

血清トリグリセライドの定量

御 船 政 明

岡山大学温泉研究所 温泉医学部門

(指導 森 永 寛 教授)

1. 緒 言

脂肪は生体内で熱源として、あるいは非熱源的代謝機能を営む点において、栄養上大切な物質であるが、近年中性脂肪の直接定量法が開発されると共に、種々の疾患ことに動脈硬化症と関係した心臓血管系疾患と血清トリグリセライドとの関係が非常な注目を引いている。

血清トリグリセライド (以下 TG と略記) の直接比色定量法については、VAN HANDEL *et al.* (1957, 1961),

CARLSON *et al.* (1959), 末広 (1961), 川出 (1962, 1963, 1966), 福井 (1962) 等によって報告されているが、これらの方法にもとづいて血清 TG の定量を行なっても精密度、正確度において満足すべき結果が得がたい。そこで著者は用手法として現在広く使用されているクロマトローブ酸を用いる比色法 (主として VAN HANDEL-川出変法), および AutoAnalyzer に多少手を加えることにより定量が可能となる LOFLAND (1964) の半自動分析法について検討したので報告する。

Table 1. Scheme of Analysis*

Standards:

Tripalmitin standard soln. (4 mg/dl)
0 ~ 2 ml (for MM)
0 ~ 4 ml (for SAA)



Evaporate for 15 min (for MM), or for 25 min (for SAA) at 85°C.
Add 0.5 ml C₂H₅OH-KOH solution, and mix.
Heat for 10 min. at 60°C, and cool.
Add 1 drop of 6 % acetic acid solution.
Evaporate upon an oil bath for 10 min. at 101°C.

For SAA:

Add 2 ml of H₂O.
Bring the solution to the AutoAnalyzer.

Samples:

To 0.5 g of Florisil add the following substances in succession:
CHCl₃ : 2.5 ml
Serum : 0.1 ml
CHCl₃ : 2.5 ml
Agitate for 10 minutes.
Centrifuge for 10 min. at 3000 r. p. m.
Take up the supernatant (1 ml for MM or 2 ml for SAA).

For MM:

Add 1 ml of H₂O and mix.
Add 1 drop of 0.56 % NaIO₃ solution.
Stand for 10 minutes in the dark.
Add 1 drop of 5 % NaHSO₃ solution
Stand for 5 minutes in the dark.
Add 4 ml of the chromotropic acid reagent.
Heat in boiling water bath for 40 min., and cool.
Measure the absorbance at 570 m μ .

* MM: manual method.
SAA: semi-automated analysis.

2. 手法による分析法

2-1. 装 置

加熱水浴装置および油浴装置として大和科学製ウォーターバス・ミニー BT-11形を使用し、油浴として使用する場合には、加熱浴剤として AutoAnalyzer の Heating bath 用鉱物油を使用した。振とう器として大和科学製シェーカー SK-13形を使用し、分光光度計として日立製 101 形分光光度計を使用した。AutoAnalyzer は、標準 AutoAnalyzer を基礎とし、これを LOFLAND に準拠して手を加え、さらに多少改良して使用した。

2-2. 試 薬

- i) クロロホルム (特級, 石津製薬あるいは和光純薬).
- ii) フロリジル (和光純薬, 60~100 メッシュ).
- iii) パームチット (ビタミンB₁ 定量用, 日本ビタミン学会, 50~80 メッシュ).
- iv) シリカゲル (クロマトグラフィー用, 石津製薬, 80~200 メッシュ).
- v) シリカゲル (青色中粒, 石津製薬, 6~10 メッシュ).

