

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550089

研究課題名（和文） 複合動態解析に基づくメタボリックシンドローム評価法の開発

研究課題名（英文） Method Development for Assessing the Progression of Metabolic Syndrome by Multiplex-dynamic Analysis of Compounds of Biological Importance

研究代表者

楠 文代 (KUSU FUMIYO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70057371

研究成果の概要（和文）： 糖脂質代謝に関与する多種類の生体成分の複合動態解析を可能ならしめる分析システムを開発し、新たなメタボリックシンドローム評価法の基礎を確立した。血中 FFA、ステロール類などを高感度・高精度に定量できる分析システムは、病態モデル動物の血中動態分析へ適用でき、実用性に優れることを明らかにした。さらに、統計学的観点に基づく動態データの解析法を開発した。

研究成果の概要（英文）： The multiplex analytical methods for determining compounds of biological importance were developed to examine the progression of metabolic syndrome. Dynamic analyses of plasma free fatty acids, cholesterol, and pathologically important sterols in animal model of disease were performed by sensitive and precise HPLC with electrochemical detection. Moreover, a novel analytical strategy based on statistics aspect was shown to be applicable to examine the interaction between free fatty acids and blood glucose level. It was concluded that the present methods were useful various kinetic studies in clinical fields.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：メタボリックシンドローム、コレステロール、遊離脂肪酸、電気化学分析

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、インシュリン抵抗性を基礎とした病態の代謝症候群であり、飽食や生活習慣の変化・高齢化を抱えた我が国では、約2千万人がメタボリックシンドローム又はその予備軍と考えられている。メタボリックシンドロームの診断項目と

して、ウエスト周囲径、血中のトリグリセリド、血中の高比重リポタンパク・コレステロール（HDL-C）、血圧、空腹時の血糖、アルブミン尿などがあるが、アメリカ糖尿病学会や欧州糖尿病学会などでは、これらの診断基準には欠陥がありとする議論や討論が行われている。

このように、現行のメタボリックシンドロームの診断基準のあいまいさには、メタボリックシンドロームが代謝に着目した疾患でありながら、トリグリセリド、HDL-C、空腹時血糖などが1点の測定値であり、それらの日内変動などの動態に着目していない背景があると考えられる。そこで、的確な基準を設け信頼性に優れた診断を下すためには、インシュリン抵抗性に直接関係する血糖と脂質などの生体成分の動態分析が不可欠あり、これを実践するための高感度・高精度分析法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、糖脂質代謝に関与する多種類の生体成分の複合動態解析に基づくメタボリックシンドローム評価法を新たに開発することを目的とする。本研究は、次の3段階からなる。

(1) 糖脂質代謝に関与する生体成分の分離定量法の確立

糖脂質代謝に関与する生体成分として、グルコース、トリグリセリド、FFAs (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸)、コレステロール、ステロール類などの定量法を確立する。メタボリックシンドローム評価法として、分析システムを確立するためには、最終的に、ヒトが摂食等通常の生活を行いながら1日数回の指尖頭毛細管血の自己採血したサンプルを分析できる方法でなければならない。すなわち、 μL オーダーの試料量で精度良く定量できる方法として開発・改良を行う。

(2) 健常ラット及び1型糖尿病モデルラットの糖脂質代謝に関与する生体成分の動態解析

標準血清を用いて、血糖、血中のFFAs、コレステロール類、トリグリセリドについて、クリーンアップ、加水分解などの前処理、電気化学検出 HPLC を含む分析の手順を確立する。電気化学検出 HPLC の分析法バリデーションも実施し、開発した分析システムの性能を評価するとともに改良を図る。

次にラット或いはマウスを対象として、これらの成分の日内変動を追跡し、メタボリックシンドロームを反映する動態変化を明らかにする。

(3) 動態データ解析法の確立

糖脂質代謝に関与する生体成分の動態分析によって得られる時間-濃度プロファイルから、動態パラメータを得る。さらに、新たな解析手段として統計学的方法を導入する。すなわち、血糖値、数種のFFAs、コレステロールのそれぞれにつき周期性を調べる自己相関の解析、血糖値とFFAなど2成分間の相関解析法を開発し、健常ラット及び1型糖尿病モデルラットでの特徴を明らか

にする。

3. 研究の方法

(1) アイソクラティック電気化学検出 HPLC

コレステロール、酸化ステロール、コレスタノール、ラソステロールなどのステロール類の定量のために、アイソクラティック電気化学検出 HPLC を開発した。

移動相には、過塩素酸リチウムを支持電解質として含むアセトニトリル溶液を用いた。カラムには、Develosil C30 或いは YMC-Pak ODS-AL を使用した。

