Short Communication

血漿中の乳糜およびビリルビンが HPLC-ESI/MS による アミノ酸濃度分析に与える影響

中村英寛*, 陰山直子, 吉田寛郎, 森 妹子, 水越利巳, 宮野 博

味の素株式会社 イノベーション研究所

The Influence of Chyle and Bilirubin on Human Plasma Amino Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Ionization Mass Spectrometry

Hidehiro NAKAMURA*, Naoko KAGEYAMA, Hiroo YOSHIDA, Maiko MORI,
Toshimi MIZUKOSHI, Hiroshi MIYANO

Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., 1-1, Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-8681, Japan

Abstract

Plasma amino acid concentrations have been analyzed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS) after precolumn derivatization. However, it is still unknown whether chyle and bilirubin, which are known to interfere with quantifications of some clinical biomarkers, have any influence on plasma amino acid measurement. In this study, we investigated the effects of those interference substances on amino acid concentrations determined by HPLC-ESI/MS. A total of 20 Japanese subjects (volunteers working for Ajinomoto Co., Inc.) were enrolled in this study. Twenty-one amino acid concentrations in plasma were measured with HPLC-ESI/MS after addition of each interference substances (a soy bean oil-egg yolk lecithin for the evaluation of chyle and total bilirubin). No significant changes of amino acid concentrations were observed by the addition of soybean oil (less than 0.25%) and bilirubin (final concentration: 0.5-2.0 mg/dL). Although the addition of 0.5% of soybean oil increased proline and phenylalanine levels significantly, the changes were less than $\pm 5\%$ compared with blank samples. These results suggest that there would be little effects of chyle and bilirubin on the measurement of amino acid concentrations determined by the present HPLC-ESI/MS system.

Keywords: Amino acid; HPLC-ESI/MS; Chyle; Bilirubin

1. はじめに

血液中的のアミノ酸濃度プロファイルは様々な病態発症に伴って特有の変動パターンを示すことが明らかになっており、血液中的のアミノ酸濃度が臨床現場における各種診断指標として広く活用されている。例えば、新生児マススクリーニング検査ではフェニルアラニンやロイシンの血中濃度が各々フェニルケトン尿症やメーブルシロップ尿症といった先天性代謝異常の診断指標として用いられている[1,2]。また、分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸の比で表されるフィッシャー比は肝硬変等の慢性肝疾患の患者では低下することから、そ

れらのアミノ酸濃度が肝疾患の診断や予後の指標として活用されている[3,4]。さらに、最近の研究では各種がんの発症や内臓脂肪の蓄積、インスリン抵抗性の亢進等によっても早期の段階から血液中アミノ酸プロファイルが変動することが明らかになりつつあり、がんやメタボリックシンドロームといった生活習慣病の早期診断マーカーとしての可能性も注目されている[5-7]。

血液中的のアミノ酸プロファイルを各種診断指標として用いる上で、血液中的のアミノ酸濃度を精確に測定することが常に要求されている。1958年に開発されたアミノ酸分析計は、液体クロマトグラフィーによって

*Corresponding author: Hidehiro NAKAMURA
Tel: +81-44-210-5828; Fax: +81-44-210-5871
E-mail: hidehiro_nakamura@ajinomoto.com

Received: 26 February 2016
Accepted: 27 March 2016
J-STAGE Advance Published: 5 April 2016
DOI: 10.15583/jpchrom.2016.002

イオン交換カラムで分離したアミノ酸をニンヒドリン試薬との反応後に検出するものであり、血液中アミノ酸濃度を分析する手法として現在も幅広く用いられている[8]。しかし、この分析法では各種アミノ酸濃度の測定に1検体あたり約2時間を要する点が臨床現場で用いる上では大きな課題であった。この課題を解決するため、high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS)を用いた高速アミノ酸分析のためのプレカラム誘導体化試薬が開発され、高速かつ高感度でアミノ酸濃度が定量可能となった。現在、この手法により21種類のヒト血漿中アミノ酸濃度を8分以内に測定出来ることが報告されている[9-11]。

