

血液中総ビタミン B₁ 定量法の微量化への試み

川崎医療短期大学

佐藤 彰 一

(昭和55年12月24日受付)

An Approach to a Semimicro Method of the Determination of Vitamin B₁ (Thiamine) in Blood

Shoichi Sato

Department of Medical Technology, Kawasaki Paramedical School

(Accepted on December 24, 1980)

従来から行なわれている血液中ビタミン B₁ 定量法は、血液(全血)を 1 ml から 5 ml 要し、定量操作も複雑であり、かつ、測定に要する時間が長いという問題点があるため臨床から測定の要望があっても日常臨床化学検査としては敬遠され勝ちな検査の一つである。そこで、定量法の微量化と測定時間の短縮を目標に定量法の改良を試みた。測定原理に関してはチオクローム蛍光法と p-アミノアセトフェノン法について吟味検討したが、操作手順は複雑だが感度の点からチオクローム蛍光法を用いることにした。測定操作については、ビタミン B₁ リン酸エステルのタカジアスターゼによる加水分解、小型カラムの使用、チオクローム抽出溶媒の種類と量およびビタミン B₁ 標準液の作り方などを吟味し、血液中ビタミン B₁ の定量が全血 0.1 ml で測定できる術式に組み上げた。その結果、本法における同一血液による10本立重々測定でも変動係数 CV=4.87% と日常検査法として使用し得るものとなった。勿論、測定に要する時間は、従来法の約70%に短縮できたことは論をまたない。なお、本法による健康人男女(20名)の血液では $\bar{x} \pm 2SD$ は $3.8 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{dl}$ であった。

Because of the inconveniences of the conventional method of thiamine determination in blood such as the minimum requirement of blood specimen from 1 ml to 5 ml, the complicated procedures and a long analytical time, it has often been omitted from the routine works of the clinical chemistry.

We have developed a semimicro method by improving the conventional method and to shorten the analytical time. The thiochrome method and the p-aminoacetophenone diazonium method were examined. In spite of its complexity, because of the superior sensitivity to the latter, the thiochrome method was employed. The items following were examined; the hydrolysis of thiamine pyrophosphate with takadiastase, the column type, the kind and the volume of the extractants, the preparation of the standard solution of thiamine, etc.

As a result, the method improved enabled us to determine the thiamine concentration in blood with 0.1 ml whole blood with its C. V. (coefficient of variation) at 4.8%. Furthermore, the time required was shortened to approxi-

mately less than 40% that of the conventional method, and the $\bar{x} \pm 2SD$ by this method was 3.68 ± 1.3 g/dl for the whole blood in 20 healthy men and women.

はじめに

血液中のビタミン B₁ 定量は、その含量が健康人で $6 \sim 12 \mu\text{g/dl}$ ¹⁾ と少ないため、相当に感度の高い測定法で計られなければならない。そのため、一般に広く用いられている定量法には、ビタミン B₁ をアルカリ性フェリシアンカリ ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)²⁾、ブロムシアン (BrCN)^{2), 3)} や塩化水銀 (HgCl_2)⁴⁾ で酸化するチオクローム蛍光法を中心としたものが多い。これらの方法はいずれも、数多くの操作段階を必要とする点と、使用血液量が 1 ml ³⁾、多い場合には 5 ml ^{2), 5)} も必要とすることが、日常臨床化学検査としての隘路となっている。

私達は、諸ビタミン B₁ 定量法について、発色の感度、呈色の安定性等を追試したところ、p-アミノアセトフェノンを用いる反応系⁶⁾ では感度不足の点で実用化することが不可能と判断し、チオクローム蛍光法を用いた血液中、ビタミン B₁ 定量の微量化を試みることにした。その結果、操作段階の省略化は余り出来なかったが、全血 0.1 ml での定量が可能となった。と同時に、測定にまつわる 2~3 の興味ある知見を得たので報告する。

1. 試 薬

1) ビタミン B₁ 基準液：和光純薬工業 K.K. ビタミン B₁ 標準液 ($500 \mu\text{g/ml}$) を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で希釈して使用した。

2) 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)：酢酸ナトリウム $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g に酢酸 7.2 ml を加え、水を追加し 1 l とした。

3) パームチット：和光純薬工業 K.K. 活性ビタチェンジ (ビタミン B₁ 定量用) を使用した (但し、前処理操作⁷⁾ は省略した)。

4) タカジアスターゼ溶液：三共 K.K. ビタミン B₁ 定量用 タカジアスターゼ 1 g を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 100 ml に溶解し、一旦、パームチットカラムに通し、タカジアスターゼ