これらの吸着剤は120°C, 3時間加熱活性化して使用した。

vi) エタノール性水酸化カリウム溶液. 使用直前に 2.5 g/dl 水酸化カリウム水溶液 1 容とエタノール (特級, 石津製薬あるいは和光純薬) 19 容とを混和して作る。

vii) 6% 酢酸水溶液.

viii) 0.54% メタ過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) 水溶液 (特級, 石津製薬あるいは和光純薬). 手法の際には 2 週間ごとに作りかえる. 半自動分析法の際には, 1% 溶液を 3 日ごとに作る.

ix) 5% 亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO₃) 溶液 (特級, 石津製薬あるいは和光純薬). 手法の際には 3 日ごとに作りかえる. 半自動分析の際には, 6% 溶液を 3 日ごとに作る.

x) クロモトロープ酸試薬. 100ml の三角フラスコに蒸留水 250ml を入れ, 水冷しつつ硫酸 (特級, 和光純薬) 300 ml を少量づつ加え, 添加終了後水冷し, さらにマグネチックスターラーを用いて攪拌しつつクロモトロープ酸 (同仁薬化学研究所) 1g を加え, 完全に溶解するまで遮光して 2~3 時間攪拌をつづける. 溶解後褐色瓶に保

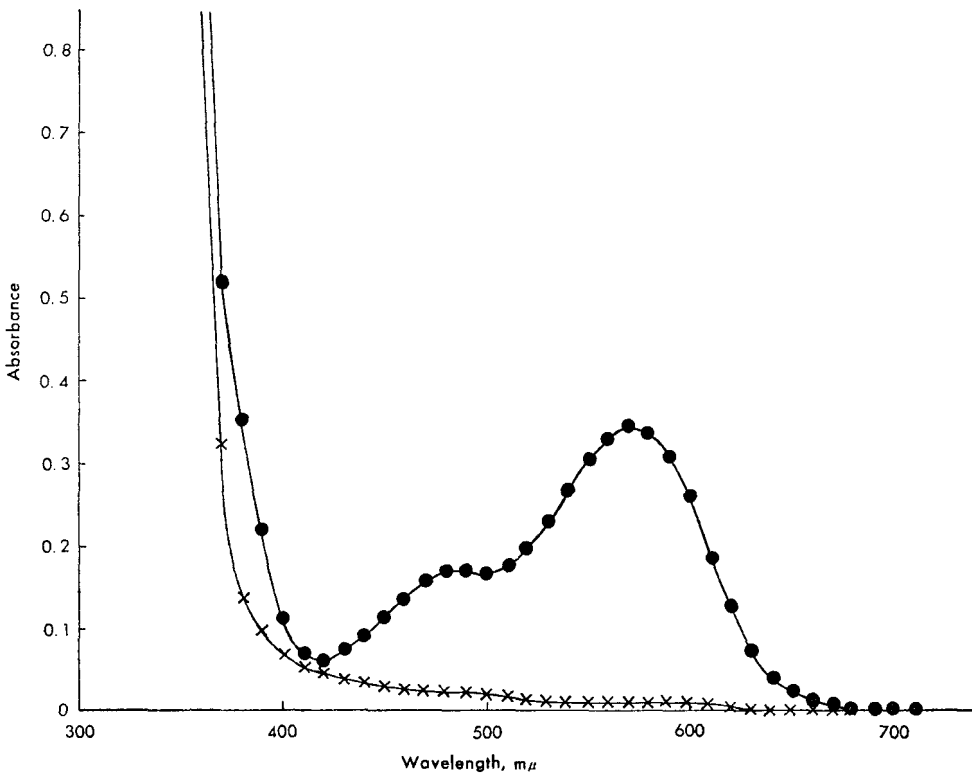


Fig. 1. Absorption spectra

存する。

xi) 標準液 (貯蔵液, 100mg/dl). トリステアリン (特級, 半井化学) 100.0 mg をクロロホルムに溶かして 100 ml とする。

xii) 標準液 (使用液, 4 mg/dl). 貯蔵液をクロロホルムで25倍に稀釈する。

2-3. 分析方法

表1に分析の手順を示す。即ち内容約20mlの共栓付遠沈管に活性化したフロリジル 0.5 g を入れ、次いでクロロホルム 2.5 ml, 血清 (あるいは関節液) 0.1 ml を加え、さらにクロロホルム 2.5 ml を加えて密栓し、シェーカーで10分間振とう後毎分3000回転10分間遠沈する。上澄液 1.0 ml (半自動分析法の際には2ml) を内容約10mlの共栓付試験管にとり、85°Cの油浴中で15分間