各ステロール類の測定電位は、 $+1.9\text{ V vs. Ag/AgCl}$ (酸化ステロール)、 $+2.9\text{ V vs. Ag/AgCl}$ (コレスタノール)、 $+2.8\text{ V vs. Ag/AgCl}$ (ラソステロール) に設定し、作用電極にはグラッシーカーボンを使用した。一方、コレステロールの測定電位は、 $+2.4\text{ V vs. Ag/AgCl}$ に設定し、ボロンドープダイヤモンドを使用した。

(2) ポストカラム電気化学検出 HPLC

FFA の定量のために、移動相とカラムからなる分離系にキノン試薬溶液を合流させるポストカラム電気化学検出 HPLC を開発した。移動相には、アセトニトリル-エタノール (80:20) 混液、キノン試薬溶液には 3,5-ジ-*tert* ブチル 1,2 ベンゾキノンと過塩素酸リチウムを含むアセトニトリル-エタノール (80:20) 混液を用いた。カラムには Develosil C30 UG を用いた。電解セルの作用電極にはグラッシーカーボンを用い、測定電位は $-0.09\text{ V vs. Ag/AgCl}$ とした。

(3) カラムスイッチング電気化学検出 HPLC

大豆イソフラボンの定量のためにポンプ2基、スイッチングバルブ、トラップカラムに Capcell pak C18 UG120 ($50 \times 1.0\text{ mm i.d.}$)、分析カラムに Capcell pak C18 UG120 ($150 \times 1.0\text{ mm i.d.}$) 2本、電気化学検出器2基、記録計を用いてカラムスイッチング電気化学検出 HPLC を開発した。

試料溶液注入17分後にスイッチングバルブを切替え、移動相：水/メタノール/リン酸 (70:30:0.5) 混液を用いてダイジンとゲニスチンを、移動相：水/メタノール/リン酸 (50:50:0.5) 混液を用いてダイゼインとゲニステインをトラップカラムから各々の分析カラムへ溶出させた。電解セルの作用電極には、グラッシーカーボンを用い、測定電位は $+0.9\text{ V vs. Ag/AgCl}$ にとした。

(4) 実験動物

1型糖尿病モデルラットは、Wistar 系ラット (雄、8週齢) にアロキサンを腹腔内投与して作製した。マルトース及び糖尿病治療薬は、16時間絶食したラットに経口投与した。高ラソステロール食ラットは、Wistar 系ラ

ット(雄、8週齢)に0.2%ラソステロール及び10%紅花油を含むラット用食餌を6日間与えて作製した。

高コレスタノール食マウスは、BALB/c系マウス(雄、4週齢)に1%コレスタノールを含むマウス用食餌を2週間与えて作製した。

ラットの血液は尾静脈から採血し、マウスの血液は心臓から採血した。得られた血液は血清またはヘパリンで処理して血漿とし、各種生体成分の定量に使用した。

4. 研究成果

(1) 糖脂質代謝に関与する生体成分の高感度・高精度分析法の確立

① 遊離脂肪酸(FFA)

FFAは糖脂質代謝に関与する重要物質であるが、生理的因子により影響を受けやすい、簡易な分析法がないことを理由に、病態把握を目的とした測定は行われてこなかった。本研究では、病態把握に適応できる分析法として、FFAを簡便かつ微量サンプルで測定できる電気化学検出HPLCを開発した。具体的には、キノンの電解還元に基づく酸検出を利用したポストカラム電気化学検出HPLCを開発した。5種類のFFAのピークはクロマトグラム上に、約30分以内に得られ、そのピーク高さはFFA量3.75~850 pmolの範囲で相関係数0.999以上の直線性を示した。本法は、血中FFAの動態分析を行う上で、十分な感度と精度を有することを示した。

② 酸化ステロール

メタボリックシンドロームの終末像である心筋梗塞は、冠動脈における動脈硬化を基盤として発症する。動脈硬化の原因と考えられている酸化LDL(低比重リポタンパク質)に含まれる動脈硬化惹起性物質のうち、コレステロールの酸化体である酸化ステロール(7種)に注目して、電気化学検出HPLCによる分析法を開発した。本法は、12.5~250 pmolの範囲で相関係数0.999以上の直線性を示し、日内及び日間変動の相対標準偏差(RSD)3%以下の、高感度かつ高精度な測定が可能であった。ヒト血清から超遠心法によって精製したLDLを銅(II)イオンで処理して酸化LDLを調製し、本法を用いて酸化ステロールを一斉分析したところ、回収率78.0%以上、RSDが3.0%以下であった。本法は、酸化LDLの動脈硬化惹起性のメカニズムの解明に有用な手法となると考えられる。

