

〈原著〉

ガスクロマトグラフィー質量分析による 血清遊離グリセロール測定

森田 温¹⁾、山浦 洵^{2),3)}、佐藤 友¹⁾、堀 敦詞^{2),3)}、
上原 剛⁴⁾、渡部 俊之⁵⁾、三井田 孝⁶⁾、日高 宏哉⁷⁾

Measurement of free glycerol concentration in human serum using gas chromatography mass spectrometry

Sunao Morita¹⁾, Makoto Yamaura^{2),3)}, Tomo Satoh¹⁾, Atsushi Hori^{2),3)},
Takeshi Uehara⁴⁾, Toshiyuki Watanabe⁵⁾, Takashi Miida⁶⁾ and Hiroya Hidaka⁷⁾

Summary Free glycerol in human serum is primarily produced by the hydrolysis of triacylglycerol (TAG), but its kinetics and physiological function in the bloodstream remain unclear. To assess the relationship between free glycerol and TAG concentrations in human serum, we developed a free glycerol measurement method using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

Free glycerol was obtained from the methanol-containing water layer using a modified Folch extraction method. Trimethylsilyl derivatives were measured using GC-MS. Reproducibility and linearity were measured with excellent precision. Free glycerol concentrations in the fasting serum of healthy subjects were $76.4 \pm 12.5 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm standard deviation). No correlation was observed between free glycerol and TAG levels in the serum.

This study showed that the measurement method using GC-MS was efficient in estimating free

¹⁾ 信州大学大学院医学系研究科 検査技術科学分野

²⁾ 信州大学大学院医学系研究科 医療生命科学分野

³⁾ 信州大学医学部附属病院 臨床検査部

⁴⁾ 信州大学医学部 病態解析診断学

⁵⁾ 東邦大学医療センター佐倉病院 臨床検査部

⁶⁾ 順天堂大学大学院医学研究科 臨床検査医学

⁷⁾ 信州大学医学部保健学科 生体分子情報検査学

^{1)-4),7)} 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1

⁵⁾ 〒285-8741 千葉県佐倉市下志津564-1

⁶⁾ 〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1

¹⁾ Department of Clinical Laboratory Investigation, Shinshu University Graduate School of Medicine.

²⁾ Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine.

³⁾ Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital.

⁴⁾ Department of Laboratory Medicine, Shinshu University School of Medicine.

⁵⁾ Clinical Laboratories, Toho University Sakura Medical Center.

⁶⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine

⁷⁾ Department of Clinical Laboratory Science, Shinshu University School of Medicine and the Graduate School of Medicine.

^{1)-4),7)} 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano Prefecture, 390-8621, Japan

⁵⁾ 564-1 Shimoshizu, Sakura, Chiba Prefecture, 285-8741, Japan

⁶⁾ 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8421, Japan

受付日：2017年8月15日

採択日：2017年9月11日

glycerol concentrations in human serum and that free glycerol concentrations in the fasting serum of healthy subjects may not reflect TAG metabolism.

Key words: glycerol, acylglycerol, triacylglycerol, gas chromatography mass spectrometry

I. 緒言

トリアシルグリセロール (TAG) は単純脂質であり、1分子のグリセロールに3分子の脂肪酸がエステル結合した構造のアシルグリセロールである。TAGは生体での主要なエネルギー源の一つであり、血中ではリポプロテインリパーゼ (LPL) や肝性トリグリセライドリパーゼによって加水分解されて、アシルグリセロール、グリセロール、遊離脂肪酸 (FFA) を生じる。

血清中TAG濃度の高値は、冠動脈性心疾患 (CHD) のリスクファクターであり、メタボリックシンドロームや食後TAG血症など様々な脂質代謝異常に関与していることが報告されている^{1),2)}。一方、TAG代謝産物のグリセロールは、細胞内での糖新生に関与するが、血液中での役割は十分に明らかでない。さらにグリセロールは、浸透圧利尿薬として腎不全の予防、脳浮腫・脳圧/眼圧の亢進の治療に適用されるため、血中濃度など臨床検査への影響が示唆されている³⁾。また、血清TAGの測定方法としてはLPL、グリセロールオキシダーゼを利用した酵素法で測定されるが、遊離グリセロールをTAG濃度を含めて測定するか、または遊離グリセロールを消去して測定するか、国際的に標準化の同意は得ていない⁴⁾。