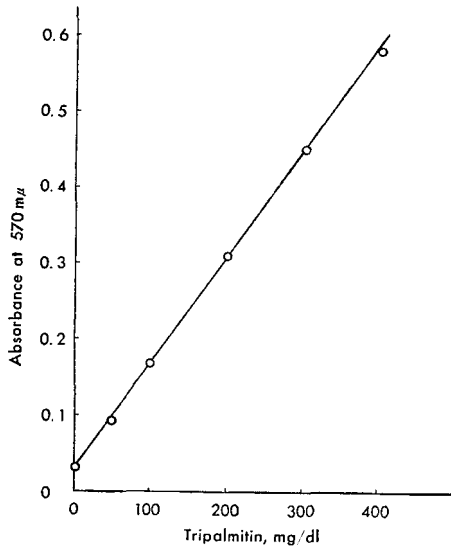


Fig. 2. Calibration curve for triglycerides

(上澄液 2 ml 使用する際には約25分間) 加熱し、溶媒を蒸発除去する。蒸発残渣にエタノール性水酸化カリウム溶液を 0.5 ml 加え、ミキサーを用いて攪拌混和後密栓して 60°C 湯浴中で10分間けん化を行う。冷後6%酢酸1滴を加えて攪拌混和し、けん化液を pH~6 の弱酸性にする。次に 101°C の油浴で 10~15分間加熱し、常圧でエタノールを蒸発除去する。冷却後蒸留水 1 ml (半自動分析法では 2 ml) を加え、試験管内の蒸発残渣を溶解する。次に 0.5%メタ過ヨウ素酸ナトリウム液 1 滴を加えて密栓し、充分攪拌混和後暗所 (実験台下の戸棚内) で 10分間放置し、次に 5%亜硫酸水素ナトリウム溶液 1 滴を加えて密栓し充分攪拌混和後暗所に 5分間放

置する。次いでクロモトローブ酸試薬 4 ml を添加し、密栓して上下に振とう混和後、煮沸水浴中遮光しつつ 30分間加熱 (ご飯蒸器を使用する) 発色させる。水冷後光路長 10 mm で波長 570 mμ における吸光度を水を対照にして測定し、空試験の吸光度をさし引き検量線から TG の含有率を算出する。

2-4. 実験結果

2-4-1. 吸収曲線 グリセリン 4.6 r をとり、蒸留水を加えて全量を 1 ml とし、以後表1の手順に従って得た呈色液および試薬空白検液の吸収線を図1に示す。この場合 570 mμ に吸収極大がある。

2-4-2. 検量線 内容約 10 ml の共栓付試験管にそれぞれクロロホルム 2.0 ml, トリパルミチン標準液 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ml をとり表1の手順に従って操作した結果、図2に示すと通りの直線性を得た。

