

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05186

研究課題名(和文) 数 $\mu$ Lの血液中の脂肪酸を存在状態別に迅速定量するマルチステップ反応熱分解法の開発

研究課題名(英文) Rapid and highly sensitive determination of fatty acids in human blood by multistep reactive pyrolysis

研究代表者

石田 康行 (Ishida, Yasuyuki)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：70273266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微量の血清中に含まれる脂肪酸の定量分析を、その存在状態も区別しながら行う迅速分析法を開発した。方法論としては、これまで申請者が開発・改良に関わってきた「反応熱分解分析法」に、反応性の異なる各種メチル化試薬との多段階反応を採り入れた「マルチステップ反応熱分解法」を利用した。この新規分析法の開発により、数マイクロリットルのごく微量の血清中に含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などの多価不飽和脂肪酸を、30分以内の短時間で簡便に分析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DHAやEPAなどの多価不飽和脂肪酸は様々な疾病に対して予防効果を発揮したり、疾病リスクを知らせる指標として利用できる。従って、血中のPUFAの種類や量を分析することにより、将来の疾病発症リスクを把握し、その予防をはかるために欠かせない情報が得られる。本研究では、微量の血清中に含まれるPUFA成分を迅速かつ簡便に分析する技術開発に成功した。この技術を集団検診での血清分析に応用すれば、脂肪酸の分析結果を基にして誰もが疾病リスクに関する豊富な情報を得ることができ、ひいては健康長寿社会の実現に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：A new technique was developed in order to analyze a series of fatty acids in a few micro liters of human serum samples with discriminating free and esterified fatty acids. Here, we used a new type of reactive pyrolysis-gas chromatography (reactive Py-GC) improved by adopting two-step reactions with different organic alkalis. By applying this technique, a series of highly saturated fatty acids (PUFAs), such as EPA and DHA, were determined rapidly (less than 30 min) and precisely.

研究分野：分析化学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 血清 高感度分析 DHA EPA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸の中には様々な疾病に対して予防効果を発揮したり、疾病リスクを知らせる指標として利用できたりするものが存在する。例えば、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの脂肪酸 (二重結合を複数個含むため多価不飽和脂肪酸: PUFA と呼ばれる) は、心筋梗塞や大動脈瘤などの重篤な疾病に対して高い予防効果をもつ [Lee, A. et.al., Nutr. Dietary Suppl. 2011, 3, 93-100]。さらに、それらの脂肪酸の存在状態 (図1参照) も重要な因子である。例えば、インスリンの分泌量が減ると、血中の遊離型の脂肪酸 (酸のままの状態) が増えるため、その型の脂肪酸量は糖尿病のリスクマーカーとして利用できる [Karpe, F. et. al., Diabetes 2011, 60, 2441-2449]。従って、血中の PUFA を含む脂肪酸の種類や量を存在状態別に分析することにより、将来の疾病発症リスクを把握し、その予防をはかるために欠かせない情報が得られる。

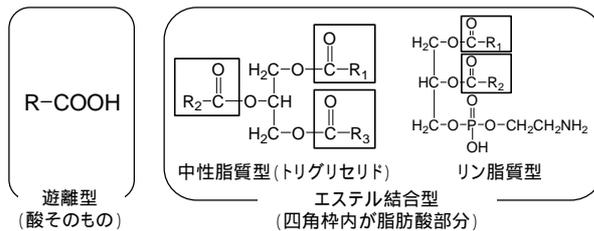


図1 脂肪酸の存在状態 (R は炭化水素基)

こうした中で申請者は、集団検診の検査項目に血清中の脂肪酸の種類、量や存在状態を加えれば、誰もが疾病リスクに関する豊富な情報を得ることができ、ひいては健康長寿社会の実現に貢献できることに着眼した。しかしながら、現在用いられている血清中の脂肪酸の分析法では、数時間に及ぶ長い試料前処理操作が必要であるだけでなく、多量 (数 mL) の血清試料が必要であり、被験者への身体的負担も大きい (健康診断での採血を苦手とする人は少なくない)。そのため、血清中の脂肪酸を集団検診の検査項目に加えるためには、以下の 1) ~ 3) の要求を満たした、脂肪酸の状態ごとの分析法の開発が不可欠である。

- 1) 多検体分析に求められる迅速性と簡便性を実現すること。
- 2) 被験者の肉体的負担の軽減を図るため、微量の血清試料を使って分析可能とすること。
- 3) 重要な健康因子である脂肪酸の存在状態の情報も得られること。