中に含有するビタミン B₁ を除去したものをを用いた。

5) 25% KCl-HCl 溶液：塩化カリウム 250 g を水に溶かし、さらに塩酸 8.5 ml を加え、水で 1 l とした。

6) 10% メタリン酸溶液：メタリン酸 10 g を水に溶解し、 100 ml とした。

7) 30% NaOH 溶液：水酸化ナトリウム 30 g を水に溶かして 100 ml とし、そのまま使用した。

8) ブロムシアン (BrCN) 溶液：水 100 ml に臭素 2 ml を加え、さらに 10% チオシアン酸カリウム溶液を臭素がなくなるまで加えた。

9) カラム：エルマ・ミニカラム (エルマ光学 K.K.) と称するプラスチック製カラムを使用した。

2. 定 量 操 作

1) 前処理操作

水 2.0 ml を試験管に採量し、抗凝固剤としてヘパリンを添加して得た血液 0.1 ml を正確に加えてよく洗い出し、溶血させる。これに 1% タカジアスターゼ溶液 5 ml を混じり、 45°C 、30分間加温し、血中に存在するビタミン B₁ のエステルであるリン酸エステル型チアミンを遊離型チアミンに加水分解する。さらに、 1N HCl 0.5 ml を加えて、沸騰浴中で 15分間加熱後、10% メタリン酸溶液 5 ml を添加し、 $3,000 \text{ rpm}$ 遠心分離を 8分間行ない、上清 10 ml を採る。

2) カラム処理操作

カラムとしてはプラスチック製エルマ・ミニカラムを使用。水に浮遊させたパームチットをカラムにある刻線 B まで充填しておく。これに上記の除蛋白液 (上清) 10 ml を添加し、ビタミン B₁ を吸着させ、続いて、水 25 ml を添加し、血中の夾雑物を除去する。さらに、 100°C に加熱した 25% KCl 溶液を 15 ml 正確に添加し、パームチットに吸着したビタミン B₁ を完

全に脱着させる。

3) 酸化・抽出操作

上記のカラム処理操作より得たビタミン B₁ 含有液を 5.0 ml ずつ 2 本の試験管に移しとる。一方の試験管にブロムシアン溶液 3.0 ml を添加し、続いて 30% NaOH 溶液 5.0 ml を加えて、ビタミン B₁ を酸化させ、チオクローム化する (Sample)。他方の試験管には逆に 30% NaOH 溶液 5.0 ml を加え、その後ブロムシアン溶液 3.0 ml を添加し、盲検 (Blank) とする。続いて、両試験管に 2-プロパノール 5 ml ずつを加えてよく攪拌後、プロパノール層を励起波長 365 nm, 蛍光波長 430 nm で蛍光測定し、Sample 値-Blank 値を求め、検量線にあてはめてビタミン B₁ 含有量を求める。

なお、検量線はビタミン B₁ 標準液 (500 µg/ml) を 0.2 M 酢酸緩衝液で 0, 5, 15, 20 µg/dl に段階希釈し、それぞれを 0.1 ml ずつ採り、血液と同様に前処理操作をはじめとする全ての操作を行なって、ビタミン B₁ のチオクローム化を行ない、その蛍光強度を測定して検量線を描く。

3. 結果および吟味

1) チオクローム抽出溶媒の検討

ビタミン B₁ はアルカリ性ブロムシアン液により酸化され、チオクロームとなり蛍光を発する。このチオクロームを有機溶媒で抽出し、その蛍光強度を測定することによりビタミン B₁

の定量がなされる。そこで各種有機溶媒について抽出効果を検討し、Table 1 のごとき結果を得た。すなわち、1-プロパノール (1-propanol) から 1-ヘキサノール (1-hexanol) までの 5 種のアルコール類では Sample-Blank (S-B) 値がほぼ同じ値を示しており、充分チオクロームを抽出することが判明した。しかし、他の有機溶媒では S-B 値が低く、ことに炭化水素系のベンゼン (benzene)、トルエン (toluene)、ヘキサン (hexane) 等ではほとんど抽出しないことが解った。一方、アルコール系においても、1-プロパノール、2-プロパノールを除いては抽出液層に混濁がみられた。この混濁は無水硫酸ナトリウムを加えるか、遠心分離操作を行なえば除去は可能であるが、出来るだけ操作段階を簡略化するために本法では 2-プロパノール (イソプロピルアルコール) を用いることにした。