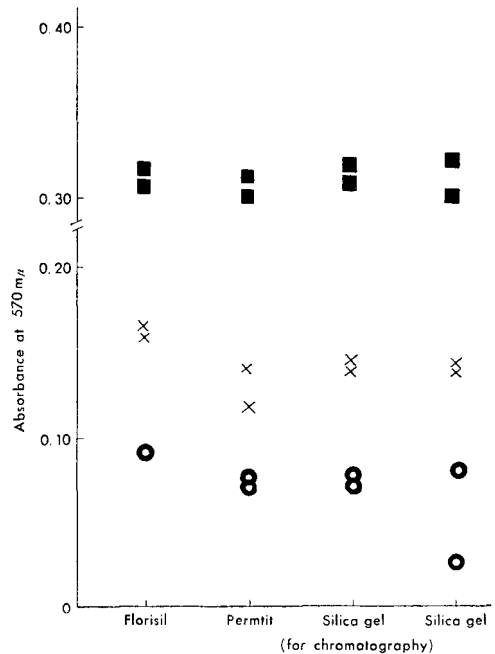


Fig. 3. Effect of absorbents for three human serum samples

2-4-3. 吸着剤 従来多く使用されている吸着剤のフロリジル, パームチット, シリカゲル (クロマトグラフィ用), 最近までわれわれが使用してきたシリカゲル (青色中粒) を使用し, 3人の血清中の TG の分析を表1の手順に従って行ない, 得られた結果を図3に示した。図3によって, 吸着剤としてフロリジル, 次いでシリカ

ゲル(クロマトグラフィー用)の優れていることが明らかであるので、本法ではフロリジルを使用することにした。

2-4-4. 振とう時間 同一血清を使用した場合の、シェーカーによる振とう時間と吸光度との関係を図4に示す。振とう時間5~30分では一定の吸光度を示すので、本法では10分間振とうすることにした。

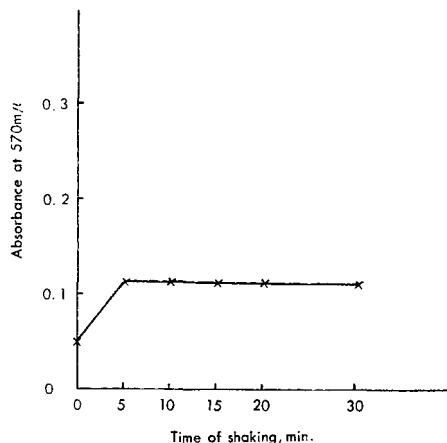


Fig. 4. Effect of time of shaking

2-4-5. けん化時間 内容約10mlの共栓付試験管に人血清のTGのクロロホルム抽出液1mlをとり、85°Cの油浴中で溶媒を蒸発除去し、残渣にエタノール性水酸化カリウム溶液0.5mlを加え振とう後、60°Cの恒温槽中でけん化を行い、得られた吸光度とけん化時間との関係は図5に示すとおりで、けん化時間は10分で充分なことがわかる。

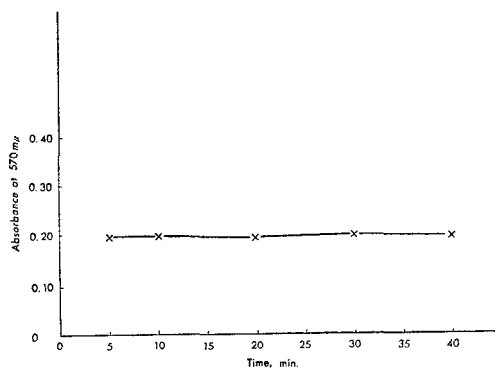


Fig. 5. Relation between the time required for saponification and absorbance

2-4-6. エタノールの除去方法 クロモトローブ酸試験薬を用いてホルムアルデヒドを発色させる際、エタノールが残存すると発色を妨害するので、除去する必要がある。エタノールを除くため VAN HANDEL *et al.*(1957)、川出(1966)等は、けん化の終わった液にそれぞれ0.2N硫酸溶液0.5ml、0.1N硫酸溶液1mlを加え、硫酸酸性(pH~1)にし、沸騰水浴中に入れ、常圧で蒸発する方法をとり、福井(1962)は、けん化の終わった液に6%酢酸