血清や血漿に含まれる乳糜やビリルビンといった様々な夾雑成分が臨床現場での各種測定値に影響を与えることは広く知られている。乳糜とは、脂質の代謝異常などによって血液中に中性脂肪が増加し乳白色に濁った状態(白濁)を指し、比色法や比濁法で測定する検査項目に影響を与えることが知られている[12]。また、肝臓障害により上昇するビリルビンはペルオキシダーゼによる反応で測定される尿酸やコレステロール、中性脂質の測定値に影響を与えることが報告されている[13]。一方、上述したHPLC-ESI/MSによる高速アミノ酸分析がこれらの夾雑物質による影響を受けるのかについては未だ明らかになっていない。

そこで、本研究では乳糜およびビリルビンといった夾雑成分がHPLC-ESI/MSを用いた血漿中アミノ酸濃度測定に及ぼす影響について検討を行い、本分析手法がヒト臨床検体のアミノ酸濃度測定に広く適用可能であるかを明らかにすることを目的とした。

2. 実験

2.1. 倫理的配慮

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、試験プロトコルは味の素株式会社イノベーション研究所の倫理委員会で承認を受けた。全ての被験者から書面による同意を受け、個人情報保護の観点から予め匿名化されたデータのみを分析および解析に用いた。

2.2. 対象者

味の素株式会社イノベーション研究所在籍の従業員から日本人男女各10名、計20名の被験者をボランティアで募った。

2.3. 採血

採血は10時間以上の絶食後、午前中に被験者の肘静脈よりethylenediaminetetraacetate (EDTA)・2Na入りのベノジェクト®II真空採血管(TERUMO, 東京, 日本)を用いて行った。血液検体は2-3回の転倒混和後、直ちに採血管冷却保冷容器(キューブクーラー®, フォルテグロウメディカル, 佐野, 日本)で15分以上冷却した。その後、4°C, 2010 × gの条件下で15分間冷却遠心分離を行った。得られた血漿サンプルは分

析まで-80°Cで保存した。

2.4. 血漿への夾雑成分の添加

乳糜の影響は、精製大豆油を主成分とする脂肪乳剤であるイントラリピッド輸液20%(フレゼニウスカービジャパン, 東京, 日本)を生理食塩水で16倍、8倍、4倍に希釈したものをそれぞれ血漿200 µLに10%v/v添加することにより評価した(最終大豆油濃度: 0% (生理食塩水添加), 0.13%, 0.25%, 0.50%)。

ビリルビンの影響は、総ビリルビン標準液(極東製薬工業, 東京, 日本)をそれぞれ5 mg/dL, 10 mg/dL, 20 mg/dLとなるように生理食塩水で溶解・希釈したものをそれぞれ血漿200 µLに10%v/v添加することにより評価した(最終ビリルビン濃度: 0 mg/dL (生理食塩水添加), 0.5 mg/dL, 1.0 mg/dL, 2.0 mg/dL)。

2.5. 吸光度測定

各種夾雑成分を添加した血漿70 µLを96穴プレートに入れ、マイクロプレートリーダーSpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)により吸光度を測定した。過去の報告[14,15]に基づき、乳糜の度合いおよびビリルビン濃度を各々660 nm, 450 nmにおける吸光度で推定した。

2.6. アミノ酸分析

アミノ酸分析は既報と同様の方法で行った[11]。概略を示すと、安定同位体で標識されたアミノ酸を含む内標準液(APDS タグワコー用アミノ酸内部標準混合液, 和光純薬工業, 大阪, 日本)75 µLと150 µLのアセトニトリル(Merck, Darmstadt, Germany)を75 µLの各夾雑物質添加済みの血漿サンプルに添加・混合し、遠心分離することにより除タンパク処理を行った。上清を分取し、3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate(和光純薬工業)による誘導体化を行った後、HPLC-ESI/MSによる分析を行った。なお、誘導体化およびHPLC-ESI/MSによる分析はLC/MS高速アミノ酸分析システム(UF-Amino Station, 島津製作所, 京都, 日本)を用いた。