2) パームチット使用量の検討

従来からの方法は、一般には藤田²⁾ のパームチット管と称するガラス製コック付カラムが繁用されているが、本法ではプラスチック製カラム (エルマ・ミニカラム) を使用した。本カラムには二本刻線があり、充填するパームチット量は、下部刻線で約 0.5 g, 上部刻線で約 1 g つめられるように作られている。この 2 点でビタミン B₁ の吸着について検討したところ、標準ビタミン B₁ 液の 10 µg/dl から 20 µg/dl 溶液の各 0.1 ml を添加すると 0.5 g のパームチット量ではビタミン B₁ が十分吸着されないが、1.0 g 以上の場合は、ほぼ完全に吸着されることが判明した。したがって、パームチット量は上部刻線 (約 1 g) まで充填することにした。

3) カラム処理操作時における洗浄操作の検討

カラム処理時における盲蛍光物質の除去操作について、従来法^{2), 3), 5)} で実施されている水に

Table 1 各種有機溶媒によるチオクローム抽出効果

有機溶媒	分離時間(分)	抽出液層の性状	Sample(S)	Blank(B)	S - B
1-Propanol	1	清 澄	84.6	22.9	61.7
2-Propanol	1	"	80.7	17.4	63.1
1-Butanol	2	白 濁	84.0	20.0	64.0
1-Pentanol	2	"	127.1	67.1	60.0
1-Hexanol	2	"	303.0	240.3	62.7
Ethyl Acetate	1	清 澄	58.4	44.3	14.1
Acetone	1	"	70.4	24.6	45.8
Ethyl Ether	1	"	49.4	40.1	9.3
Benzene	1	"	39.6	38.4	1.2
Toluene	2	"	42.9	43.8	-0.9
Hexane	2	"	102.5	104.5	-2.0

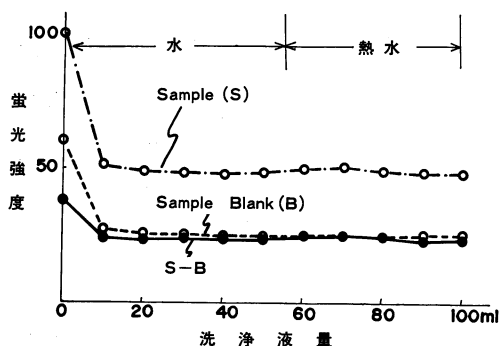


Fig. 1. カラム処理における水洗浄及び熱水洗浄の検討

よる洗浄およびそれに続く熱湯水による洗浄の効果を検討した。結果は Fig. 1 にみられるように、血液中に存在する盲蛍光物質は、水洗浄を 20~30 ml 行なうだけで十分除去されることが観察された。したがって、前処理操作を行なって得たサンプルをカラムに添加したのちは、熱水洗浄は省略し、水 25 ml のみで盲蛍光物質をとり除く操作とした。

4) カラム処理時に用いる 25% KCl 溶液 (ビタミン B₁ 脱着剤) の必要量の検討

カラム処理において、パームチットに吸着されたビタミン B₁ は、25% KCl 溶液の添加により脱着され溶出する。従来法のように、熱 KCl 液で脱着させる場合と、常温の KCl 液で脱着させる場合とのビタミン B₁ 脱着状態を比較したところ、Fig. 2 の結果を得た。すなわち、

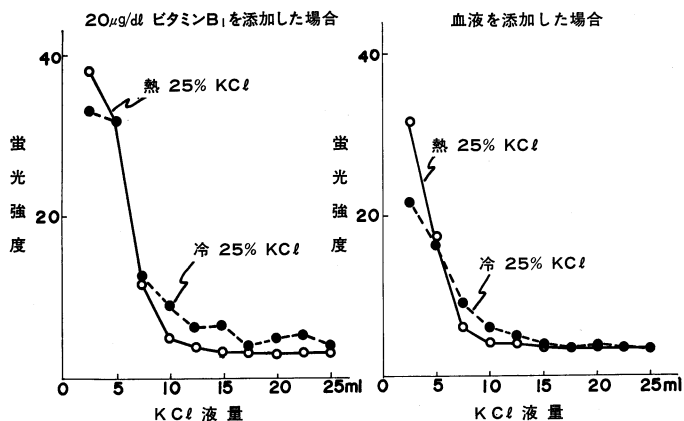


Fig. 2. カラム操作における脱着剤 (25% KCl) の必要量の検討

常温水 KCl 液ではかなりのテーリング (tailing) が認められるが、熱 KCl 液では 15 ml で十分ビタミン B₁ は脱着されていることが確認された。したがって、本法ではビタミン B₁ 脱着には従来通り熱 KCl 液を用い、その量は 15 ml とした。