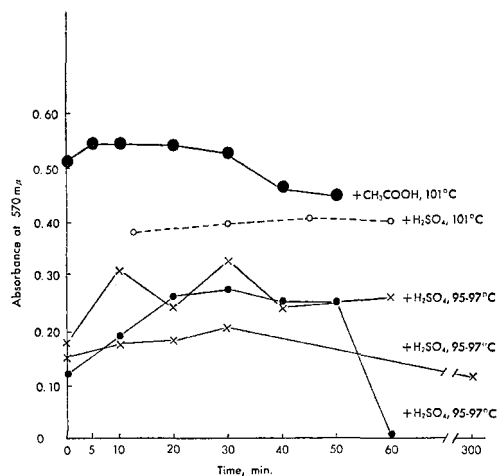


Fig. 6. Relation between the time required for evaporation and absorbance

溶液2滴を加えて酢酸酸性(pH~6)にし沸騰浴中に入れ常圧で蒸発させる方法をとっている。pH~1の検液を沸騰水浴中で加熱する方法、pH~1およびpH~6の検液を101°Cの油浴(短時間にエタノールを除く目的、浴の空焚きを防ぐ目的で使用)中で加熱し、常圧で蒸発させる方法について検討した結果を図6に示す。pH~6の酢酸酸性の検液を101°Cの油浴中で加熱蒸発させると、蒸発は約5分で完了し、5~10分にわたって吸光度は一定している。本法では10分間加熱することにした。

2-4-7. 硫酸 特級硫酸2種類、精密分析用硫酸1種類を使用してクロモトローブ酸試験薬を作り、表1の手順に従って発色させ、加熱時間と吸光度との関係を図7に示した。30~40分間加熱した場合には、3種類の硫酸とも吸光度に大差がない。従って高価な精密分析用硫酸を使用する必要はない。ただし後述の半自動分析法を使用する際には、加熱時間は約5分に過ぎないので、硫酸の選択には注意を要し、この場合和光純薬特級硫酸が適している。

2-4-8. 呈色液の経時変化 図8に示したように100°Cで40分間加熱後直ちに水冷し、以後吸光度の変化を観察すると、水冷後10分り40分にわたって吸光度に変化が認められなかった。

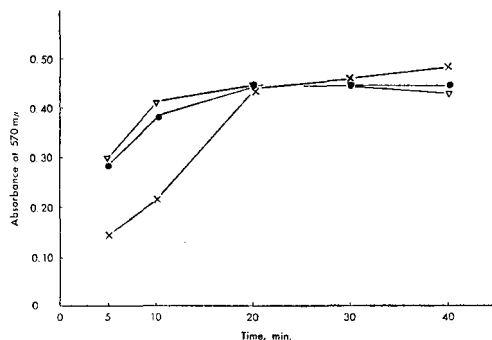


Fig. 7. Relation between the quality of H₂SO₄ used for C. T. A. solution and absorbance

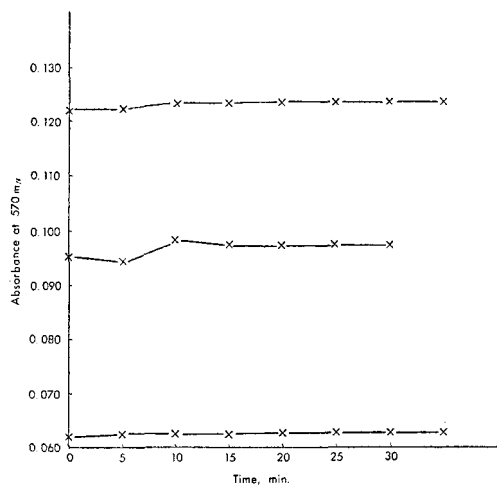


Fig. 8. Stability of colored solution

3. AUTO-ANLYZER を利用する半自動分析法

3-1 LOFLAND (1964) は、TGの半自動分析法を提案したが、その flow diagram を図9に示す。更に KESSLER *et al.* (1965), 茂手木等 (1965) は、TGの自動蛍光分析法を記載したが、蛍光分析法による自動分析法を採用すれば、血清より TG を抽出する操作以外はすべて自動

化されており、1時間に20試料の分析が可能である。しかし標準 AutoAnalyzer 以外に50°Cの Heating bath, Fluorometer を必要とする*。その点 LOFLAND の半自動分析法はその必要がなく、既製の manifold に手を加えることにより標準 AutoAnalyzer を使用して容易に分析の目的を達成しうる。したがって著者は LOFLAND 法について検討を加えた。その詳細は別に発表の予定である。ここには変更の結果のみを記載する。