2. 研究の目的

本研究では、微量の血清中に含まれる脂肪酸の定量分析を、その存在状態も区別しながら行う迅速分析法を開発することを目的とする。方法論としては、これまで申請者が開発・改良に関わってきた「反応熱分解分析法」に、反応性の異なる各種メチル化試薬との多段階反応を採り入れた「マルチステップ反応熱分解法」を新たに考案し、これを利用する。さらに、この方法を、高速分離カラムを搭載したガスクロマトグラフィー (GC) と連結し、この計測システムの精度や正確さの評価試験を行う。これらの実施により、以下の3条件を満たし、集団検診において血清中の脂肪酸分析法として実際に利用できる分析法の開発とその性能評価を期限内に行うことを目指す。

- 1) 最短で 30 分以内で血清中の脂肪酸の存在状態別の定量を可能にする。
- 2) 数  $\mu\text{L}$  のごく微量の血清で分析可能とする。
- 3) 脂肪酸の量だけでなく、存在状態についての情報も獲得できる方法を構築すること。

3. 研究の方法

3.1. マルチステップ反応熱分解システムの開発

図2に示すように、血清試料と試薬の入った試料カップをマイクロ反応炉内に導入した後、脂肪酸のメチル化/気化を、まず遊離型 (Step 1)、次いでエステル結合型 (Step 2) の順で行える反応系を構築する。ここでは、Step 1 の遊離型の反応ではメチル化のみ行う試薬 (四級アンモニウム塩など) を、また Step 2 のエステル型の反応では加水分解とメチル化の両方を引き起こす試薬 (有機強塩基など) を使用する。これにより、脂肪酸成分をその存在状態 (遊離型またはエステル型) を区別しながら分析することを可能

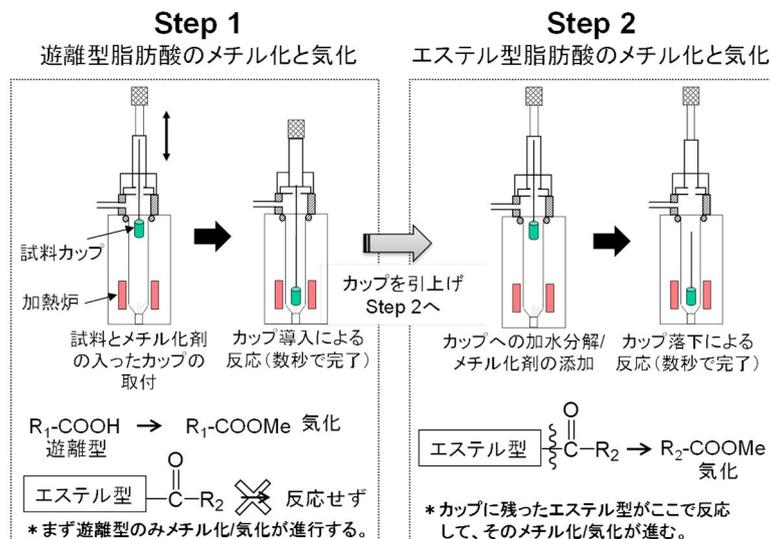


図2 遊離型とエステル結合型脂肪酸の連続反応システム

にする。

### 3.2. 高速ガスクロマトグラフィー（高速 GC）システムとの連結

マルチステップ反応系を、内径の細い高速分離カラムを搭載した GC 装置と連結して、反応熱分解の各ステップで生じた脂肪酸メチルをオンラインで高速 GC 分離できるシステムを構築する。さらに、GC の昇温プログラムやキャリアーガス流量等を適正化して、30 分以内で一連の脂肪酸類の分析を完了できる分離条件を確立する。

### 3.3. マルチステップ反応熱分解 GC システムの性能評価

開発した計測法により実際の血清試料中の脂肪酸を分析し、内部標準法を利用してそれらの定量分析を行う。さらに、本手法により得られる結果を、従来法による値と比較して、開発した分析法の正確さや精度の評価を行う。

