分離して測定することが可能であり、構造的に類似したこれら2つの代謝物の濃度差は、炎症などの臨床状態[48]。や乳児のビタミンDの状態を反映していると報告されている[49]。これまでの研究では、1- α 25(OH)2Dや24,25(OH)D2など、他の関連代謝物をLC-MS/MSで個別に測定できる可能性も示されている[15,50,51]。最近発見されたビタミンD代謝物を測定するための標準化プログラムの必要性が高まっていることを考えると、この能力は特に有益である[5]。さらに、ビタミンDの代謝は他の酵素やホルモンの状態にも影響されるため[52]、アルドステロン、アンドロステジオン、その他のステロイドなど他の小分子の測定も重要である。したがって、CLAM/LC-MS/MSシステムは、リアルタイムのモニタリングを必要とする複数の臨床的問題に広く適用できる可能性があるとして提案する。

ビタミンDの状態に影響しうるその他の因子

今回の研究では、25(OH)Dの基準範囲を決定する際に考慮すべき因子として、性別、年齢、時期が特定された。特に、性別の場合にはSDRが0.3を超えていたことが判明したが、このSDRは性別が影響を及ぼす可能性のある因子であることを示唆しているものの、この数値は0.5未満であることから、性別に基づいて基準範囲を層別化する必要はないと結論している。25(OH)Dの差が体脂肪組成などの他の交絡因子によって引き起こされたかどうかを判断するには、さらなる解析が必要である。

事項制約事項

主にこの研究の後ろ向きな性質により、我々の研究にはいくつかの限界がある。最も重要なものは選択バイアスである。特に、健康診断の参加者はより健康意識が高いと想定される。例えば、過体重者の割合は男性で22.6%、女性で19.5%であり、日本人の平均(男性31.8%、女性21.6%)より低かった[28]。BMIが高いほどビタミンD濃度が低い[53]。ことから、この選択バイアスが本研究の結果に影響を及ぼす可能性がある。それでも、結果は25(OH)Dの予想濃度よりはるかに低いことを示しており、これは有意である可能性がある。また、本研究は基本的に健康な人を対象としたものであるが、健康診断の対象者にはがんなどの重度の疾患を有する人も含まれる可能性がある。いくつかの項目の外れ値を除外することによって感度分析を実施したが、そのような潜在的な外れ値を完全に除外することはできない。

結論

血清25(OH)D濃度を正確かつ迅速に測定できる完全に自動化されたLCMS/MSシステムを用いて、日本の健康な集団におけるビタミンD状態のマスクリーニングを実施した。算出された平均濃度(15.5 ng/mL)は以前に報告された値(20.5 ng/mL)よりもはるかに低かった。ビタミンDに関

して住民の栄養状態が見かけ上不良であることから、25(OH)D濃度がこのように低い原因を解明するために、さらなる疫学研究が必要であることが示唆される。これらの研究は、郊外地域の住民または異なる緯度に居住する集団間の差を比較するためのマスマスクリーニングの利用によって強化されるであろう。他のビタミンD関連代謝物を高処理能で測定することも、このような試験にとって重要であろう。いずれの試験においても、自動化されたCLAM/LC-MS/MSシステムが必要な迅速性と特異性をもたらすであろう。

Acknowledgments

The authors thank Ms. Ritsuko Nakayama and Ms. Reiko Kisugi of the Department of Laboratory Medicine, the Jikei University School of Medicine, for their significant contribution to the operation of the CLAM/LC-MS/MS system. The authors also appreciate all the participants of the study for their contributions.

Author contribution

The authors' responsibilities were as follows – HM, TF, TM: designed the research; HM, TF, TM, SA, MS: developed overall research plans and designed study oversight; HM, DK, NF, YI: conducted the research; DK, NH, TN, KI, TK, KY: provided essential reagents and materials necessary for this research; HM, MM, YF, SO: collected data and conducted statistical analysis; HM, SO: wrote the paper; and all authors: read, significantly contributed to the revision of the original draft, and approved the final manuscript.

Data Availability

The data described in the manuscript will be made available upon request and approval from the ethical committee.

Funding

This research was supported by the Shimadzu Corporation. This research is also funded by the Laboratory Medicine Research Promotion Fund.

Author disclosures

SO received financial support and equipment, drugs, or supplies from Shimadzu Corporation. All other authors report no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.01.036>.