③ コレスタノール

コレスタノールは、コレステロールの5 α -還元体である。脳腱黄色腫症患者では、ステロール27位水酸化酵素の障害によって血清中コレスタノールが高値を示す。本研究では、コレスタノールの電気化学検出HPLCを用いて高コレスタノール食負荷ラットの血中

コレスタノールの定量を行い、本測定法が脳腱黄色腫症の有益な診断法として適用できることを示した。

④ 大豆イソフラボン

大豆イソフラボンは抗動脈硬化作用を有するが、その脂質代謝に及ぼす影響を明らかにするためには、感度に優れた動態分析方法を開発する必要がある。本研究では、ピコグラムレベルのイソフラボンを定量できる電気化学検出HPLCを開発し、ラット血中イソフラボンの定量へと応用した。

(2) 健常ラット及び1型糖尿病モデルラットの糖脂質代謝に関与する生体成分の動態解析

① 簡易採血法の確立と血液試料の取り扱いにおける頑健性の評価

本分析システムが、メタボリックシンドロームの診断基準に用いられる診断法として臨床へ適応されるには、ヒトが摂取等通常の生活を行いながら1日数回、指尖頭毛細血管から自己採血した血液がサンプルとして分析でき、実用性と汎用性に優れることを示す必要がある。そこで、動態分析に先立って、簡易採血法の確立と血液試料の取り扱いを含む前処理方法の検討を行った。

その結果、健常人より穿刺器具で採血した数十 μ Lの血液で、食後の血糖値・血中FFA・血中トリグリセリドの同時モニタリングの実施に成功した。特に、血中FFA測定時に行う前処理方法はエーテル抽出だけであり、LC/MS等の分析法に比べて簡便かつ容易である。これより、頑健性に優れた前処理方法を確立できた。

② 動態解析用電気化学検出HPLCの分析バリデーションの実施

本分析システムが的確なメタボリックシンドロームの診断法とするために、動態解析用電気化学検出HPLCに対して、分析バリデーションを行って改良を重ねた。ラソステロールの新規電気化学検出HPLCの分析バリデーションを実施し、定量分析法としての信頼性に優れていることを示した。

また、コレステロールの電気化学検出HPLCに対しては、確率論的観点に基づくノイズ解析法が活用できることを示した。本ノイズ解析法は、感度と精度を容易に評価できる手法であることが判った。

③ 1型糖尿病モデルラットにおけるFFAの動態分析への応用

本分析システムを1型糖尿病モデルラットの血中FFAの動態分析へ応用した。1型糖尿病モデルラットの血中オレイン酸は健常ラットに比べて著しく高濃度であった。インスリンを静脈内投与したところ、1時間後に血糖値とFFAは顕著に減少し、健常ラットとほぼ同じレベルを7時間後まで維持できた。

本法は、FFA の糖尿病に対する影響の解明や糖尿病治療薬を評価する分析法として有用であると考えられる。

(3) 動態データの統計学的解析方法の開発

本分析システムを用いて、健常ラット、1型糖尿病モデルラット、高脂質食負荷ラットについて糖脂質代謝に関与する生体成分の動態解析を行い、得られたデータの統計学的解析を試みた。ここでは、マルトース負荷後の1型糖尿病モデルラットについて、血中 FFA と血糖値の時間-濃度プロファイルを用いた統計学的解析結果を示すこととする。

血中 FFA の自己相関では、アラキドン酸のみに自己相関が観察された ($r > 0.3$, $\tau = 0.5 \sim 3$ h)。血中 FFA と血糖値の2成分間における相互相関では、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸について相互相関が観察され ($r > 0.5$, $\tau = 1.5 \sim 2$ h)、約2時間前の血糖値が血中 FFA 濃度に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① K. Hojo, H. Hakamata, F. Kusu, Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B*, 査読有, 879, 2011, 751-755.
DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.02.017
- ② M. Hasegawa, H. Hakamata, I. Matsunaga, F. Kusu, Detection of oxysterols in oxidatively modified low density lipoprotein by MALDI-TOF MS, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 査読有, 113, 2011, 423-429
DOI: 10.1002/ejlt.201000366
- ③ A. Kotani, H. Hakamata, N. Nakayama, F. Kusu, Picomole level determination of cholesterol by HPLC with electrochemical detection using boron-doped diamond electrode after performance assessment based on the FUMI theory, *Electroanalysis*, 査読有, 23, 2011, 2709-2715
DOI: 10.1002/elan.201100223
- ④ K. Hojo, H. Hakamata, A. Takahashi, Y.Y. Hosokawa, F. Kusu, Determination of serum cholestanol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Biomed. Chromatogr.*, 査読