## 4. 研究成果

### 4.1. マルチステップ反応熱分解法による脂肪酸成分の形態別解析

まず、脂肪酸成分を存在状態（遊離型またはエステル型）ごとに分析可能な、マルチステップ反応熱分解法の各種条件の検討を行った。ここでは反応試薬としては、ステップ 1 では、遊離脂肪酸のメチル化のみを引き起こす酢酸テトラメチルアンモニウム（TMAAc）を、また、ステップ 2 ではエステル結合の加水分解とそれに引き続くメチル化反応の双方を有機できる水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）を選択した。装置構成としてはマイクロ反応炉を備えたガスクロマトグラフ/質量分析計（熱分解 GC/MS）を使用した。測定手順としては、まず、TMAAc 存在下で試料成分を一旦反応熱分解 GC 測定し、試料中の遊離脂肪酸成分を一旦分析し（以上がステップ 1）、次いで、試料カップ中に TMAH を添加した後、再度反応熱分解 GC 測定し、今度はエステル結合型の脂肪酸成分の検出を行う（以上がステップ 2）方策を採用した。各ステップにおける反応条件（反応温度および反応時間）を最適化した結果、ステップ 1 では 300 °C において 10 秒間、ステップ 2 では 400 °C 下での反応を通じて脂肪酸成分が最も高効率に対応するメチル化体に変換されることを見出した。これらの条件下で脂質試料を 2 段階方式で反応熱分解 GC/MS 測定して得られたクロマトグラム上には、それぞれ遊離型およびエステル型の脂肪酸成分が選択的かつ高感度に観測された。以上のように、遊離型およびエステル型の 2 種類の脂肪酸成分を区別しながら定量できる、2 段階反応系を構築することができた。

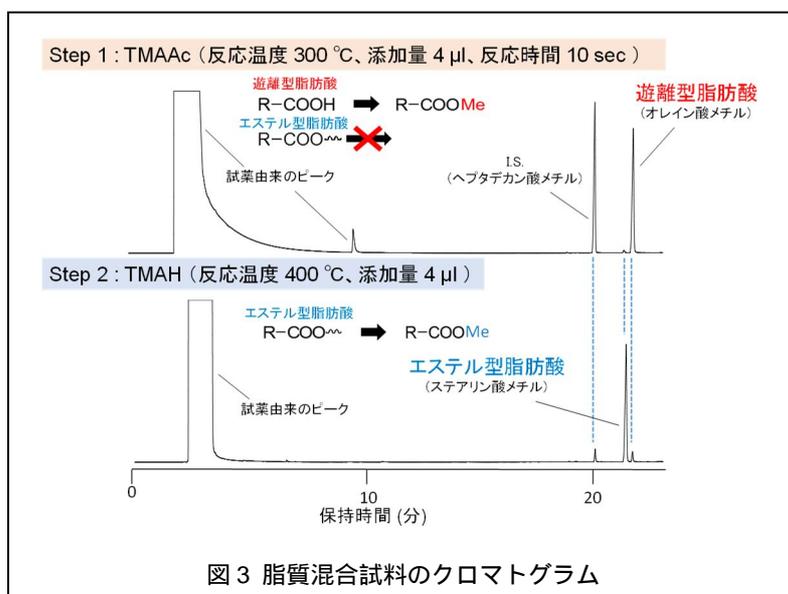


図 3 脂質混合試料のクロマトグラム

### 4.2. 脂肪酸成分の反応熱分解効率の向上についての検討

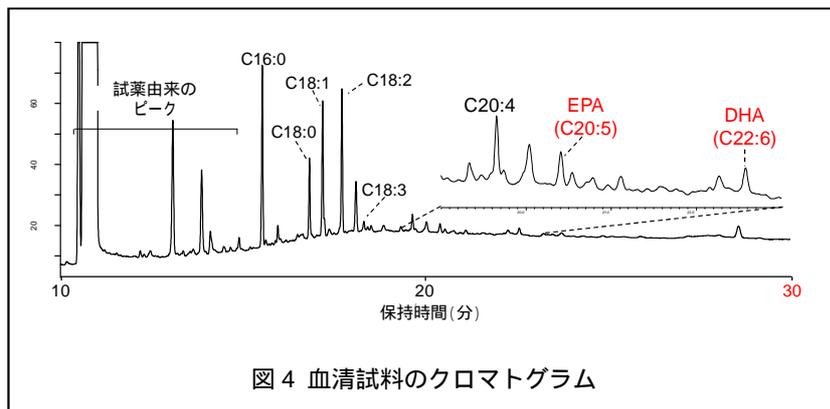
各種の脂質標準試料を用いて、反応熱分解における脂肪酸の反応効率の評価試験を行った。その結果、今回開発した化学反応場は、一部の PUFA 成分については加水分解およびメチル化をまったく引き起こせないことが判明した。具体的には、遊離型、トリグリセリド型およびリン脂質型の PUFA 成分については反応熱分解を誘起できるが、コレステリルエステル型については全く反応を引き起こせないことが明らかになった。

