

〈特集：脂質研究のトピックス〉

## ヒト血漿中オキシステロールの高感度分析法

中川 沙織、大和 進

### High sensitive determination of oxysterols in human plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Saori Nakagawa and Susumu Yamato

**Summary** Oxysterols, cholesterol oxidation products, have been important markers for various diseases. For example, it is suggested that 24S-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol can be used as a marker of Alzheimer's disease, cerebrotendinous xanthomatosis and diabetes mellitus, respectively. Therefore, it is necessary to determine the concentration levels of individual oxysterols in plasma. In this report, we have described a pretreatment procedure of human plasma for the simultaneous determination of oxysterols using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Pretreatments were carried out as follows; extraction from lipoprotein, saponification by hydrolyzing oxysterols esters, extraction with *n*-hexane, solid-phase extraction to remove the large levels of cholesterol in plasma, elution of oxysterols from their solid-phase, and their derivatization by trimethylsilyl reagent. Twelve oxysterols were simultaneously determined using this pretreatment procedure and a GC-MS analysis. The procedure is a simple and useful one for application to human plasma.

**Key words:** Oxysterol, Plasma, GC-MS, Solid phase extraction, Biomarker

#### I. はじめに

生体内での生合成や食餌からの吸収によって得られたコレステロールは、生体内の水酸化酵素であるチトクロムP450 (CYP) やラジカル反応によって酸化されてオキシステロールを生成する。生体内から検出されるオキシステロールには、水酸基の数や位置、配位の異なる種々の構造類似化合物が存在し、生体内のオキシステ

ロールは異化代謝の中間生成物であるほか、核内レセプターのリガンドとして機能している。また、種々の疾患との関連が示唆されるなど注目されている。

コレステロールの大部分は、7位あるいは27位の水酸化、その後の水酸基の脱離や異性化などを受けて胆汁酸となり、胆嚢、胆管を経て腸管に分泌される。この胆汁酸の合成経路には古典経路と代替経路が存在する<sup>1)</sup>。古典経路<sup>2)</sup>は、肝

新潟薬科大学薬学部 薬品分析化学研究室  
〒956-9603 新潟県新潟市秋葉区東島265-1

Department of Bio-analytical Chemistry, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Niigata University of Pharmacy  
and Applied Life Sciences.  
265-1 Higashijima, Akiha-ku, Niigata 956-8603, Japan

のミクロソームにおいてコレステロール7 $\alpha$ 水酸化酵素 (CYP7A1) により7 $\alpha$ -ヒドロキシコレステロール (7 $\alpha$ -OHC) が生成され、胆汁酸であるコール酸 (CA) およびケノデオキシコール酸 (CDCA) がほぼ同量合成される。代替経路においては、ステロール27 $\alpha$ 水酸化酵素 (CYP27A1) によって27-ヒドロキシコレステロール (27-OHC) が合成され、CDCAが合成される<sup>3)</sup>。そのため、7 $\alpha$ -OHCおよび27-OHCは胆汁酸の合成マーカー<sup>4)</sup>として考えられている。27-OHCはその他に、CYP27A1欠損による脳髄黄色腫症<sup>5)</sup>との関連が報告されている。また、24S-

ヒドロキシコレステロールは、脳内に特異的に存在するコレステロール24水酸化酵素 (CYP46) により産生され<sup>6)</sup>、アルツハイマー病 (AD) や多発性硬化症などの脳神経疾患の早期診断あるいは軽度認知障害からADへの進行予測の診断マーカー<sup>7)</sup>として考えられている。他には、25-ヒドロキシコレステロール (25-OHC) はコレステロール25水酸化酵素により産生され、25-OHCはコレステロール合成を調節するSterol regulatory element binding proteins (SREBP) を介してHMG-CoA還元酵素を阻害する<sup>8)</sup>ため、コレステロール合成の調節因子と考えられている。さらに、4