有, 24, 2010, 600-605

DOI: 10.1002/bmc.1332

- ⑤ N. Itoh, H. Hakamata, F. Kusu, Simultaneous determination of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Methods*, 査読有, 2, 2010, 174-179
DOI: 10.1039/B9AY00195F
- ⑥ D. Matsumoto, A. Kotani, H. Hakamata, K. Takahashi, F. Kusu, Column-switching high-performance liquid chromatography with two channels electrochemical detection for high-sensitive determination of isoflavones, *J. Chromatogr. A*, 査読有, 1217, 2010, 2986-2989
DOI: 10.1016/j.chroma.2010.02.050
- ⑦ I. Matsunaga, H. Hakamata, K. Sadohara, K. Kakiuchi, F. Kusu, Determination of oxysterols in oxidatively modified low-density lipoprotein by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Biochem.*, 査読有, 393, 2009, 222-228
DOI: 10.1016/j.ab.2009.06.032
- ⑧ K. Yamamoto, H. Hakamata, A. Yamaguchi, F. Kusu, An LC method for monitoring medium-chain fatty acid permeation through CaCo-2 cell monolayers, *Anal. Bioanal. Chem.*, 査読有, 395, 2009, 533-538
- ⑨ A. Kotani, Y. Miyaguchi, M. Kohama, T. Ohtsuka, T. Shiratori, F. Kusu, Determination of short-chain fatty acids in rat and human feces by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Sci.*, 査読有, 25, 2009, 1007-1011.
DOI: 10.2116/analsci.25.1007

[学会発表] (計10件)

- ① 袴田秀樹, 小谷 明, 楠 文代, コレステロールの電解酸化を利用する生体試料中のステロールの定量, 第57回ポーラグラフィックおよび電気分析化学討論会, 2011年12月1日(於 沖縄県男女共同参画センター・沖縄県)
- ② 佐藤由季, 小谷 明, 楠 文代, イオン排除型セミマイクロカラムを用いた電気化学検出 HPLC による便中有機酸の定量, 第55回日本薬学会関東支部大会,

- 2011年10月8日（於 東邦大学・千葉県）
- ③ 杉山秀人, 小谷 明, 楠 文代, セミミクロカラムを用いた電気化学検出 HPLC による血中遊離脂肪酸のモニタリング, 第 55 回日本薬学会関東支部大会, 2011年10月8日（於 東邦大学・千葉県）
 - ④ 楠 文代, バイオメディカル実分析を志向した電気化学分析法の開発, 日本分析化学会第 60 回年会, 2011年9月15日（於 名古屋大学・愛知県）
 - ⑤ 林 優子, 袴田秀樹, 楠 文代, 胆汁酸代謝関連物質の電気化学検出 HPLC, Separation Sciences 2010, 2011年8月31日（於 幕張メッセ・千葉県）
 - ⑥ F. Kusu, A. Kotani, K. Takamura, H. Hakamata, Electrochemical determination of weak acids based on the reduction of quinone, International Symposium on Electroanalytical Chemistry (Shikata Discussion 2011) 2011年5月27日（於 淡路夢舞台国際会議場・兵庫県）
 - ⑦ 松本大吾, 小谷 明, 楠 文代, 電気化学検出 HPLC による大豆イソフラボン定量における分析時間の短縮, 第 56 回ポータログラフイーおよび電気分析化学討論会, 2010年11月6日,（於 秋田大学・秋田県）
 - ⑧ F. Kusu, T. Ohtsuka, N. Ishii, A. Kotani, Determination of plasma free fatty acids in diabetic rats by HPLC with electrochemical detection and the relation between FFAs and valproic Acid, 12th the International Symposium on Electroanalytical Chemistry (12th ISEC) 2009年8月12日,（於 長春・中国）
 - ⑨ D. Matsumoto, A. Kotani, H. Hakamata, F. Kusu, Determination of isoflavones in soymilks by HPLC with electrochemical detection, 12th the International Symposium on Electroanalytical Chemistry (12th ISEC) 2009年8月12日,（於 長春・中国）
 - ⑩ 垣内宏祐, 松永伊央, 袴田秀樹, 楠 文代, 酸化ステロールの高感度分離定量法の開発と酸化 LDL 分析への応用, 日本分析化学会第 58 年会, 2009年9月24日,（於 北海道大学・北海道）

6. 研究組織

(1)研究代表者

楠 文代 (KUSU FUMIYO)
東京薬科大学・薬学部・教授