測定対象のアミノ酸は以下に示した21種類のアミノ酸である。グルタミン酸(Glu), セリン(Ser), アスパラギン(Asn), グリシン(Gly), グルタミン(Gln), ヒスチジン(His), スレオニン(Thr), アラニン(Ala), シトルリン(Cit), アルギニン(Arg), プロリン(Pro), α-アミノ酪酸(α-ABA), チロシン(Tyr), バリン(Val), メチオニン(Met), オルニチン(Orn), リジン(Lys), イソロイシン(Ile), ロイシン(Leu), フェニルアラニン(Phe), トリプトファン(Trp)。血漿中濃度が低いアスパラギン酸およびシスチンに容易に変換されるシステインは、精確な濃度測定が困難なため測定対象から除外した。

2.7. 統計解析

各データは平均値±標準偏差(SD)で表した。統

計解析は Graphpad Prism 6 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) および JMP 9.0.0 program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。2 群間の有意差は Welch 法を、多群間の有意差は Dunn's multiple comparison test を用いて検定を行い、Bonferroni の補正による多重比較を行った (有意水準は $P < 0.0023$)。

3. 結果と考察

3.1. 被験者の血漿中アミノ酸プロファイル

本測定で得られた代表的なクロマトグラムを Fig. 1 に示し、被験者における 21 種類の血漿中アミノ酸濃度を Table 1 に示した。本被験者の血漿中アミノ酸濃度は、いずれも過去に日本人 1890 名のアミノ酸濃度データから求められた基準範囲内[16]にあった。また、同報告では、特に Val, Leu, Ile といった分岐鎖アミノ酸濃度が女性よりも男性で高いことを報告しているが、本試験でも同様にこれらのアミノ酸濃度が男性で有意に高い値を示した。以上の結果は、本試験におけるアミノ酸測定値の妥当性を示している。なお、以降の検討は男女の検体を合わせて解析を実施した。

Fig. 1. Typical example of the mass chromatograms of each target peak. The m/z monitored for each amino acid derivative is listed below. Glu: 268.1, Asn: 253.1, Ser: 226.1, Gly: 196.1, Gln: 267.1, His: 276.1, Cit: 296.1, Thr: 240.1, Ala: 210.1, Arg: 295.1, Pro: 236.1, α -ABA: 224.1, Tyr: 302.1, Val: 238.1, Met: 270.1, Orn: 373.1, Lys: 387.1, Ile: 252.1, Leu: 252.1, Phe: 286.1, Trp: 325.1.

3.2. 脂肪乳剤の添加が吸光度および血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響

血液検体が白濁を呈する乳糜の原因としては、中性脂質が高くなる脂質異常症や食事摂取直後の採血が挙げられる。各種分析系に与える乳糜の影響を評価する方法としては、大豆油を主成分とした脂肪乳剤を添加する方法[17]とホルマジンを添加して濁度を高める方法[18]があるが、後者は主に吸光度により濃度を推定する検査に対する乳糜の影響を評価する際に用いられている。本試験では HPLC-ESI/MS を用いて分析を行っているため、乳糜の原因物質により近い脂肪乳剤の添加による影響を評価することとした。

660 nm の吸光度で乳糜の度合いを評価可能という過去の報告[14]に基づき、乳糜の成分である脂肪乳剤を複数濃度添加した血漿の 660 nm における吸光度を測定した。脂肪乳剤の添加量に従って白濁の度合いは増し、実際に吸光度も脂肪乳剤の濃度に依存して直線的に増加した (Fig. 1)。

Table 1. Plasma free amino acid profiles in males and females.

