

として肝炎診療ネットワーク構築の早期実現、などを今後の展望とした肝炎対策事業が必要であろう。

まとめ

HCV抗体陽性者の自然経過は、HCV暴露から高率に慢性化し、20～30年後に肝硬変、そしてHCC発癌へと移行することが明らかとなってきた。つまり慢性肝炎を如何に治療し肝硬変へ移行させないか、また肝硬変の場合は肝癌の早期発見をする必要がある。現在では、慢性肝炎の患者さんをIFN、UDCA、プロテアーゼ阻害剤などの集学的治療により、肝癌撲滅をめざしウイルス性慢性肝炎から、肝硬変に移行しないように努力することが肝要である。

参考文献

- 1) Sanchez-Tapias JM, Diago M, et al : Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology*. 2006 ; 131 (2) : 451-60.
- 2) Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, et al. Pegylated interferon-alpha2b : pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther*. 2000 ; 68 : 556-67.
- 3) PEG-Intron. *PDR*. 56th ed. 2002.
- 4) ROFERON-A. *PDR*. 56th ed. 2002.
- 5) INTRON A. *PDR*. 56th ed. 2002.
- 6) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest*. 1995 ; 96 : 224-30.
- 7) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al : Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*. 1996 ; 334 : 77-81.
- 8) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al : Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2005 ; 48 : 372-80.
- 9) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al : Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol*. 2006 ; 78 : 83-90.
- 10) Tokyo Cooperative Gallstone Study Group. Efficacy and indication of ursodeoxycholic acid treatment for dissolving gallstones. A multicenter double blind trial. *Gastroenterology* 1980 ; 78 : 542-8.
- 11) Oka H, Toda G, Ikeda Y, et al. A multi-center double-blind controlled trial of ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Gastroenterolo Jpn* 1990 ; 25 : 774-780
- 12) Poupon RE, Chretien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987 ; i : 834-836.
- 13) Osuga T, Tanaka N, Matsuzaki Y, et al. Effect of ursodeoxycholic acid in chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1989 ; 34 (Suppl 12) : 49-51
- 14) Matsuzaki Y, Tanaka N, Osuga T, et al. Improvement of biliary enzyme levels and itching as a result of long-term administration of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1990 ; 85 : 15-23
- 15) Takikawa H, Yamanaka M, Miyake K, et al. Ursodeoxycholic acid therapy for chronic type C hepatitis : A multicenter, dose-finding trial. *Curr. Ther. Res*. 1994 ; 55 : 16-21.
- 16) Poupon RE, Balkou B, Eschwege E, et al. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1991 ; 324 : 1548-1554.
- 17) Omata M, Yoshida H, Toyota J, et al. A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2007 ; 56 (12) : 1747-53.
- 18) Chiba T, Matsuzaki Y, Abei M, et al. The role of previous hepatitis B virus infection and heavy smoking in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1996 ; 91 : 1195-1203.
- 19) Matsuzaki Y, Chiba T, Hadama, et al. HBV genome integration and genetic instability in HBsAg-negative and anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Letters* 1997 ; 119 (1) : 53-61.
- 20) Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, et al. The associated markers and their limitations for the primary screening of HCV carriers in public health examination. *Hepatol Res* 2009 ; 39 (7) : 664-74.

今月の主題 ウイルス肝炎日常診療のポイント

C型肝炎の日常診療

インターフェロン療法が行えない場合の対応

松崎 靖司 池上 正 斎藤 吉史 本多 彰

medicina

第47巻 第3号 別刷

2010年3月10日 発行

医学書院

インターフェロン療法が行えない場合の対応

松崎 靖司・池上 正・斎藤 吉史・本多 彰

ポイント

- ★肝庇護療法はC型肝炎ウイルス(HCV)を排除しないものの、肝炎を鎮静化し、肝細胞の再生を促すことにより、肝線維化進展を抑える治療法である。
- ★肝庇護療法としては、ウルソデオキシコール酸(UDCA)、強力ネオミノファーゲンC(SNMC)の投与が有用である。
- ★血液中の鉄分は、C型慢性肝炎の進展に影響しているため、瀉血を行う。