Table 2. Precision of analytical results by the two method

Number	Manual method	Semi-automated method
1	54	50
2	56	54
3	52	53
4	54	52
5	53	53
6	54	54
7	56	56
8	57	54
9	57	54
10	57	56
Average (mg/dl)	55.0	53.6
Standard deviation (mg/dl)	1.83	1.78
Coefficient of variance(%)	4.69	4.68

3-2. 装置および試薬

3-2-1. 装置 標準 AutoAnalyzer を使用し、その manifold は図10に示す。その他の装置は用手法のものを使用する。

3-2-2. 試薬

- i) 1%メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液(特級, 石津製薬あるいは和光純薬). 3日ごとに作る。
- ii) 6%亜硫酸水素ナトリウム溶液(特級, 石津製薬あるいは和光純薬). 3日ごとに作る。
- iii) その他の試薬は用手法のものを使用する。

3-3. 分析方法

表1の手順に従って前処理を行い、図10に示す flow-diagram に従って分析を行う。即ちけん化後酢酸で弱酸

*更に最近テクニコン社よりトリグリセライド(蛍光分析法による)とコレステロールとを同時に自動分析す

る装置が発売された。

性 (pH~6) にして蒸発乾固し、蒸発残渣に蒸留水 2 ml を加えて溶解し、検液を AutoAnalyzer のカップに移して分析を行う。

Tube 7 より検液 (0.60 ml/min), Tube 5 より 1% メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (0.10 ml/min), Tube 9 より空気が吸引され、Single mixing coil を通過中混和酸化され、次いで Tube 11 より 6% 亜硫酸水素ナトリウム溶液 (0.10 ml/min) が吸引され、Single mixing coil を通過中に過剰のメタ過ヨウ素酸は分解され、次いで Tube 1 よりクロモトロフ酸試薬 (2.9 ml/min) が吸引され、Double mixing coil を通過中に混合され、次いで Double coil heating bath を通過中に加熱発色し、Jacketed mixer を通って水冷された後、Colorimeter, Recorder により比色定量記録される。分析に要する時間は検液を吸引しはじめてより約18分で、1時間に25の検液の分析が可能である。

3-4. 実験結果

半自動分析法による標準液ならびに同一血清を反復分析した際のパターンを図11に示す。

用手法による血清 (関節液も含む) TG の測定値と半自動分析法による同一試料測定値を比較した結果、図12に示すような高い相関 ($r = 0.972$) が得られた。

同一血清を使用して用手法および半自動分析法により分析した場合の平均値、標準偏差、変動係数を示すと表2の如くなる。即ち用手法による測定値は、平均 55.0 mg/dl、標準偏差は 1.83 mg/dl、変動係数は 4.69% となり、一方半自動分析法による測定値は、平均 53.6 mg/dl、標準偏差は 1.78 mg/dl、変動係数は 4.68% となる。