	Total (n = 20)	Male (n = 10)	Female (n = 10)
Glu	21.0 $\pm$ 7.6 (13.5-68.9)	21.7 $\pm$ 6.4 (19.0-76.6)	20.3 $\pm$ 9.0 (12.1-57.2)
Ser	117.8 $\pm$ 16.8 (81.5-154.0)	112.3 $\pm$ 15.3 (82.8-149.0)	123.3 $\pm$ 17.1 (80.3-157.0)
Asn	46.9 $\pm$ 5.8 (33.6-59.2)	49.1 $\pm$ 5.5 (35.9-59.7)	44.7 $\pm$ 5.5 (32.7-58.9)
Gly	244.1 $\pm$ 44.8 (150.2-369.6)	248.1 $\pm$ 40.3 (151.3-295.5)	240.1 $\pm$ 50.7 (149.1-396.7)
Gln	570.4 $\pm$ 73.4 (431.0-691.6)	612.4 $\pm$ 55.4 (467.3-702.0)	528.3 $\pm$ 66.2 (413.8-668.6)
His	83.6 $\pm$ 9.3 (63.8-97.9)	89.4 $\pm$ 8.3 (66.8-101.1)	77.9 $\pm$ 6.2 (62.6-92.7)
Thr	133.4 $\pm$ 19.3 (73.7-169.3)	132.9 $\pm$ 17.6 (88.3-169.6)	133.8 $\pm$ 21.8 (68.1-168.5)
Ala	362.4 $\pm$ 75.1 (211.6-477.2)	361.6 $\pm$ 71.1 (239.1-491.8)	363.2 $\pm$ 82.7 (203.0-442.9)
Cit	29.2 $\pm$ 5.1 (18.9-42.7)	29.9 $\pm$ 5.0 (21.0-43.3)	28.6 $\pm$ 5.5 (17.7-41.7)
Arg	94.3 $\pm$ 19.7 (54.3-121.4)	102.5 $\pm$ 17.2 (64.3-122.5)	86.0 $\pm$ 19.2 (50.3-119.2)
Pro	145.3 $\pm$ 31.8 (74.8-221.8)	152.3 $\pm$ 27.0 (94.0-243.3)	138.3 $\pm$ 36.0 (70.4-187.9)
α -ABA	18.9 $\pm$ 5.2 (11.2-31.6)	17.6 $\pm$ 5.2 (11.7-32.5)	20.2 $\pm$ 5.0 (10.7-30.7)
Tyr	61.5 $\pm$ 8.8 (41.9-80.9)	61.8 $\pm$ 7.5 (47.0-84.0)	61.2 $\pm$ 10.3 (39.9-74.4)
Val	199.9 $\pm$ 22.0 (143.0-287.0)	215.2 $\pm$ 13.2 (182.1-295.3)	184.7 $\pm$ 18.3* (137.5-242.5)
Met	27.0 $\pm$ 3.8 (17.8-33.3)	28.3 $\pm$ 4.2 (20.2-34.2)	25.6 $\pm$ 3.0 (17.0-29.6)
Orn	48.4 $\pm$ 9.3 (27.3-72.4)	51.7 $\pm$ 7.8 (36.2-75.3)	45.2 $\pm$ 10.0 (24.8-68.4)
Lys	190.6 $\pm$ 31.4 (124.9-237.3)	201.3 $\pm$ 30.5 (147.2-242.4)	179.8 $\pm$ 30.0 (114.9-223.1)
Ile	60.3 $\pm$ 10.5 (36.4-85.0)	67.6 $\pm$ 7.9 (47.4-89.9)	53.1 $\pm$ 7.4* (34.9-65.5)
Leu	111.0 $\pm$ 16.9 (76.7-159.5)	122.8 $\pm$ 12.3 (100.9-166.7)	99.2 $\pm$ 12.0* (73.5-125.3)
Phe	56.7 $\pm$ 6.0 (43.0-72.8)	59.1 $\pm$ 6.9 (46.6-74.9)	54.4 $\pm$ 3.9 (41.9-66.3)
Trp	60.0 $\pm$ 6.8 (42.9-74.4)	62.3 $\pm$ 7.6 (47.4-76.9)	57.7 $\pm$ 5.3 (40.9-68.0)