本邦においては、肝癌の原因の80%はC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)に起因する。つまり、肝癌撲滅を目指すには慢性肝炎から肝硬変への移行を阻止することが大命題である。しかし、さまざまな理由でインターフェロン(interferon: IFN)治療の恩恵にあずかれない患者群が存在する。現段階で最も問題になるのは、線維化が進行しつつあり、近い将来肝癌の超ハイリスク群に移行していくと思われるグループであろう。年齢的には60歳台後半からの患者の多くがこれに属している。これらの患者は現行のIFN治療によっても、①すでに進行した線維化があり、このため治療抵抗性が存在する、②薬剤の耐受性が若年群に比較して低い、などの理由によりSVR(sustained viro-

logical response)に至らないことが多く、数年後に投入が予想される新規薬剤を待機するような時間的余裕もないことが多い。したがって、これらの患者の肝硬変への進展を抑制し、さらには発癌を抑制することは臨床医としては差し迫った課題である。

近年、いくつかの肝炎をめぐる訴訟が起こっている。肝炎診療をきちんと行わないことに対する厳しい判決がなされる時代となってきた。例えばIFN治療が無効であった場合、予後について正確に説明せず、肝癌ができた場合など、今後訴訟問題となることもありうる。最新の情報を把握し、病診・病病連携をきちんととり、日常診療を行うことがこれからの医療現場では肝要かと思われる。

本稿では、IFN無効例に対して現在行われている治療、特に線維化進展や肝発癌抑制を視野に入れたものについて概説する。

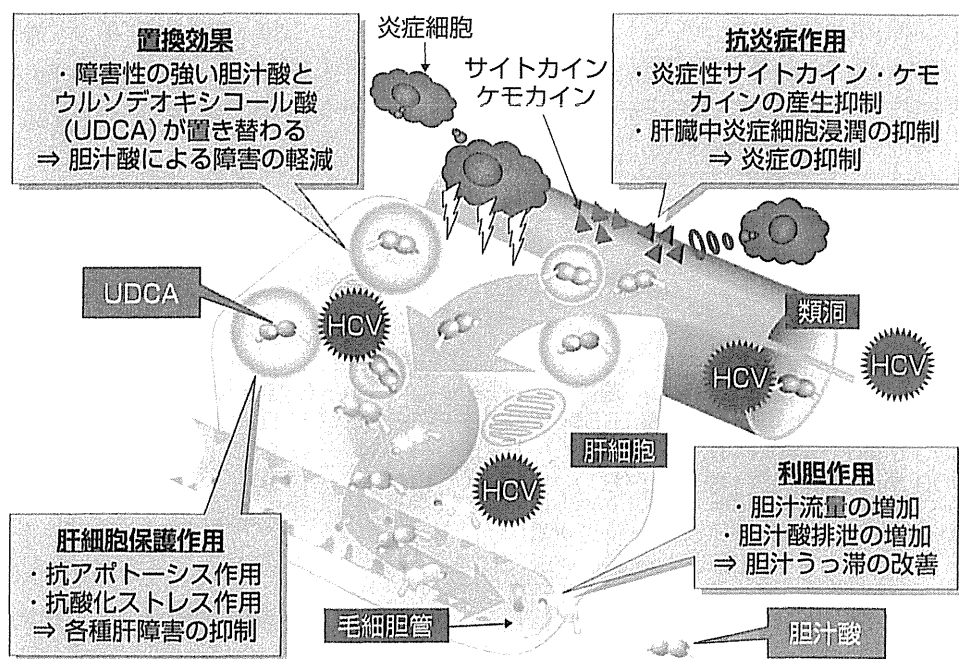
肝庇護療法

C型慢性肝炎に対する再治療ガイドライン

2009年度版の「C型慢性肝炎に対する再治療ガイドライン」では、「IFN非適応例および

まつざき やすし、いけがみ ただし、さいとう よしふみ、ほんだ あきら：東京医科大学茨城医療センター消化器内科
〒300-0395 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-20-1

【図1】 ウルソ®UDCA
の薬理作用（肝機能改善
作用）



IFNでALT値，AFP値の改善が得られない症例は肝庇護薬(SNMC，UDCA)，瀉血療法を単独あるいは組み合わせて治療する」と明記している。さらに「肝炎進展予防(発癌予防)を目指した治療のALT目標値はstage 1(F1)では、持続的に基準値の1.5倍以下にコントロールする。ステージ2～3(F2～F3)では、極力正常値ALT \leq 30 IU/lにコントロールする」これは、C型慢性肝炎患者については、ALT値が基準値以下に低下している症例では、そうでない患者に比べて明らかに肝発癌のリスクが低かった、というようにいくつかの後ろ向き調査の結果を根拠としている。