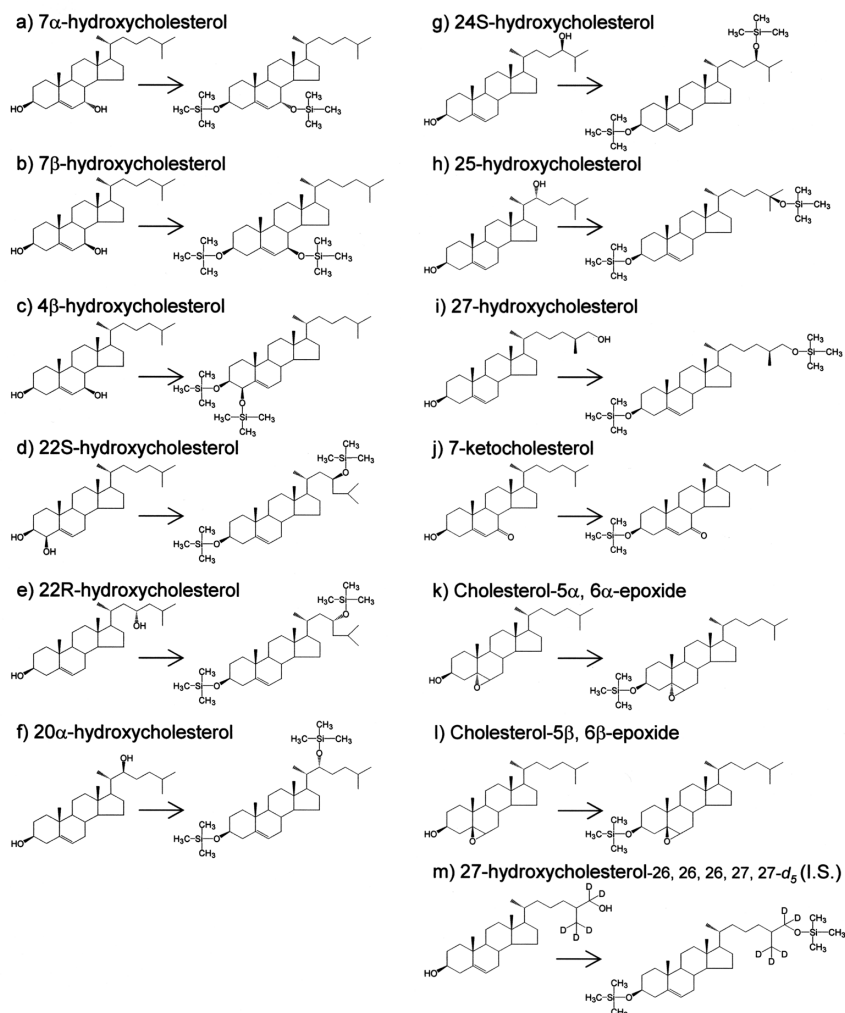


Fig. 1 Trimethylsilyl derivatization of oxysterols.

$\beta$ -ヒドロキシコレステロール ( $4\beta$ -OHC) は CYP3A4によって生成されるため、薬物代謝のバイオマーカー<sup>9)</sup>として考えることができる。また、Reactive oxygen species (ROS) によってコレステロールから合成される $7\beta$ -ヒドロキシコレステロール ( $7\beta$ -OHC)<sup>10)</sup>は酸化ストレス<sup>11)</sup>や肺がん<sup>12)</sup>のバイオマーカーとして、さらに、動脈硬化によって生じる冠動脈プラークに $7\beta$ -OHCが存在しており、動脈硬化症との関係性も報告されている<sup>13)</sup>。同様にフリーラジカルによってコレステロール- $5\beta$ ,  $6\beta$ -エポキシド ( $\beta$ -epoxide)、コレステロール- $5\alpha$ ,  $6\alpha$ -エポキシド ( $\alpha$ -epoxide) や7-ケトコレステロール (7-keto) が生成され、糖尿病<sup>14)</sup>、白内障<sup>15)</sup>、子宮体癌<sup>16)</sup>などの疾患との関連性が報告されている。

オキシステロールはこのように様々な疾患や体内状態のマーカー<sup>17)</sup>としての有用性が報告されているが、実際の血漿中におけるこれらのオキシステロールは2~154 ng/mL<sup>4, 12, 18, 19)</sup>とごく微量である。一方、類似化合物であるコレステロールは約200 mg/dLと大量に存在するため、血漿中のオキシステロールを高感度定量するには、前処理の段階で大量のコレステロールを取り除く必要がある。さらに、血漿中のリポタンパクの表面に遊離型のコレステロールが存在し、リポタンパクの内側にエステル型のコレステロールが存在していることから、血漿中のオキシステロールを含むコレステロール類を定量するた