5) ホスファターゼ処理における反応時間の検討

血液中のビタミン B₁ はそのほとんどがチアミンピロリン酸 (TPP) などのエステル型で存在しており、これをホスファターゼで加水分解し、遊離型チアミンにしなくてはチオクローム化した後、有機溶媒で抽出出来ない。ほとんどの従来法では、タカジアスターゼに含有するホスファターゼを応用しているため、本法においてもタカジアスターゼを用いて、この加水分解に要する反応時間を検討した。市販の TPP を用いて 45°C で反応させたところ、20 µg/dl TPP は 30 分間で十分加水分解されることが確認できた。なお、文献⁹⁾によれば 1.8 M 酢酸緩衝液でタカジアスターゼを溶解するような記載があったが、追試した結果では 0.2 M 酢酸緩衝液でも十分目的を達することが判明したので、本法では 0.2 M 酢酸緩衝液を用いることにした。

6) 基準液用ビタミン B₁ 溶液の安定性

ビタミン B₁ は、水溶液にするとかなり不安定な物質である。私達は、ビタミン溶液を水あるいは 0.001 NHCl で段階希釈を行ない検量線を作製すると、検量線の直線性が得難いことに遭遇した。この原因を追求したところ、ビタミン B₁ の水または 0.001 NHCl 溶液はガラス容器内では安定性に欠けることを確認した。Fig. 3 に見られるように、水および 0.001 NHCl で調製したビタミン B₁ 溶液はガラス試験管に移し替える度にその含量が減少している。しかし、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) および 25% KCl 溶液 (カラム

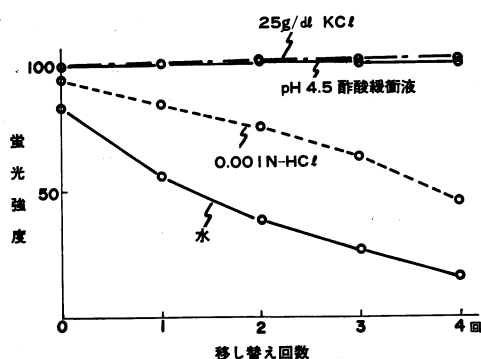


Fig. 3. ガラス試験管移し替えによるVB₁の安定性の検討

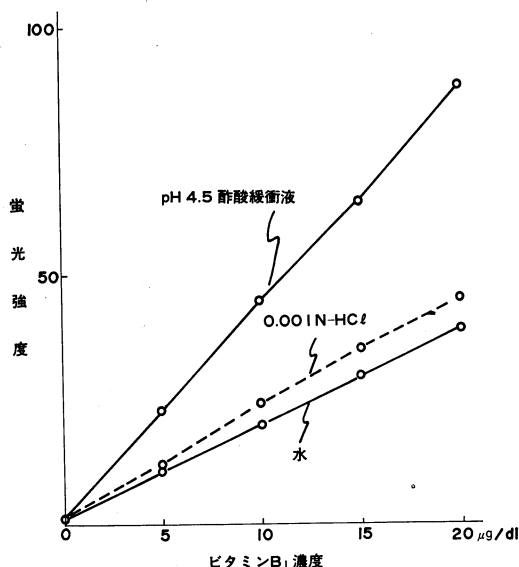


Fig. 4. 各種希釈溶液による検量線の相違

操作に用いられるため検討した)を用いて調製すると安定していることが判明した。したがって、水、0.001 N HCl および 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) でビタミン B₁ 溶液を希釈して検量線を描くと Fig. 4 のような結果となり、検量線用に用いる溶液により、測定値がかなり変動することが確認できた。以上のことから、本法では万木等⁸⁾ が記載しているように酢酸緩衝液 (pH 4.5) を用いることにした。