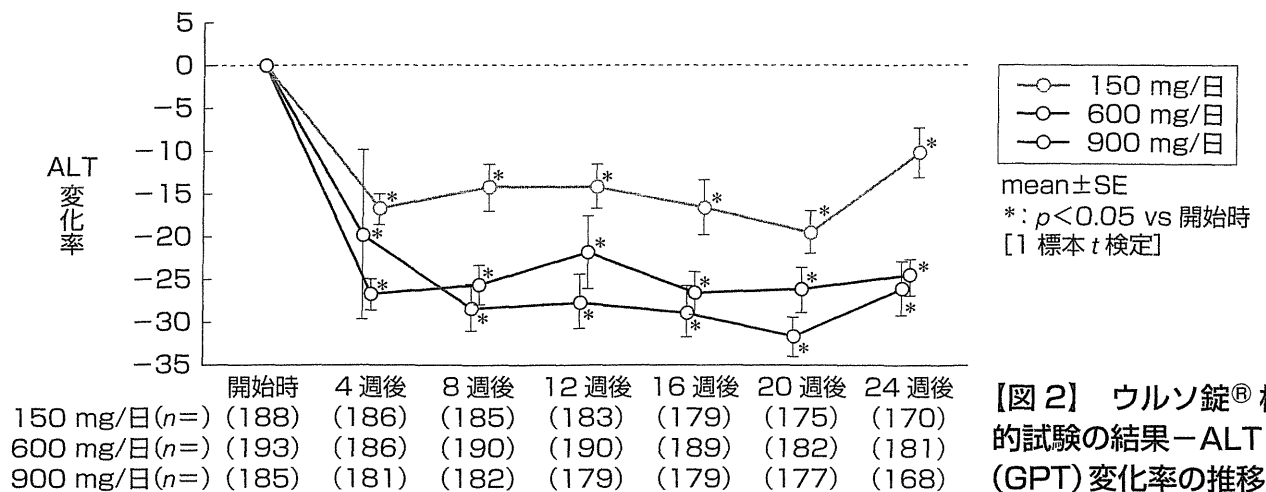
肝庇護療法はHCVを排除しないものの、肝炎を鎮静化し肝細胞の再生を促すことにより、肝線維化進展を抑える治療法である。C型慢性肝炎で肝庇護療法の適応になるのは、肝臓の炎症マーカーであるALTが異常値を示す患者で、抗ウイルス療法にてウイルス排除ができなかった患者、IFN療法の副作用により抗ウイルス療法を実施できない患者、実施できても規定の投与期間を完遂できない患者、また抗ウイルス療法を望まない患者が主な対象者となる。肝庇

護療法の歴史は古く、これまで多くの治療法が試みられている。そのなかでも、ウルソデオキシコール酸(UDCA)のウルソ錠®と、グリチルリチン製剤の注射薬の先発品である強力ネオミノファーゲンC(SNMC)は、有用性において科学的な根拠を有して使用されだした治療法とされている。

ウルソデオキシコール酸(UDCA)

経口肝庇護療法の第一選択薬としては、UDCA(ウルソ錠®)が挙げられる。UDCAは胆汁酸製剤であり、古来より動物性生薬として珍重された「熊胆」の成分である。本邦において1970年代後半より胆石溶解薬として使用されるようになった。原発性肝汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)や慢性肝炎に対するUDCAの有効性の成績は、二重盲検法により本邦を含め世界から報告された。

作用機序について、以下に現在考えられているものをまとめてみる(図1)。UDCAの投与により、細胞傷害性の胆汁酸がUDCAに置き換わり肝細胞膜が保護されると考えられてい



る。また、UDCAには抗酸化ストレス作用、免疫調整作用、抗アポトーシス作用もあり、肝細胞の保護に働いているとも報告されている。これら複合的な機序により、C型慢性肝炎に対してUDCAは肝機能の改善効果を発揮するものとされる。

2007年3月にウルソ錠®はC型慢性肝疾患に対する効能追加が承認された。以前からウルソ錠®は150 mg/日の使用が可能であったが、二重盲検法であるコントロール試験が国内63施設において実施された。その結果、ウルソ錠®150 mg/日投与群に比べ600 mg/日および900 mg/日投与群での投与開始4~24週間におけるAST、ALTおよび γ -GTP値の改善が有意の差をもって認められた(図2)。このような有効性が確認され、併せて安全性に問題ないことが確認され¹⁾、承認に至った。現在、C型慢性肝疾患に対する効果的なウルソ錠®投与量は600~900 mg/日である。