References

- [1] N. Nikolac Gabaj, A. Unic, M. Miler, T. Pavicic, J. Culej, I. Bolanca, et al., sickness and in health: pivotal role of vitamin D, *In Sickness and in Health, Biochem. Med. (Zagreb)* 30 (2020), 020501.
- [2] M. de la Puente Yagüe, L. Collado Yurrita, M.J. Ciudad Cabanas, M.A. Cuadrado Cenzual, Role of vitamin D in athletes and their performance: current concepts and new trends, *Nutrients* 12 (2020) 579.
- [3] K. Yokoyama, A. Nakashima, M. Urashima, H. Suga, T. Mimura, Y. Kimura, et al., Interactions between serum vitamin D levels and vitamin D receptor gene FokI polymorphisms for renal function in patients with type 2 diabetes, *PLoS ONE* 7 (2012), e51171.
- [4] N. Tsugawa, A. Kuwabara, H. Ogasawara, M. Nishino, K. Nakagawa, M. Kamao, et al., Vitamin D status in Japanese young women in 2016–2017 and 2020: seasonal variation and the effect of lifestyle including changes caused by the COVID-19 pandemic, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 68 (2022) 172–180.
- [5] L.L. Brown, B. Cohen, D. Tabor, G. Zappala, P. Maruvada, P.M. Coates, The vitamin D paradox in Black Americans: a systems-based approach to investigating clinical practice, research, and public health - expert panel meeting report, *BMC Proc* 12 (Suppl 6) (2018) 6.
- [6] F. Farrokhyar, R. Tabasinejad, D. Dao, D. Peterson, O.R. Ayeni, R. Hadioonazadeh, et al., Prevalence of vitamin D inadequacy in athletes: a systematic-review and meta-analysis, *Sports Med* 45 (3) (2015) 365–378.
- [7] D. Shah, P. Gupta, Vitamin D deficiency: is the pandemic for real? *Indian J. Community Med.* 40 (2015) 215–217.
- [8] T.J. Wang, F. Zhang, J.B. Richards, B. Kestenbaum, J.B. van Meurs, D. Berry, et al., Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study, *Lancet* 376 (2010) 180–188.
- [9] S.A. Wise, J.E. Camara, C.Q. Burdette, G. Hahm, F. Nalin, A.J. Kuzak, et al., Interlaboratory comparison of 25-hydroxyvitamin D assays: Vitamin D Standardization Program (VDSP) Intercomparison Study 2 - Anal, *Bioanal. Chem.* 2 ligand binding assays - impact of 25-hydroxyvitamin D2 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 on assay performance, 25-dihydroxyvitamin D3 on assay performance 414 (2022) 351–366, 2022.
- [10] N. Binkley, D. Krueger, C.S. Cowgill, L. Plum, E. Lake, K.E. Hansen, et al., Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 3152–3157.
- [11] N. Binkley, B. Dawson-Hughes, R. Durazo-Arvizu, M. Thamm, L. Tian, J.M. Merkel, et al., Vitamin D measurement standardization: the way out of the chaos, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 173 (2017) 117–121.
- [12] C.A. Nowson, J.J. McGrath, P.R. Ebeling, A. Haikerwal, R.M. Daly, K.M. Sanders, et al., Vitamin D and health in adults in Australia and New Zealand: a position statement, *Med. J. Aust.* 196 (2012) 686–687.
- [13] C.T. Sempos, A.C. Heijboer, D.D. Bikle, J. Bollerslev, R. Bouillon, P.M. Brannon, et al., Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in vitamin D, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84 (2018) 2194–2207.
- [14] P. Glendenning, M. Taranto, J.M. Noble, A.A. Musk, C. Hammond, P.R. Goldswain, et al., Current assays overestimate 25-hydroxyvitamin D3 and underestimate 25-hydroxyvitamin D2 compared with HPLC: need for assay-specific decision limits and metabolite-specific assays, *Ann. Clin. Biochem.* 43 (2006) 23–30.
- [15] M.W. Clarke, R.C. Tuckey, S. Gorman, B. Holt, P.H. Hart, Optimized 25-hydroxyvitamin D analysis using liquid-liquid extraction with 2D separation with LC/MS/MS detection, provides superior precision compared to conventional assays, *Metabolomics* 9 (2013) 1031–1040.
- [16] G.D. Carter, J. Berry, R. Durazo-Arvizu, E. Gunter, G. Jones, J. Jones, et al., Hydroxyvitamin D assays: a historical perspective from DEQAS, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 177 (2018) 30–35.
- [17] F. Fraissinet, T. Pereira, A. Violin, G. Feugray, K. Bach-Ngohou, V. Brunel, A novel fully-automated method to measure steroids in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab* 27 (2023) 24–32.