7) 正常値の検討

従来から血中ビタミン B₁ の正常値に関しては、諸家がそれぞれの値を記載しているが、その値はあまり一定していない。その代表例を2

～3 列举すると

ビタミン B 研究特別委員会¹⁾: 全血 6～12 µg/dl

藤田²⁾: 全血 4.3～5.2 µg/dl

横峯ら⁹⁾: 全血 6.81±3.12 µg/dl

柴田¹⁰⁾: 全血 6～18 µg/dl

なお、私達が測定した18歳から21歳の健康人男女(20名)では、0.001 N HCl で希釈作製した検量線から求めた全血のビタミン B₁ 濃度 $\bar{x} \pm 2SD$ は $5.36 \pm 2.0 \mu\text{g/dl}$ 、上記の酢酸緩衝液で作製した検量線では $3.8 \pm 1.3 \mu\text{g/dl}$ と前記諸家の正常値と比較し、かなり低値の結果を得た。これらの結果のみで正常値の吟味は危険であるが、最近の若者では健康人といえども従来の正常値と比較して低値を示す傾向を村田ら¹¹⁾ も指摘していることから、更なる的確な追試が必要と思われる。なお、本法を用いて臨床患者40名に関し血中ビタミン B₁ 値を測定したところ、2.7 µg/dl から 419 µg/dl までの血中濃度を示しており、低値を示した患者においても脚気症状はみられず、逆に高値を示す患者はいずれもビタミン B₁ の薬剤投与を受けていた。

8) その他

本法での同一血液における10本立重々測定は変動係数 $CV = 4.87\%$ であり、26検体の武田薬品 K. K. 品質管理部法との相関は $y = 1.20x + 0.73$ となり、本法の検量線用基準液の蛍光強度が高目に出ることから、測定値は20%程度低い結果となった。なお、相関係数は0.96であった。しかし、両法とも同一の酢酸緩衝液で希釈した標準液を用いた場合は、 $y = 0.95x + 0.42$ 、相関係数0.96が得られたことを付記する。

4. 結 論

血中ビタミン B₁ 測定に関し、チオクローム法について0.1 mlの血液での測定ができるよう工夫した。また、測定操作の省略化を試みたが、カラム操作における血中盲蛍光物質の除去には熱水洗浄は不要で、水25 mlのみで十分であることが立証し得た以外は従来法通りとし

た。

チオクローム抽出溶媒は1-プロパノールまたは2-プロパノールが適当であり、分離用パームチット（和光純薬 K. K. ピタチェンジ）量は各カラムごと1gで十分であり、また前洗浄は省略できることが確認できた。

検量線用ビタミンB₁標準液は0.2 M 酢酸緩衝液で段階希釈することが、水や希塩酸よりも安定がよいが、検量線の傾きが大きくなり、本

法における正常値が $3.8 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{dl}$ と従来よりも低い値が得られた。

謝 辞

本法を完成するにあたり、多大のご援助をいただいた武田薬品 K. K. 品質管理部の方々および終始適切な御指導、御校閲を賜った川崎医療短期大学副学長佐々木匡秀先生をはじめ御援助をいただいた川崎医大内科講師野村信丞先生および同内科講師守本研二先生に厚くお礼申しあげます。

文 献

- 1) ビタミンB研究特別委員会：健康日本人血液ビタミンB₁量に関する中間報告。ビタミン 1：246—246, 1948
- 2) 藤田秋治：ビタミン定量法。東京，南江堂。1975, pp. 215—253
- 3) 武田薬品 K. K. 編：臨床総ビタミンB₁定量法。pp. 1—8
- 4) 勝又増幸：チアミンに関する研究第二報水銀塩によるチオクローム生成について。生化学 28：368—371, 1956
- 5) 大杉邦栄，五十嵐孔一，木葉徳安：血液，尿中チアミン，チアミンピロリン酸およびチアミンジスルフィドの自動分析法。ビタミン 48：295—305, 1974
- 6) 川崎近太郎：ビタミン。東京，岩波書店。1955, pp. 134—136
- 7) 能勢善嗣，田代敏夫：Permutit を用いるビタミンB₁定量法について（第1報）純水液および尿中ビタミンの定量。生化学 21：130—134, 1949
- 8) 万木庄次郎，他：生化学実験講座13巻。東京，南江堂。1975, pp. 77—84
- 9) 横峯涼子，他：健康人のビタミンB₁代謝に関する生化学検査。ビタミン 52：89—95, 1978
- 10) 柴田長夫：臨床検査技術全書第6巻 臨床化学II。東京，医学書院。1975, pp. 645—648
- 11) 村田希久，浅野真知子：自炊女子学生の尿並びに血中ビタミンB₁。ビタミン 52：290—291, 1978