めにはリポタンパクを破碎して遊離型およびエステル型を抽出する必要がある。

そこで本論文では、血漿中オキシステロールの高感度GC-MS定量法について、特に前処理で注意すべき点について述べる。

## II. オキシステロールのGC-MS法を用いる分離分析法

オキシステロールは、ステロール骨格をベースにどれも類似した構造であるため、これらを分離・定量するには分離能の高いGC-MSを用いるのが最も適している。オキシステロールそれ自身の構造では、水酸基をもつために感度が悪

Table 1 Analytical conditions of GC/MS

GC	QP2010 ( Shimadzu )
MS	GCMS-QP2010 plus ( Shimadzu )
Column	DB-5MS ( 30 m×0.25 mm, 0.25 $\mu$ m thickness )
Column oven	180°C for 1 min →20/min→250°C→5°C/min→300°C for 15 min
Carrier gas	Helium
Flow rate	0.96 mL/min
Injection temperature	250°C
Ion source temperature	250°C
Sample injection mode	splitless
Injection volume	5 $\mu$ L

Table 2 SIM monitoring ions of oxysterol derivatives by GC-MS

Oxysterols	m/z	
	Quantities ion	Certificate ion
7 $\alpha$ -hydroxycholesterol	456	233
7 $\beta$ - hydroxycholesterol	456	233
4 $\beta$ - hydroxycholesterol	456	366
22S- hydroxycholesterol	173	531, 546
22R- hydroxycholesterol	173	531, 456
20 $\alpha$ - hydroxycholesterol	201	465
24S- hydroxycholesterol	413	145
25- hydroxycholesterol	131	271, 327, 456
27- hydroxycholesterol	456	417
7-ketocholesterol	472	367, 382
cholesterol-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxide	474	384, 459
cholesterol-5 $\beta$ , 6 $\beta$ - epoxide	474	366, 384
27- hydroxycholesterol -26, 26, 26,27, 27- <i>ds</i> (I.S.)	461	422

I.S., internal standard

いが、オキシステロールの水酸基をトリメチルシリル (TMS) 誘導体化することで高感度に分析できるようになる<sup>18,20)</sup> (Fig. 1)。オキシステロールである27-ヒドロキシコレステロールのTMS誘導体化物のマススペクトルは、 $m/z$  546に分子イオンピークが認められ、誘導体化物からメチル (-CH<sub>3</sub>) が3つ外れた $m/z$  456にフラグメントイオンが認められる (Fig. 2)。この $m/z$ を用いて化合物を特異的にモニタリングすることで、高感度かつ特異的に定量ができる (Table 1, 2)。この方法を用いて得られたクロマトグラムをFig. 3に示しており、12種類のオキシステロールおよび内標準物質である27-ヒドロキシコレステロー

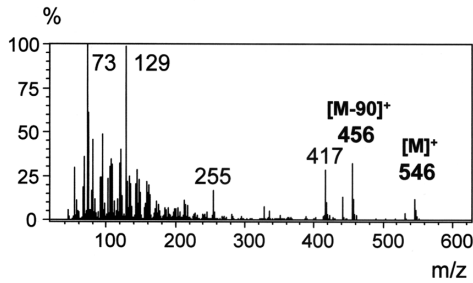


Fig. 2 Mass spectra of 27-hydroxycholesterol-TMS (trimethylsilyl) ether derivative

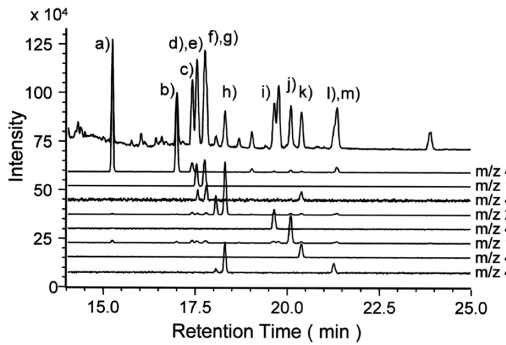


Fig. 3 SIM chromatograms of oxysterols-TMS ether derivatives.  
a) 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, b) 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, c) 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, d) 22S-hydroxycholesterol, e) cholesterol-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxide, f) 22R-hydroxycholesterol, g) cholesterol-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxide, h) 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, i) 24S-hydroxycholesterol, j) 25-hydroxycholesterol, k) 7-ketcholesterol, l) 27-hydroxycholesterol-D5 (I.S), m) 27-hydroxycholesterol