- [18] S. Magréault, F. Jaureguy, J.R. Zahar, F. Méchaï, D. Toïnon, Y. Cohen, et al., Automated HPLC-MS/MS assay for the simultaneous determination of ten plasma antibiotic concentrations, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1211 (2022), 123496.
- [19] Y. Nagayoshi, K. Nishiguchi, R. Yamamura, T. Chujo, H. Oshiumi, H. Nagata, et al., t6A and ms2t6A modified nucleosides in serum and urine as strong candidate biomarkers of COVID-19 infection and severity, *Biomolecules* 12 (2022) 1233.
- [20] T. Robin, F. Saint-Marcoux, D. Toïnon, N. Tafzi, P. Marquet, S. El Balkhi, Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1142 (2020), 122038.
- [21] Y. Ueyanagi, D. Setoyama, D. Kawakami, Y. Mushimoto, S. Matsumoto, T. Hotta, D. Kang, Fully automated quantitative measurement of serum organic acids via LC-MS/MS for the diagnosis of organic acidemias: establishment of an automation system and a proof-of-concept validation, *Diagnostics (Basel)* 11 (2021) 2195.
- [22] T. Robin, A. Barnes, S. Dulaurent, N. Loftus, S. Baumgarten, S. Moreau, et al., Fully automated sample preparation procedure to measure drugs of abuse in plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 5071–5083.
- [23] R. Okazaki, K. Ozono, S. Fukumoto, D. Inoue, M. Yamauchi, M. Minagawa, et al., Assessment criteria for vitamin D deficiency/insufficiency in Japan: proposal by an expert panel supported by the Research Program of Intractable Diseases, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, the Japanese Society for Bone and Mineral Research and the Japan Endocrine Society [Opinion], *J. Bone Miner. Metab.* 35 (2017) 1–5.
- [24] Guideline for common reference renage of major laboratory testings in Japan, Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards (2019) [Internet] [cited December 24, 2022]. Available from: https://www.jccls.org/wp-content/uploads/2020/11/public_20190222.pdf.
- [25] K. Ichihara, J.C. Boyd, IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL), An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals, *Clin. Chem. Lab. Med.* 48 (2010) 1537–1551.
- [26] K. Ichihara, F. Ceriotti, M. Kazuo, Y.Y. Huang, Y. Shimizu, H. Suzuki, et al., The Asian project for collaborative derivation of reference intervals: (2) results of non-standardized analytes and transference of reference intervals to the participating laboratories on the basis of cross-comparison of test results, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 1443–1457.
- [27] H. Ihara, S. Kiuchi, T. Ishige, M. Nishimura, K. Matsushita, M. Satoh, et al., Surveillance evaluation of the standardization of assay values for serum total 25-hydroxyvitamin D concentration in Japan, *Ann. Clin. Biochem.* 55 (2018) 647–656.
- [28] The national health and nutrition survey in Japan 2019 [Internet], Ministry of Health, Labour and Welfare (2019) [cited December 29, 2022]. Available from: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/r1-houkou00002.html.
- [29] A.C. Ross, The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D, *Public Health Nutr* 14 (2011) 938–939.
- [30] A.C. Looker, C.L. Johnson, D.A. Lacher, C.M. Pfeiffer, R.L. Schleicher, C.T. Sempos, Vitamin D status: United States, 2001–2006, *NCHS Data Brief* (2011) 1–8. <http://refhub.elsevier.co>
- [31] M. Katrinaki, M. Kampa, A. Margioris, E. Castanas, Vitamin D levels in a large Mediterranean cohort: reconsidering normal cut-off values, *Hormones (Athens)* 15 (2016) 205–223.
- [32] D. Ferrari, G. Lombardi, G. Banfi, Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement, *Biochem. Med. (Zagreb)* 27 (2017), 030501.
- [33] R.L. Schleicher, M.R. Sternberg, A.C. Looker, E.A. Yetley, D.A. Lacher, C.T. Sempos, et al., National estimates of serum total 25-hydroxyvitamin D and metabolite concentrations measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the US population during 2007–2010, *J. Nutr.* 146 (2016) 1051–1061.