Data are presented as means $\pm$ SD ($\mu\text{mol/L}$). Significant differences between males and females were determined by Welch's t -test. *A significance level of $P < 0.0023$ was established (a Bonferroni-corrected threshold). Japanese reference intervals of plasma amino acid concentrations [16] were shown in parentheses.

生理食塩水 (Blank) もしくは大豆油を添加後に測定した 21 種類の血漿中アミノ酸濃度を、Blank の濃度に対する相対値で Table 2 に示した。最終大豆油濃度が 0.13%, 0.25% になるように脂肪乳剤を添加した血漿

Fig. 2. Change of absorbance at 660 nm by addition of the lipid emulsion. (A) Picture of plasma samples after addition of the lipid emulsion. (B) The absorbance at 660 nm was plotted and simple linear regression analysis was performed ($y = 2.43x + 0.07$, $R^2 = 0.981$). Data are expressed as means $\pm$ SD ($n = 20$).

では、全てのアミノ酸において Blank に比べて有意な濃度変動は認められなかった。0.5%添加時には Pro および Phe の有意な上昇が認められたものの、その他のアミノ酸で脂肪乳剤の添加によるアミノ酸濃度値の影響は認められなかった。また、有意差が認められた Pro, Phe に関してもその変動幅は平均 4%以内であり、その他のアミノ酸も変動幅は全て $\pm 3\%$ 以内であった。本測定系の再現性が 2-7%であること [11] や性別 (Table 1)・年齢・BMI がアミノ酸濃度に与える影響が大きいこと [16,19] を考えると、本試験で認められた変動幅は十分に小さいと考えられる。

なお、当研究所が保有しているヒト血漿検体から白濁検体を一部選定し 660 nm における吸光度を測定した結果、白濁検体の吸光度は 0.2-1.0 ($n=3$)、すなわち大豆油の添加量に換算すると 0.05-0.4%と本評価の範囲内にあった (data not shown)。したがって、臨床現場で採取されるヒト血漿検体においても乳糜の有無が本測定法に与える影響は小さいことが推察される。一方で、乳糜成分にはカイロミクロンや脂肪酸、グリセリンといったトリグリセリド (大豆油) 以外の成分も含まれているため、これらがアミノ酸測定値に与える影響については更なる検討が必要である。

3.3. ビリルビンの添加が吸光度および血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響

450 nm の吸光度でビリルビン濃度を推定した過去の報告 [15] に基づき、総ビリルビンを複数濃度添加した血漿の 450 nm における吸光度を測定した。血漿はビリルビンの添加量に応じて黄色みを帯び、吸光度も直線的に増加した (Fig. 2)。アミノ酸分析値については、21 種類全てのアミノ酸において最終ビリルビン添加濃度 0.5-2.0 mg/dL の範囲内で Blank (生理食塩水添加) に比べて有意な濃度変動は認められず、変動幅の平均も全て 3%以内であった (Table 3)。

ビリルビンは肝臓や胆嚢の障害時にその血中濃度が高くなることが知られており、健康人における総ビリルビンの基準範囲は 0.3-1.5 mg dL である [20]。最終濃

Table 2. The effect of addition of the lipid emulsion on the plasma amino acid concentrations.