ル-26, 26, 27, 27-d<sub>5</sub>が良好に分離されていることが分かる。

### Ⅲ. 血漿の前処理法

血漿中のオキシステロール定量のための前処理法について述べる。一般的な血漿中コレステロールのGC-MS定量のための前処理は、リポタンパクの破壊、ケン化、溶媒抽出および誘導体化反応の各操作であるが、血漿中オキシステロールのGC-MS定量の場合、溶媒抽出後に固相抽出の操作を加えて、コレステロールとオキシステロールを分別する必要がある。ここでは、前

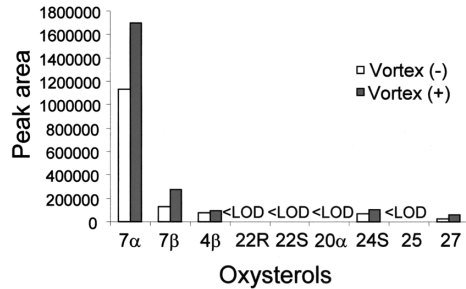


Fig. 4 Effect of multi-tube vortex mixer on the extraction of oxysterols from lipoprotein in human plasma.

LOD, limit of detection; 7 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 7 $\beta$ , 7 $\beta$ -hydroxycholesterol; 4 $\beta$ , 4 $\beta$ -hydroxycholesterol; 22R, 22R-hydroxycholesterol; 22S, 22S-hydroxycholesterol; 20 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 24S, 24S-hydroxycholesterol; 25, 25-hydroxycholesterol; 27, 27-hydroxycholesterol

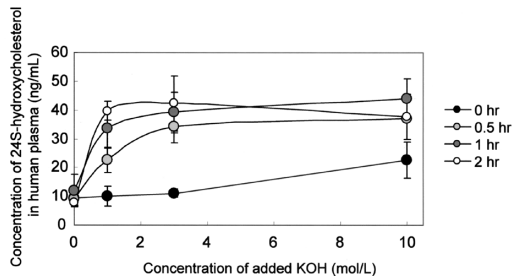


Fig. 5 Effect of potassium hydroxide on the hydrolysis of 24S-hydroxycholesterol ester. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation (n=4).

処理の中でもリポタンパクの破壊、ケン化条件の検討および固相抽出法を用いたコレステロールとオキシステロールの分別法について述べる。

### 1. リポタンパクの破壊方法

前処理操作では、リポタンパクの破壊とともにコレステロールおよびオキシステロールのエステル型を遊離型にするケン化を同時に行うことで、前処理を簡素化することができる。血漿にメタノールおよび水酸化カリウム溶液を加え、室温の条件下、パルスモードを用いたボルテックスミキサーで混和することでリポタンパクが破壊され、遊離型およびエステル型コレステロールおよびオキシステロールを取り出すことができる。パルスモードを用いて断続的に強い物理的刺激（ボルテックス）をかけることでオキシステロールがより多く検出されるのが分かる（Fig. 4）。ボルテックスミキサーを用いることでリポタンパクが効果的に破壊され、より安定で再現性のよいデータが得られた。

### 2. ケン化条件の検討

血漿中のエステル型オキシステロールは、ア

ルカリを用いて加水分解し、遊離型オキシステロールとすることで、総オキシステロールとして定量する。血漿中のリポタンパクの破壊のためにメタノールを添加しボルテックスミキサーで混和する際に、水酸化カリウムを添加し、抽出されるオキシステロール量の検討を行った。水酸化カリウムの添加濃度、ケン化時間を検討し、24S-ヒドロキシコレステロール濃度を定量したところ、水酸化カリウム添加濃度が10 mol/L以上、ケン化時間が1時間以上ではほぼ一定となった（Fig. 5）。