4. 結 語

血清 TG の分析方法として、まず用手法について、主

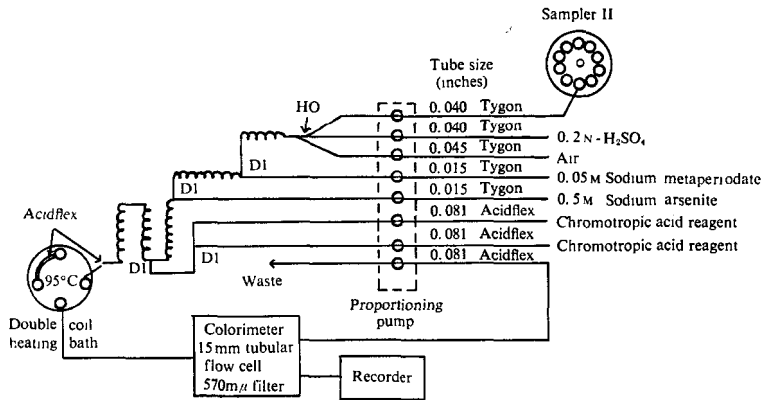


Fig. 9. Flow-diagram for triglyceride by LOFLAND

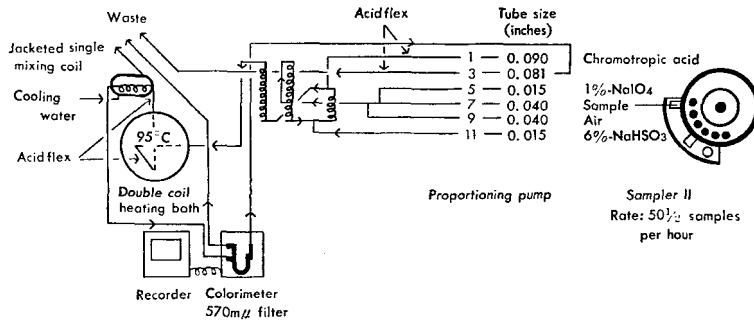


Fig. 10. Proposed flow-diagram for triglycerides

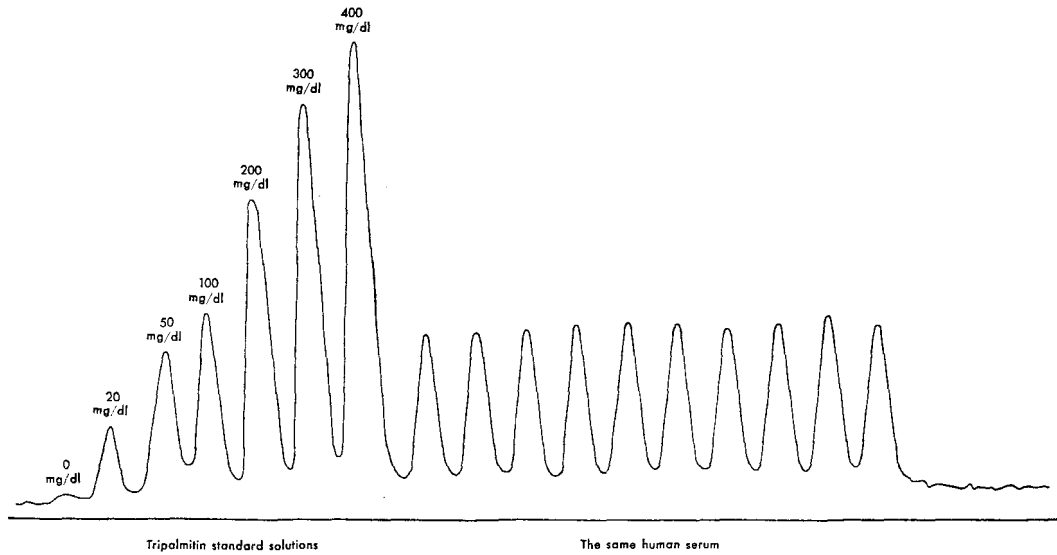


Fig. 11. A pattern of triglyceride determination by AutoAnalyzer

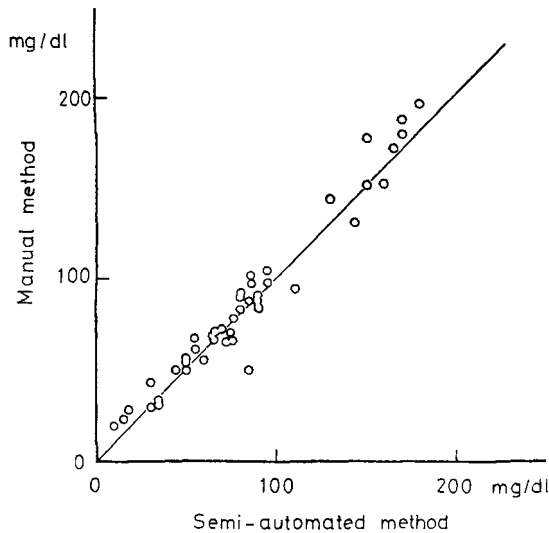


Fig. 12. Correlation between the results obtained by the manual method and those by the semi-automated method