	Final concentration of soybean oil added to plasma		
	0.13%	0.25%	0.50%
Glu	0.99 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
Ser	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.03
Asn	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.03
Gly	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
Gln	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.02
His	1.00 ± 0.03	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.03
Thr	1.02 ± 0.04	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.04
Ala	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.04
Cit	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06
Arg	1.02 ± 0.05	1.03 ± 0.05	1.03 ± 0.06
Pro	1.00 ± 0.03	1.02 ± 0.04	$1.03 \pm 0.05^*$
α -ABA	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.00 ± 0.05
Tyr	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.03
Val	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.03
Met	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04	1.00 ± 0.05
Orn	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.04	0.99 ± 0.03
Lys	1.02 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.04
Ile	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.04	1.03 ± 0.03
Leu	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.03	1.01 ± 0.04
Phe	1.01 ± 0.03	1.02 ± 0.04	$1.04 \pm 0.03^*$
Trp	1.01 ± 0.03	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.03

Plasma amino acid concentrations were measured after addition of the lipid emulsion and shown as relative values to blank samples prepared by the addition of saline instead of the lipid emulsion. Values were represented as means $\pm$ SD ($n = 20$). Significant differences were determined by Dunn's multiple comparison test. *A significance level of $P < 0.0023$ was established (a Bonferroni-corrected threshold).

Fig. 3. Change of absorbance at 450 nm by addition of bilirubin. (A) Picture of plasma samples after addition of bilirubin. (B) The absorbance at 450 nm was plotted and simple linear regression analysis was performed ($y = 0.18x + 0.25$, $R^2 = 0.894$). Data are expressed as means $\pm$ SD ($n = 20$).

度として 2.0 mg/dL の総ビリルビンを添加してもアミノ酸濃度値に変動は見られなかったという本試験の結果から、ビリルビン濃度が基準範囲内にある場合においてビリルビンは本測定手法により求められるアミノ酸濃度値には殆ど影響を及ぼさないと考えられた。

Table 3. The effect of addition of bilirubin on the plasma amino acid concentrations.

	Final concentration of total bilirubin added to plasma		
	0.5 mg/dL	1.0 mg/dL	2.0 mg/dL
Glu	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.03
Ser	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.04	0.99 ± 0.03
Asn	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.02
Gly	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.01
Gln	0.99 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02
His	0.99 ± 0.04	1.00 ± 0.03	0.99 ± 0.03
Thr	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.03
Ala	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.04
Cit	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.05
Arg	1.02 ± 0.05	1.02 ± 0.05	1.02 ± 0.05
Pro	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.03
α-ABA	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.03
Tyr	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04
Val	1.01 ± 0.03	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.04
Met	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.03
Orn	0.98 ± 0.03	0.99 ± 0.02	1.01 ± 0.04
Lys	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.04	0.98 ± 0.04
Ile	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.04
Leu	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.05
Phe	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.03
Trp	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.99 ± 0.02

Plasma amino acid concentrations were measured after addition of total bilirubin and shown as relative values to blank samples prepared by the addition of saline instead of bilirubin solution. Values were represented as means ± SD (n = 20). Significant differences were determined by Dunn's multiple comparison test. *A significance level of $P < 0.0023$ was established (a Bonferroni-corrected threshold).

4. まとめ

乳糜の主成分である脂肪乳剤、およびビリルビンの添加は HPLC-ESI/MS によるアミノ酸濃度分析に殆ど影響を与えなかった。本分析手法はこれらの夾雑物質を含む臨床検体においても精確に血漿中アミノ酸濃度を測定できると考えられる。