- [34] A.K. Saenger, T.J. Laha, D.E. Bremner, S.M. Sadrzadeh, Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D(2) and D(3) using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency, *Am. J. Clin. Pathol.* 125 (2006) 914–920.
- [35] K.Y. Forrest, W.L. Stuhldreher, Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults, *Nutr. Res.* 31 (2011) 48–54.
- [36] N. Tsugawa, Y. Suhara, M. Kamao, T. Okano, Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3001–3007.
- [37] A. Kuwabara, N. Tsugawa, K. Mizuno, H. Ogasawara, Y. Watanabe, K. Tanaka, A simple questionnaire for the prediction of vitamin D deficiency in Japanese adults (vitamin D deficiency questionnaire for Japanese: VDDQ-J), *J. Bone Miner. Metab.* 37 (2019) 854–863.
- [38] M. Hotta, High prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency among patients with anorexia nervosa in Japan, *Osteoporos. Int* 26 (2015) 1233.
- [39] System of social and demographic statistics prefectural data basic data Japanese government statistics [Internet], E-stat (2021) [cited June 28, 2022]. Available from: <https://www.e-stat.go.jp/en/dbview?siid=0000010102>.
- [40] K. Tanaka, A. Kuwabara, N. Tsugawa, Vitamin D in the dietary reference intakes for Japanese (DRIs) 2020, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 66 (2020) 497–501.
- [41] M. Miyauchi, H. Nakajima, Determining an effective UV radiation exposure time for vitamin D synthesis in the skin without risk to health: simplified estimations from UV observations, *Photochem. Photobiol.* 92 (2016) 863–869.
- [42] M.A. Alfhili, A.M. Basudan, M. Alfaifi, Z.A. Awan, M.R. Algethami, J. Alsughayyir, Patterns of 25-hydroxyvitamin D3, calcium status, and anemia in the Saudi population: a cross-sectional study, *Life (Basel, Switzerland)* 12 (2022) 2119.
- [43] H. You, H.R. Shin, S. Song, S.Y. Ly, Vitamin D intake and bone mineral density in Korean adults: analysis of the 2009–2011 Korea National Health and Nutrition Examination Survey, *Nutr. Res. Pract.* 16 (2022) 775–788.
- [44] M.A. Abdulrahman, S.Y. Alkass, N.I. Mohammed, Total and free vitamin D status among apparently healthy adults living in Duhok Governorate, *Sci. Rep.* 12 (2022) 1778.
- [45] A.S. Menon, R. Kapoor, S. Anayath, M.K. Garg, Vitamin D, body mass composition and metabolic risk factors in healthy young Indians, *Med. J. Armed Forces India* 77 (2021) 485–489.
- [46] R. Rafiq, F. Walschot, P. Lips, H.J. Lamb, A. de Roos, F.R. Rosendaal, et al., Associations of different body fat deposits with serum 25-hydroxyvitamin D concentrations, *Clin. Nutr.* 38 (2019) 2851–2857.
- [47] N.V. Tolan, E.J. Yoon, A.R. Brady, G.L. Horowitz, Price of high-throughput 25-hydroxyvitamin D immunoassays: frequency of inaccurate results, *J. Appl. Lab. Med.* 2 (2018) 868–879.
- [48] D. Li, L.E. Jeffery, C. Jenkinson, S.R. Harrison, R.F. Chun, J.S. Adams, et al., Serum and synovial fluid vitamin D metabolites and rheumatoid arthritis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 187 (2019) 1–8.

- [49] R.J. Singh, R.L. Taylor, G.S. Reddy, S.K. Grebe, C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxy-vitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 3055–3061.
- [50] R.C. Tuckey, C.Y.S. Cheng, A.T. Slominski, The serum vitamin D metabolome: what we know and what is still to discover, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186 (2019) 4–21.
- [51] J.C.Y. Tang, H. Nicholls, I. Piec, C.J. Washbourne, J.J. Dutton, S. Jackson, S. Jackson, et al., Reference intervals for serum 24,25-dihydroxyvitamin D and the ratio with 25-hydroxyvitamin D established using a newly developed LC-MS/MS method, *J. Nutr. Biochem.* 46 (2017) 21–29.
- [52] E. Cavalier, L. Huyghebaert, O. Rousselle, A.C. Bekaert, S. Kovacs, L. Vranken, et al., 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, *Clin. Chem. Lab. Med.* 58 (2020) 197–201.
- [53] I. Karampela, A. Sakelliou, N. Vallianou, G.S. Christodoulatos, F. Magkos, M. Dalamaga, Vitamin D and obesity: current evidence and controversies, *Curr. Obes. Rep.* 10 (2021) 162–180.