そこで、コレステリルエステルについても作用する、新しい化学反応場の構築を試みた。具体的には、1) 様々な化学試薬の探求、2) 反応温度や試薬の導入量などの反応条件最適化、および 3) キャリアーガス流量や注入口条件などの GC 関連条件の最適化を行った。その結果、反応試薬として高い有機効果と共鳴効果を併せ持つアンモニウム塩型の有機アルカリを選択し、温度および導入量をそれぞれ 300 および 2000 倍（試料成分に対する試薬の物質質量比）に設定したところ、コレステリルエステル中の脂肪酸成分を 50%以上の回収率でもって分析できることを見出した。

### 4.3. 血清中の PUFA 成分の高感度分析

4.2.にて新たに構築した化学反応場を高分解能 GC と連結し、その計測システムを利用して実際の血清試料（1 µl）の分析を行った。その結果得られたクロマトグラムを図 4 に示す。このクロマトグラム上には、パルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸に加えて、アラキドン酸

(C20:4) エイコサペン  
タエン酸 (EPA) および  
ドコサヘキサエン酸  
(DHA) のような PUFA 成  
分も約 30 分以内の測定  
時間でもってはっきり  
と観測された。そこで、  
これらのピーク強度から、  
n-3 と n-6 系列の  
PUFA の比率 (n-6/n-3  
比) を算出した。得られ  
た測定値は従来法によ  
る値と非常に良好な相  
関 (決定係数は 0.9994)



を示した。さらに、本手法によるデータの相対標準偏差は 7 % 以下 ( $n = 5$ ) となり、検体間での脂肪酸組成の差異を評価するにあたって十分な再現性を得ることができた。以上のように、本手法により、わずか  $1 \mu\text{l}$  の血清に含まれる EPA や DHA などの PUFA 成分の化学組成を約 30 分という比較的短時間で簡便に分析することを可能にした。