引用文献

- [1] Chace, D.H.; Kalas, T.A.; Naylor, E.W. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1797-1817.
- [2] Chace, D.H.; Kalas, T.A. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 296-309.
- [3] Fischer, J.E.; Yoshimura, N.; Aguirre, A.; James, J.H.; Cummings, M.G.; Abel, R.M.; Deindoerfer, F. *Am. J. Surg.* **1974**, *127*, 40-47.
- [4] Campollo, O.; Sprengers, D.; McIntyre, N. *Rev. Invest. Clin.* **1992**, *44*, 513-518.
- [5] Miyagi, Y.; Higashiyama, M.; Gochi, A.; Akaike, M.; Ishikawa, T.; Miura, T.; Saruki, N.; Bando, E.; Kimura, H.; Imamura, F.; Moriyama, M.; Ikeda, I.; Chiba, A.; Oshita, F.; Imaizumi, A.; Yamamoto, H.; Miyano, H.; Horimoto, K.; Tochikubo, O.; Mitsushima, T.; Yamakado, M.; Okamoto, N. *PLoS One* **2011**, *6*, e24143.
- [6] Yamakado, M.; Tanaka, T.; Nagao, K.; Ishizaka, Y.; Mitsushima, T.; Tani, M.; Toda, A.; Toda, E.; Okada, M.; Miyano, H.; Yamamoto, H. *Clin. Obes.* **2012**, *2*, 29-40.
- [7] Nakamura, H.; Jinzu, H.; Nagao, K.; Noguchi, Y.; Shimba, N.; Miyano, H.; Watanabe, T.; Iseki, K. *Nutr. Diabetes* **2014**, *4*, e133.
- [8] Moore, S.; Spackman, D.H.; Stein, W.H. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1185-1190.
- [9] Shimbo, K.; Oonuki, T.; Yahashi, A.; Hirayama, K.; Miyano, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1483-1492.
- [10] Shimbo, K.; Kubo, S.; Harada, Y.; Oonuki, T.; Yokokura, T.; Yoshida, H.; Amao, M.; Nakamura, M.; Kageyama, N.; Yamazaki, J.; Ozawa, S.; Hirayama, K.; Ando, T.; Miura, J.; Miyano, H. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 683-691.
- [11] Yoshida, H.; Kondo, K.; Yamamoto, H.; Kageyama, N.; Ozawa, S.; Shimbo, K.; Muramatsu, T.; Imaizumi, A.; Mizukoshi, T.; Masuda, J.; Nakayama, D.; Hayakawa, Y.; Watanabe, K.; Mukaibatake, K.; Miyano, H. *J. Chromatogr. B* **2015**, *998-999*, 88-96.
- [12] Kuromoto, K. *Rinsho Kensa* **2013**, *57*, 1420-1421.
- [13] Spain, M.A.; Wu, A.H. *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 518-521.
- [14] Mukaide, K. *J. Anal. Bio-Sci.* **2009**, *32*, 393-400.
- [15] Mukherjee, A.B.; Krasner, J. *Science* **1973**, *182*, 68-70.
- [16] Yamamoto, H.; Kondo, K.; Tanaka, T.; Muramatsu, T.; Yoshida, H.; Imaizumi, A.; Nagao, K.; Noguchi, Y.; Miyano, H. *Ann. Clin. Biochem.* **2016**, *53*, 357-364.
- [17] Mitsumoto, K.; Yabusaki, K.; Kobayashi, K.; Shirasawa, Y.; Obata, T. *J. Clin. Lab. Anal.* **2009**, *23*, 117-124.
- [18] Kitahashi, T.; Furuta, I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 615-620.
- [19] Nakamura, H.; Nishikata, N.; Kawai, N.; Imaizumi, A.; Miyano, H.; Mori, M.; Yamamoto, H.; Noguchi, Y. *Am. J. Hum. Biol.* **2016**, *28*, 236-239.
- [20] Nakamura, M.; Shimizu-Yoshida, Y.; Takii, Y.; Komori, A.; Yokoyama, T.; Ueki, T.; Daikoku, M.; Yano, K.; Matsumoto, T.; Migita, K.; Yatsushashi, H.; Ito, M.; Masaki, N.; Adachi, H.; Watanabe, Y.; Nakamura, Y.; Saoshiro, T.; Sodeyama, T.; Koga, M.; Shimoda, S.; Ishibashi, H. *J. Hepatol.* **2005**, *42*, 386-392.