これまで、遊離グリセロールは単にTAGの代謝産物と考えられており、血液中での機能や代謝について十分に検討されていない。しかし、TAGの代謝機序の検討において、TAGの代謝産物を網羅的に測定することにより、TAGの水解機序や食後高TAG血症などの発症機序などを明らかにすることができる。そのため、現在我々は、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) を用いたTAGおよびその一連の代謝産物の簡便で測定性能の高い臨床検査測定系の構築を試みている。今回の研究では、グリセロールをトリメチルシリル化誘導し、GC-MSでの遊離グリセロール測定法を構築し、血清TAGと遊離グリセロールの関係性を検討した。

II. 材料および方法

1. 試薬

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用メタノール、HPLC用クロロホルム、特級ピリジン、トリメチルシリル化剤としてGC用*N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) は和光純薬工業から得た。¹³C₃-グリセロールはCambridge Isotope Laboratories, Inc. から得た。

2. 材料

成人健常者ボランティアの空腹時血清は信州大学医学部倫理委員会 (承認番号: 3491) によって承認されたプロトコルにしたがって採取し、完全匿名化したものを用いた。

3. 方法

1) 血清分離

12時間以上、食事を控えた成人健常者ボランティアから血液をプレーンの真空採血管に採取後、室温にて凝固させ、1800 gで10分間の遠心分離の後に、血清をプラスチックチューブに分離した。血清サンプルは分析まで -80 °C で保存した。

2) 抽出

血清 (500 μL) にグリセロール内部標準物質 (¹³C₃-Glycerol 126 μg/mL) 40 μLとクロロホルム/メタノール (2/1 v/v) 5 mLを加え激しく攪拌した後、蒸留水1 mLを加え優しく5回転倒混和し、1400 gで10分間遠心分離した。遠心分離後、上層を分取し濃縮遠心機にて乾固した。

3) トリメチルシリル (TMS) 化誘導

乾固したグリセロール分析試料にピリジン70 μLとBSTFA 50 μLを加えて、80 °Cで120分間反応させ後に、液温が室温になるまで冷却した。

4) ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)

TMS化された試料は電子イオン化 (EI) 源を持つGCMS QP2010 (島津製作所、京都) にてイオン源温度: 200 °C、電子エネルギー: 70 eV、ポジティブイオンモードにて測定した。GC-MSインジェクターはスプリッドレスモード、温度280 °C、GC-MS インターフェイス温度は280 °Cとした。キャリアガスとしてはヘリウムを使用し、流量は0.22 mL/minとした。GCキャピラリーカラムは90 % Cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (BPX90: 膜厚: 0.25 μm、長さ: 60.0 m、内径: 0.25 mm) (SGE Analytical Science Pty. Ltd社、オーストラリア) を使用した。グリセロール測定の上昇プログラムは、オープン温度を100 °Cとし、280 °Cまで9 °C/minで上昇させ5分間ホールドさせた。

Ⅲ. 結果

1. 血清中遊離グリセロールの検出

成人健常者の空腹時血清500 μLを用いて分析した結果、リテンションタイム (RT): 8.74 分にトリメチルシリルエステルグリセロールのTIC (total ion chromatogram) ピークが検出された (Fig. 1)。また、¹³C₃-グリセロールをTMS化しGC-MSで測定したところ、同様にRT: 8.74 分にてTICピークが検出された。それぞれのEI

イオン化におけるフラグメントイオンのマススペクトラムを示した (Fig. 2-A, B)。血清遊離グリセロールと¹³C₃-グリセロールの主な4本のフラグメントイオンピークは、グリセロールの構造式の解裂点で生じるフラグメントに相当したためグリセロールと同定した (Fig. 2-C)⁵⁾。

2. 血清中遊離グリセロールの定量

Fig. 2-A, B に示した血清遊離グリセロールのフラグメントイオンの $m/z=205$ と内部標準物質の¹³Cを2つ含む $m/z=207$ のピーク強度を比較することによってグリセロールの定量を行った。成人健常者 (平均23歳、n=20 TG: 361 ~ 4618 μmol/L) の血清中遊離グリセロール濃度は、男性 (n=10); 75.6 ± 12.8 μmol/L、女性 (n=10); 77.1 ± 12.7 μmol/Lであった。

3. 測定性能

血清遊離グリセロール濃度の同時再現性を成人健常者の血清と、グリセロール高値を得るために37 °Cで8時間加温した血清で検討した。正常血清の平均及び標準偏差 (SD) は105.7 ± 6.7 μmol/L (変動係数: CV= 5.8 %)、加温血清では151.7 ± 4.1 μmol/L (CV=2.7 %) であった。キャリアレーションは、一定量の内部標準品 (126 μmol/L) に対して、グリセロール標品 (137 μ