さらに、この方法論に、初年度に開発した 2 段階式の反応熱分解を採用することにより、脂肪酸類を形態別に検出することも試みた。上述したように、反応試薬としてステップ 1 では、遊離脂肪酸のメチル化のみを引き起こす酢酸テトラメチルアンモニウム (TMAAc) を、また、ステップ 2 ではエステル結合の加水分解とそれに引き続くメチル化反応の双方を誘起できる水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) を選択した。その結果、糖尿病のマーカーとして利用が期待される、遊離型の脂肪酸成分をエステル型の成分を区別して、検出することに成功した。さらに、得られたピーク面積を基にして、一連の脂肪酸成分を形態別に定量することも可能になった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaname Tsutsumiuchi, Yasuyuki Ishida, ほか15名	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.0c07948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 古田汐里、高桑裕史、中村貞夫、石田康行	4. 巻 69
2. 論文標題 トランス脂肪酸の迅速かつ簡便な分析を可能にする反応熱分解場の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.69.179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Siti Baidurah, Paramasivam Murugan, Khok Yong Sen, Yoko Furuyama, Mina Nonome, Kumar Sudesh, Yasuyuki Ishida	4. 巻 137
2. 論文標題 Evaluation of Soil Burial Biodegradation Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on the Basis of Change in Copolymer Composition Monitored by Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Analytical and Applied Pyrolysis	6. 最初と最後の頁 146-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaap.2018.11.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石田康行
2. 発表標題 反応熱分解GCによる 血中の高度不飽和脂肪酸成分の高感度分析 - 1 $\mu$ Lの血清中のEPAやDHAを迅速に分析する試み -
3. 学会等名 日本分析化学会中部支部2020年度愛知地区講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 康行、古田 汐里、宮澤 大介、渡辺 杏
2. 発表標題 1 $\mu$ lのヒト血清中に含まれるEPAおよびDHAの反応熱分解GCによる精密分析
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相場天音、石田康行
2. 発表標題 反応熱脱着GCによる微量血清中に含まれる多価不飽和脂肪酸の高感度分析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部はやの、石田康行
2. 発表標題 2段階反応熱分解GCによるショウジョウバエ1匹における脂肪酸代謝の分析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田千恵、肥後朋夏、石田康行
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸を特異的に生産する微細藻類の反応熱分解GCによる成分組成解析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田麻理奈、石田康行
2. 発表標題 2段階反応熱分解GCによる油の硬化反応を活かした日本の伝統材料の構造解析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本多亘、大谷肇、榊原みなみ、寺澤陸、堤内要、石田康行、西野雅之、西山浩司、五百磐稔、石橋諒
2. 発表標題 熱分解GC/MSによるクチナシ青色素の分子構造キャラクタリゼーション
3. 学会等名 第25回高分子分析討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西祥弘、尾張優介、石田康行
2. 発表標題 生体試料中の脂肪酸成分を存在状態ごとに分析できるツーステップ反応熱分解法の開発
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第19回高山フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多 亘、榊原 みなみ、石田 康行
2. 発表標題 熱分解GC/MS によるクチナシ青色素の分子構造キャラクタリゼーション
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第19回高山フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 康行、伊藤 颯飛、諏訪 光彦、Siti Baidurah, Paramasivam Murugan, Kumar Sudesh
2. 発表標題 反応熱分解GC による細菌細胞中の生分解性コポリエステルの化学組成および連鎖分布の直接解析
3. 学会等名 第24回高分子分析討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田汐里、蟹藤さとみ、石田康行、加藤泰彦、渡邊 肇
2. 発表標題 腸内細菌がミジンコの卵の脂肪酸組成に及ぼす影響の反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる解明
3. 学会等名 日本油化学会第58回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田汐里、石田康行、宮澤大介
2. 発表標題 数 $\mu$ lのヒト血清に含まれる多価不飽和脂肪酸成分の反応熱分解GCによる精密組成分析
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田康行
2. 発表標題 ミジンコ 1 匹の脂肪酸分析から見えてくること、分かること
3. 学会等名 日本分析化学会中部支部北陸講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Lydia Mohamad, Khok Yong Sen, Fitree Dina, Hadura Abu Hasan, Kumar Sudesh, Yasuyuki Ishida, Siti Baidurah
2. 発表標題	Direct Determination of Biologically Extracted Polyhydroxybutyrate by Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography
3. 学会等名	ISPAC 2019 (32nd International Symposium on Polymer Analysis and Characterization) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	古田汐里、石田康行、高桑裕史、中村貞夫
2. 発表標題	食用油脂中のトランス脂肪酸の反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる迅速定量法の開発
3. 学会等名	日本分析化学会 第79回分析化学討論会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	石田康行
2. 発表標題	反応熱分解分析法による生体試料中の脂肪酸成分の迅速解析
3. 学会等名	日本生物工学会2018年度 第9回学際的脂質創生研究部会講演会 (招待講演)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	諏訪光彦・伊藤颯飛・石田康行
2. 発表標題	反応熱分解GCによる細菌産生型の高性能コポリエステルの連鎖分布の解析
3. 学会等名	「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第18回高山フォーラム
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 蟹藤さとみ・古田汐里・石田康行
2. 発表標題 腸内細菌の有無がミジンコの脂肪酸成分に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会 第18回高山フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田康行・加藤広志朗・小島貴大・曾我部啓介
2. 発表標題 反応熱分解GCによる共重合型ポリヒドロキシアルカノエートの2連子分布の解析
3. 学会等名 第23回高分子分析討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田汐里・服部由美・石田康行
2. 発表標題 マルチステップ反応熱分解GCによる伝統和式カーペット「油団」に含まれる油脂のネットワーク構造の解析
3. 学会等名 第23回高分子分析討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田康行・加藤広志朗・小島貴大
2. 発表標題 加水分解効率を制御した反応熱分解分析法による共重合型ポリヒドロキシアルカノエートの2連子分布の解析
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田汐里・服部由実・石田康行
2. 発表標題 マルチステップ反応熱分解GCによる伝統和式カーペット「油団」の物性発現メカニズムの解明
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田康行・岡田恭輔・林諒・池西孝文・松井秀和・橋田奈々美・木藤伸夫
2. 発表標題 キイロシヨウジョウバエ1個体における脂肪酸組成の反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる高感度解析
3. 学会等名 日本油化学会第57回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田汐里・石田康行
2. 発表標題 生体試料中のトランス脂肪酸の迅速定量を目指した反応熱分解場の構築
3. 学会等名 日本分析化学会 中部支部・近畿支部 合同夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuyuki Ishida
2. 発表標題 Selective Thermochemolysis-Gas Chromatography of Natural Organic Compounds in the Presence of Various Organic Alkali Reagents
3. 学会等名 22nd International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis (Pyro2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Baidurah, P. Murugan, Y. S. Khok, K. Sudesh, Y. Ishida
2. 発表標題 Biodegradation Mechanism of Polyhydroxyalkanoates Studied by Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography
3. 学会等名 22nd International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis (Pyro2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮澤 大介  (Miyazawa Daisuke)  (70434553)	金城学院大学・薬学部・准教授   (33905)	
研究分担者	岩崎 雄吾  (Iwasaki Yugo)  (50273214)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------