### 3. コレステロールとオキシステロールの分別法

コレステロールとオキシステロールのような類似化合物を分別する方法としては構造上の特徴を生かして固相抽出を行うのがよい。固相抽出剤のシリカを用い、コレステロールおよびオキシステロールの水酸基と、シリカの水酸基を水素結合させることで、水酸基を1つ持つコレステロールと、水酸基を2つあるいは水酸基とエポキシ基を持つオキシステロールを水素結合力の差を利用して分別できる（Fig. 6）。微量（0.06 μg/mL）の24S-OHC、27-OHC、7β-OHC、

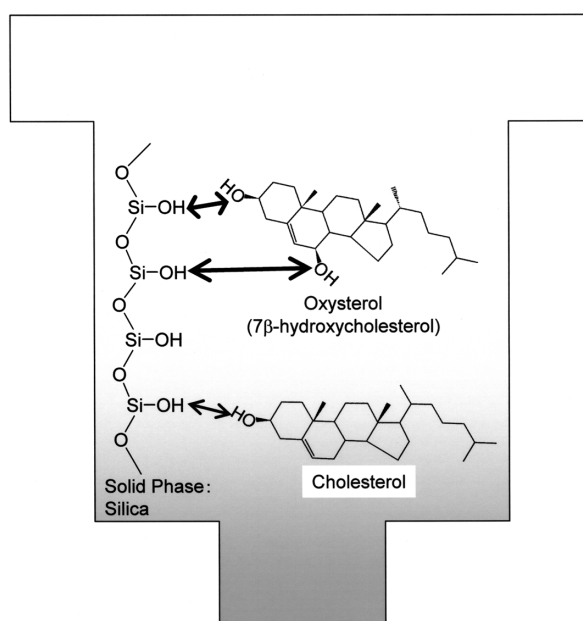


Fig. 6 Illustration of separation mechanism of oxysterols and cholesterol on the silica cartridge.

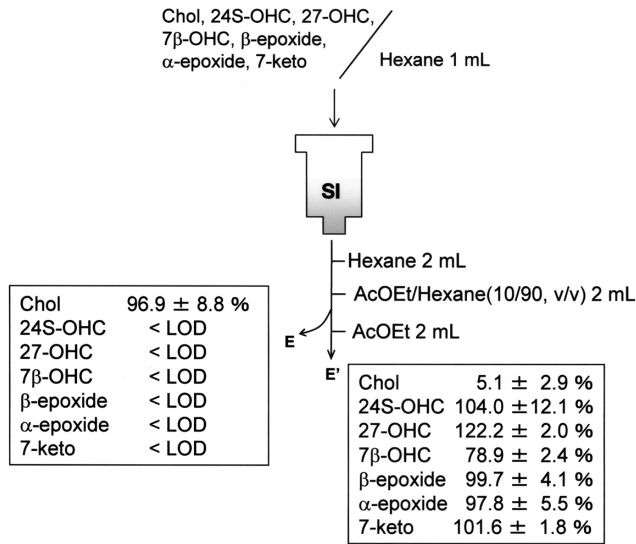


Fig. 7 Recoveries (%) of oxysterols and cholesterol obtained in individual solvent fractions of solid-phase extraction. n=3; LOD, limit of detection; Chol, cholesterol; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27OHC, 27-hydroxycholesterol; 7 $\beta$ , 7 $\beta$ -hydroxycholesterol;  $\beta$ -epoxide, cholesterol-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxide;  $\alpha$ -epoxide, cholesterol-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxide; 7-keto, 7-ketocholesterol

$\alpha$ -epoxide、 $\beta$ -epoxide、7-ketoおよび大過剰 (1.8 mg/mL) のコレステロールのヘキサン溶液をシリカの固相カートリッジ (100 mg, 1 mL) に負荷させ、それぞれの画分における溶出量を測定したところ、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (10/90) 溶液画分 (E) には96.9%のコレステロールが溶出され、オキシステロールは検出限界以下であった。また、酢酸エチル画分 (E') には、検討したすべてのオキシステロールが78.9~122.2%で溶出され、コレステロールの溶出量は5.1%前後であった (Fig. 7)。このことより、固相にシリカを用い、ヘキサンと酢酸エチルを組み合わせることで大量のコレステロールとオキシステロールが分別できる。これまでに報告されているコレステロールとオキシステロールの固相抽出を用いた分別法は、2-プロパノールが用いられている<sup>18)</sup>が、本前処理法の固相抽出に用いられる溶媒は水酸基を持たないため、その後のトリメチルシリル (TMS) 誘導体化反応における溶媒の妨害がなく、TMS誘導体化を行う前処理法として有用と考えられる<sup>20)</sup>。