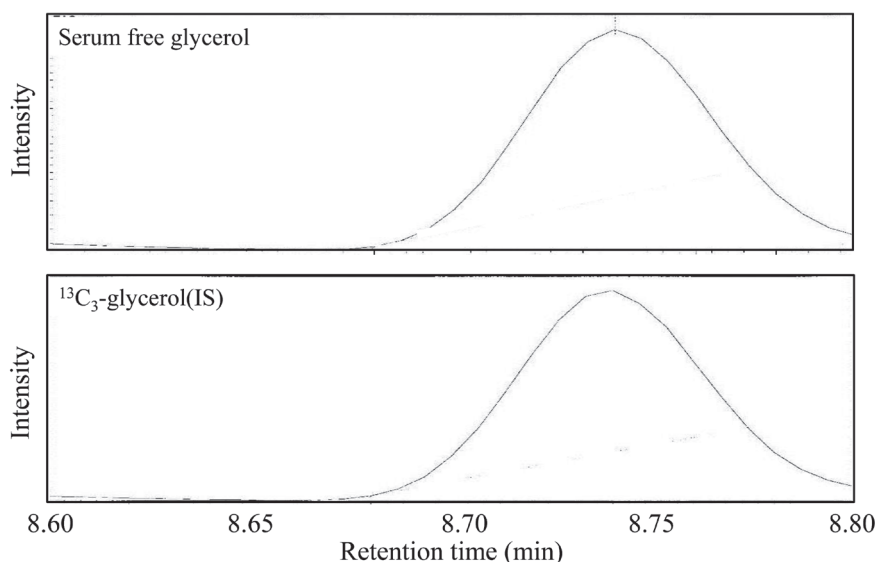


Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of trimethylsilylated glycerol

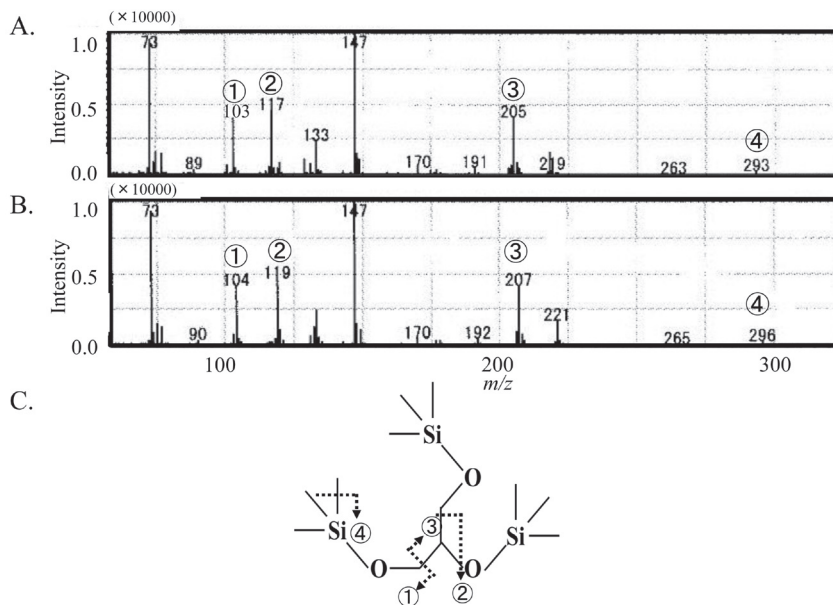


Fig. 2 Electron ionization mass spectrometry (EI-MS) fragmentation of trimethylsilylated (TMS-) glycerol. EI mass spectra of TMS-glycerol (A) and TMS-¹³C₃-glycerol (B). EI-MS fragmentation scheme of TMS-glycerol (C).

mol/L) の濃度 (x) を変化させたときのピーク強度 (y) の関係で検討した (Fig. 3-A)。その結果、 $y = 22.8x - 103.9$ であった。また、血清を用いてグリセロール測定の新規直線性を検討し

た結果、 $y = 118.0x + 6.1$ の回帰直線 (y: グリセロール濃度、x: 希釈率) が得られ (Fig. 3-B)、240 $\mu\text{mol/L}$ まで良好な直線性が得られた。