として VAN HANDEL-川出変法による分析操作全般にわたり検討し、特に注意を要するエタノール除去操作について改良を加え満足すべき結果を得た。

次に LOFLAND 法に基づく半自動分析法について検討し、原法に比してクロマトロブ酸試薬の使用量の半減、分析時間の短縮、Mixing coil の省略が可能となり、日常の臨床検査での使用が容易になった。

終りに臨み、実験にご協力頂いた文部教官綱本喜久恵、文部教官高橋和枝の両氏に感謝する。

本論文の要旨は、昭和43年10月26日、中国四国内科六学会臨床病理学会シンポジウム“脂質代謝”で発表した。

引用文献

- CARLSON, L. A. and WADSTRÖM, L. B. (1959). Determination of glycerides in blood serum. *Clin. Chim. Acta.*, **4**, 197-205.
- 福井 巖 (1962). 血清トリグリセライドの定量法について. 第7回脂質代謝懇談会
- (1967). トリグリセライド. *日本臨床*, **25**, 1813-1820.
- 川出真坂 (1962). 血清トリグリセライドの微量定量法. *日本臨床*, **20**, 2127-2130.
- (1963). 血液中脂質検査法. *診療*, **16**, 677-682.
- (1966). 中性脂肪. 丹羽正治等編, *臨床化学分析 III*, 東京化学同人, 東京, pp. 40-56.
- KESSLER, G and LEDERER, H. (1966). Fluorometric measurement of triglycerides. *Automation in Analytical Chemistry*, Mediad Inc., New York, pp. 341-344.
- LOFLAND, H. B., Jr. (1964). A semiautomated procedure for the determination of triglycerides in serum. *Anal. Biochem.*, **9**, 393-400.

茂手木皓喜, 正路喜代美, 豊田幸子 (1968). 血清トリグリセライドの蛍光自動分析にかんする研究 (第2報). *臨床病理*, **16**, 696-700.

末広雅也 (1961). 血清トリグリセライドの定量法について. *生化学*, **33**, 35-38.

VAN HANDEL F. (1961). Suggested modification of the micro determination of triglycerides. *Clin. Chem.*, **7**, 249-251.

—, and ZILVERSMIT, D. B. (1957). Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 152-157.

THE DETERMINATION OF SERUM TRIGLYCERIDES

by Masaaki MIFUNE (Director : Prof. H. MORINAGA),
Department of Medicine, Institute for Thermal Spring Research, Okayama University

Abstract. Currently accepted methods for serum triglycerides, namely, the manual modified VAN HANDEL-KAWADE method and the semi-automated LOFLAND method, were critically examined. Since the absorbents, the quality of sulfuric acid, the processes of shaking, extraction, saponification, removal of

ethanol after saponification, and the stability of colored solution appear to be essential factors governing precision and accuracy of the determination, the effects of these factors were studied. It was found that the process of removal of ethanol was most important. To obtain the reproducible absorption, it is most advantageous to evaporate off ethanol from the solution of pH \approx 6 on an oil bath at 101°C.

As a result of re-examination on LOFLAND's semi-automated method using a standard AutoAnalyzer, it is shown that the mixing coils can be omitted, thereby making the analysis possible in 18-19 minutes (In the original LOFLAND's method it takes more than 22 minutes). In addition, this modification results in smaller amount of chromotropic acid reagent necessary (2.9 ml/min. as compared to 5 ml/min. in the original method). The determination rate in this modified method is 25 samples per hour.

The average values, standard deviations, and coefficients of variance for the same serum sample for ten analyses according to the suggested manual method were 55.0 mg/dl, 1.83 mg/dl, and 4.69%, respectively, and those according to the suggested semi-automated method were 53.6 mg/dl, 1.78mg/dl and 4.68%, respectively.