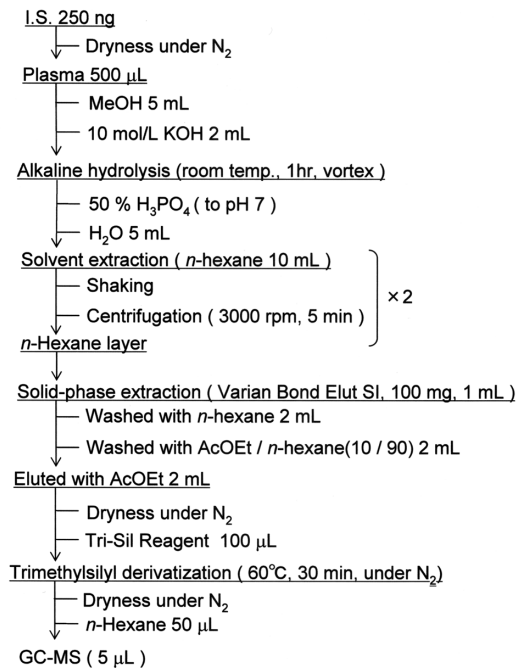


Fig. 8 Pretreatment procedure of human plasma for the GC-MS analysis. I.S., internal standard

Table 3 Validation data of oxysterols in spiked human plasma

Oxysterols	Liner regression equation	Correlation coefficient	Recovery (%)
7 $\alpha$ -hydroxycholesterol	$y=4.74 \times 10^{-2} x$	0.999	88.0 + 2.0
7 $\beta$ - hydroxycholesterol	$y=2.87 \times 10^{-2} x$	0.992	99.4 + 6.5
4 $\beta$ - hydroxycholesterol	$y=3.83 \times 10^{-3} x$	0.995	85.1 + 3.6
22S- hydroxycholesterol	$y=5.98 \times 10^{-2} x$	0.995	87.0 + 4.9
22R- hydroxycholesterol	$y=5.16 \times 10^{-2} x$	0.999	85.4 + 7.0
20 $\alpha$ - hydroxycholesterol	$y=1.35 \times 10^{-2} x$	0.993	93.5 + 6.0
24S- hydroxycholesterol	$y=3.61 \times 10^{-3} x$	0.998	103.3 + 6.3
25- hydroxycholesterol	$y=2.78 \times 10^{-2} x$	0.997	87.2 + 4.5
27- hydroxycholesterol	$y=2.39 \times 10^{-3} x$	0.999	94.4 + 2.7
7-ketocholesterol	$y=4.61 \times 10^{-3} x$	0.996	110.0 + 17.6
Cholesterol-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxide	$y=4.20 \times 10^{-4} x$	0.997	96.0 + 12.8
Cholesterol-5 $\beta$ , 6 $\beta$ - epoxide	$y=3.33 \times 10^{-4} x$	0.999	105.2 + 12.8

Recovery represents the mean  $\pm$  standard deviation (n=4).