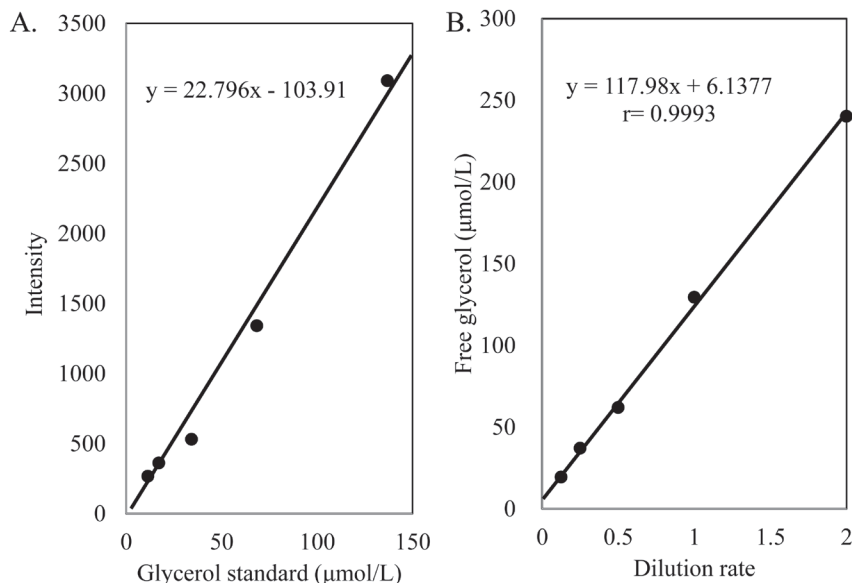


Fig. 3 Calibration (A) and dilution linearity (B) of free glycerol measurement

4. 血清TAGと遊離グリセロールの相関

成人健常者20名における空腹時血清のTAG濃度と遊離グリセロール濃度の相関を検討した (Fig. 4)。成人健常者には、未治療の血清TAG濃度高値の者が含まれていた。血清TAGが361 ~ 4618 $\mu\text{mol/L}$ に対して、遊離グリセロールは、52 ~ 102 $\mu\text{mol/L}$ の範囲にあり、回帰式は、 $y = 0.0001x + 76.2$ 、相関係数は $r = 0.009$ と無相関であった。

Ⅳ. 考察

今回の研究は、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法を用いて、血清中の遊離グリセロールの定量分析法を構築し、空腹時血清中のTAG濃度と遊離グリセロール濃度は関連しないことを明らかにした。

血清TAGと遊離グリセロールが相関関係になかったことは、摂食時のTAG異化時を除き、空腹時では血清TAG異化とは別に、グリセロール濃度を維持する機序の存在が考えられた。しかし、血清中の遊離グリセロールの動態については、十分に明らかでない。遊離グリセロールの由来としては、浸透圧利尿の目的で頭蓋内圧亢進・頭蓋内浮腫治療、眼圧降下治療などに用いられているグリセロール剤の影響や³⁾、ヘパリン治療中患者においては、遊離されるLPLによるTAG水解の影響が示唆されている⁴⁾。また、脂肪細胞由来の遊離グリセロールはカテコール

アミンの反応によって増加し、インスリンの反応によって減少することが報告されている⁶⁾。これは、細胞内外の水分の調整蛋白であるアクアポリン (AQP) 13種のうち、4種 (AQP3、AQP7、AQP9、AQP10) がグリセロール透過性を示し、特に、AQP7、AQP9が、ヒトグリセロール代謝に関与している^{7), 8)}。血清中の遊離グリセロールの動態には、血清TAGと脂肪細胞からのTAG代謝が影響していることが考えられ、肥満度や内臓脂肪量、さらには内分泌系との関連を考慮する必要がある。

脂質代謝の検査においては、単項目の測定だけでなく他の項目との関連性や対象物質の代謝系、すなわち基質や代謝産物などを網羅的に測定することが重要である。我々は、これまでGC-MSによるTAGおよびその一連の代謝産物について、簡便で測定性能の高い臨床検査に応用可能な測定系を構築している。遊離グリセロールの測定法としては、既に自動分析装置による酵素法⁴⁾や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法⁹⁾、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 法¹⁰⁾などが報告されている。前者は、操作が簡便で迅速に定量ができるが、一部の方法で干渉の影響を受けやすいことが報告されている¹¹⁾。HPLC法は内部標準品の問題、LC-MSはカラムの平衡化や質量分析電極の保守など操作が煩雑である。それぞれの方法による遊離グリセロールの測定には、一長一短がある。今回用いたキャピラリーカラムによる方法