#### IV. 検量線および血漿からの添加回収率

前処理方法は以下のように行った。内標準物質を含む試験管 (50 mL) に、健常人ボランティアの血漿500  $\mu$ L、メタノール 5 mL、10 mol/L 水酸化カリウム溶液 2 mLを加え、パルスモードを用いたボルテックスミキサーを用いて室温で1時間、混和した。その後、50%のリン酸を加えて中和し、精製水5 mLを添加し、*n*-ヘキサンの10 mLで溶媒抽出を行い、3,000 rpmで5分間、遠心分離後、ヘキサン層を分取した。これを2回繰り返して、分取したヘキサン溶液をシリカの固相カートリッジ (SI, 100 mg, 1 mL, Varian Bond Elut) に負荷した。*n*-ヘキサン 2 mLおよび酢酸エチル/*n*-ヘキサン (10/90) の2 mLで洗浄し、酢酸エチル 2 mLでオキシステロールを溶出させた。窒素気流下で溶媒を除去後、Tri-Sil Reagentを100  $\mu$ L加え、60°C、30分間、窒素雰囲気下でトリメチルシリル誘導体化を行った。反応後、溶媒を除去し、*n*-ヘキサン50  $\mu$ Lで再溶解し、その5  $\mu$ LをGC-MS測定した (Fig. 8)。この条件下で、オキシステロールの検量線は相関係数 ( $R^2$ ) 0.992以上、血漿への添加回収率も85.1~110%であり、本法を用いることで12種類の血漿中オキシステロールを良好に一斉定量できるこ

とが分かる (Table 3)。現在、本法を用いて、健常人や患者血漿検体へ応用しているところであり、オキシステロールのアルツハイマー病などの各種疾患のバイオマーカーとしての有用性を明らかにできると考えている。

#### References

- 1) Chiang JY: Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev*, 23: 443-463, 2002.
- 2) Axelson M, Sjövall J: Potential bile acid precursors in plasma-possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem*, 36: 631-640, 1990.
- 3) Javitt NB: Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB J*, 8: 1308-1311, 1994.
- 4) Björkhem I, Reihner E, Angelin B, Ewerth S, Akerlund JE, Einarsson K: On the possible use of the serum level of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7  $\alpha$  -hydroxylase in humans. *J Lipid Res*, 28: 889-894, 1987.
- 5) Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW: Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem*, 266: 7779-7783, 1991.
- 6) Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalussy U, Stähle L,

- Ahlborg G, Wahren J: Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res*, 39: 1594-1600, 1998.
- 7) Wolozin B: Cyp46 (24S-cholesterol hydroxylase): a genetic risk factor for Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 60: 16-18, 2003.
  - 8) Russell DW: Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1529: 126-135, 2000.
  - 9) Kanebratt KP, Diczfalusy U, Bäckström T, Sparve E, Bredberg E, Böttiger Y, Andersson TB, Bertilsson L: Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4 $\beta$ -hydroxycholesterol. *Clin Pharmacol Ther*, 84: 589-594, 2008.
  - 10) Ziedén B, Kaminskas A, Kristenson M, Kucinskienė Z, Vessby B, Olsson AG, Diczfalusy U: Increased plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 967-971, 1999.
  - 11) Adachi J, Kudo R, Ueno Y, Hunter R, Rajendram R, Want E, Preedy VR: Heart 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats. *J Nutr*, 131: 2916-2920, 2001.
  - 12) Linseisen J, Wolfram G, Miller AB: Plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11: 1630-1637, 2002.
  - 13) Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W: 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res*, 38: 1730-1745, 1997.
  - 14) Ferderbar S, Pereira CE, Apolinario E, Bertolami CM, Faludi A, Monte O, Calliari EL, Sales E J, Gagliardi RA, Xavier TH, Abdalla PSD: Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, 1: 35-42, 2007.
  - 15) Girao H, Mota MC, Ramalho J, Pereira P: Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res*, 66: 645-652, 1998.
  - 16) Küçük Ö, Churley M, Goodman T, Franke A, Uster L, Wilkens RL, Pyrek St J: Increased plasma level of cholesterol-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxide in endometrial cancer patient. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 3: 571-574, 1994.
  - 17) Björkhem I: Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest*, 110, 725-730, 2002.
  - 18) Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U: Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 225: 73-80, 1995.
  - 19) Lee CY, Huang SH, Jenner AM, Halliwell B: Measurement of F2-isoprostanes, hydroxyeicosatetraenoic products, and oxysterols from a single plasma sample. *Free Radic Biol Med*, 44: 1314-1322, 2008.
  - 20) Yamazaki R, Nakagawa S, Tanabe A, Ikeuchi T, Miida T, Susumu Yamato S: Determination of 24S-hydroxycholesterol in human cerebrospinal fluid by gas chromatography / mass spectrometry [Jpn]. *Bunseki Kagaku*, 57: 707-713, 2008.