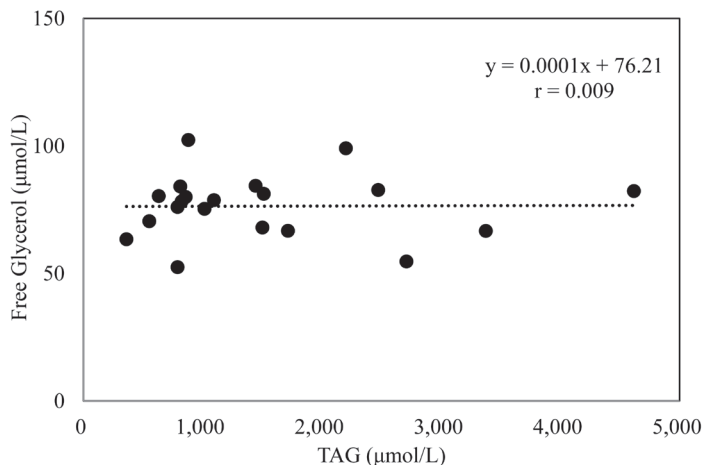


Fig. 4 Correlation between fasting serum free glycerol and triacylglycerol concentrations

は、昇温プログラムの変更だけで、TAGの代謝産物としてのモノアシルグリセロール(MAG)、ジアシルグリセロール(DAG)、遊離脂肪酸の分子組成を連続測定ができる利点がある。

血清TAG濃度の自動分析装置での酵素法測定において、遊離グリセロールをTAG濃度に含めるか、遊離グリセロールを消去して測定するか血清TAG測定標準化として問題となっている。血清遊離グリセロール濃度は約76 $\mu\text{mol/L}$ で、酵素法におけるTAG濃度に換算すると約6 mg/dLであり、これは遊離グリセロールを自動分析による酵素法測定の報告とほぼ一致し⁴⁾、TAG濃度としては無視できない濃度である。今回の結果から血清遊離グリセロール濃度が必ずしも空腹時血清TAG代謝を反映していない可能性を考慮すると、血清TAG濃度測定としては、遊離グリセロール消去法が好ましいと考えられた。

今回の検討から血中遊離グリセロール測定は、血中TAGの代謝物としてだけでなく、薬剤の影響や、脂肪細胞からの分泌、グリセリン脂質などの血中TAG以外の代謝物として捉える必要があると考えられた。GC-MSによる血清遊離グリセロール測定は、その濃度変化と病態機序やアシルグリセロール代謝との関連性を検討するうえで、有用な分析法になると期待される。

V. 結語

今回、GC-MSを用いて血清遊離グリセロール濃度を良好な性能で測定することができた。空腹時の遊離グリセロール濃度はTAG濃度とは関連しないことを明らかにした。本法は、遊離グリセロールの血流中での動態解析や、病態との関連性に応用できる。

VI. 謝辞

本研究は、本研究はJSPS科研費JP15K08624の助成を受けたものです。

文献

- 1) Stalenhoef AF: Serum triglycerides as a risk factor for atherosclerosis. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 143: 284-287, 1999.
- 2) Piřha J, Kovář J and Blahová T: Fasting and nonfasting triglycerides in cardiovascular and other diseases. *Physiol Res*, 64: 323-330, 2015.
- 3) 園田信五、加藤淳子、前田信司: グリセロールを含む脳圧降下薬が酵素を用いた血清中性脂肪測定に及ぼす影響. *臨床検査*, 27: 809-811, 1983.
- 4) 山本 肇、佐竹奏一、二本柳洋志、石幡哲也、折笠ひろみ、小熊悠子、高田直樹、齋藤市弘: 遊離グリセロール未消去による総グリセライド測定の検討、中性脂肪測定国際標準化を見据えた基礎検討. *医学検査*, 65: 209-215, 2016.
- 5) Dwards SH, Stribling SL, Pyatt SD and Kimberly MM: Reference measurement procedure for total glycerides by isotope dilution GC-MS. *Clin Chem*, 58: 768-776, 2012.
- 6) Lafontan M and Langin D: Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48: 275-297, 2009.
- 7) 前田法一: アクアポリンとグルセロール代謝. *肥満研究*, 12: 9-18. 2006.
- 8) Maeda N: Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Mol Aspects Med*, 33: 665-675, 2012.
- 9) Li H, Dong J, Chen W, Wang S, Guo H, Man Y, Mo P and Li J: Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res*, 47: 2089-2096. 2006.
- 10) Dong Y, Ma Y, Yan K, Shen L, Wang X, Xu Y, He G, Wu Y, Lu J, Yang Z and Feng F: Quantitative analysis of glycerol levels in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 957: 30-35, 2014.
- 11) Klotzsch SG and McNamara JR: Triglyceride measurements; a review of methods and interferences. *Clin Chem*, 36: 1605-1613, 1990.