同剤の慢性C型肝炎患者に対するALT改善効果、あるいは病勢進行の抑制、さらに発癌予防効果については、前向き研究はないものの、Taraoらは、ウルソ錠®投与を受けた群(17.9%)では、受けない群(39.1%)に比べて5年以上の観察期間中での肝細胞癌の発生が有意に低かったとの後ろ向き研究の結果を発表²⁾している。

興味深いのは、彼らはALTが80 IU/l以下になるようにウルソ錠®だけでなく、ほかの肝庇護薬を加えているが、ウルソ錠®投与群と非投与群でALTの値自体には有意な差がみられなかったとしている点で、ALT改善とは別の発癌予防効果を推測している。

強力ネオミノファーゲンC (SNMC)

甘草の成分であるグリチルリチンが主成分であり、本邦では古くから肝障害や蕁麻疹の治療のため用いられてきた。作用機序の本体はグリチルリチンのもつ弱ステロイド作用とされ、抗炎症効果によりALTの改善をみると考えられている。

SNMCは、国内36施設における慢性肝炎症例を対象に、1日40 ml、1カ月間連日投与の二重盲検比較試験が行われた。その結果、本剤投与群の有効率は、プラセボ群比し、AST、ALTおよび γ -GTP値の改善が有意の差をもって認められた。これにより、1979年「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」が追加承認された。さらに、1日投与量40 mlでは効果の不十分な症例もあることから、慢性肝炎、肝硬変症を対象に、1日40 ml、3週間連日静注投

与を行い、2週目のALT値が正常値上限の1.5倍以上に改善しなかった症例を対象に、40 ml 継続投与群と100 ml 増量投与群との用量別比較試験が行われた。その結果、100 ml 増量投与群が40 ml 継続投与群に比し、有意にALT値を改善させることが明らかとなったこれにより、1994年、慢性肝疾患の用法・用量に関する承認事項の一部変更が承認され、1日100 mlを限度とした大量投与が可能となった³⁾。

SNMCの肝疾患進行の予防については、やはり本邦発の後ろ向き研究になるが、投与群が非投与群に比べ有意に肝発癌率が低下したとする報告がある⁴⁾(表1)。ただし、この報告では長期予後の違いについては言及されていない。この報告から、C型慢性肝炎後の発癌予防にはウイルスの排除が第一であるが、炎症を抑制してトランスアミナーゼ値を落ち着かせておくことも重要との認識が得られた。現在、各社からジェネリック医薬品が販売されているが、ALT改善率については、オリジナルの製剤が優れているという意見もある。

瀉血療法

血液中の鉄分はC型慢性肝炎の進展に影響していることが明らかになっている。すなわち、細胞内の鉄蓄積増加に伴い、自由鉄が増加し、この鉄がフェントン反応によってフリーラジカルを産生し、細胞傷害、DNA傷害を起こすとされている。そこで、鉄欠乏性貧血を人為的に作り出し、肝臓における過剰な鉄を赤血球造血に動員して、結果として肝臓での鉄含有量を減少させることを目的として瀉血療法が考案された。具体的には1回200 ml/週を、約3カ月を目途にヘモグロビン値で11 g/dl、もしくはフェリチン値を10 ng/ml以下となるまで瀉血を行う。続いて維持瀉血期間として、ヘモグロビン値、フェリチン値を上記程度に維持するよ

【表1】強力ネオミノファーゲンC(SNMC)注は肝発癌のリスクを低下させる(文献4より抜粋)

因子	カテゴリー	リスク比 (95% CI)	p
線維化 レベル	F1	1	
	F2~3	2.94(1.20~7.21)	0.018
	F4	9.21(3.73~22.8)	<0.001
性別	1:女性	1	
	2:男性	2.80(1.35~5.81)	0.006
SNMC注 の有無	1:no	1	
	2:yes	0.49(0.27~0.86)	0.014

342名の慢性C型肝炎患者のうち、SNMC投与を行った群での肝発癌率は5年で13.3%、10年で21.5%、非投与群では5年で26%、10年で35.5%であった。比例ハザードモデルを用いた解析では、SNMC注射の有無が有意に発癌率を低下させる要因として抽出された。

うに1~3カ月間隔で200 mlの瀉血を行う。鉄欠乏状態を維持するためには鉄制限食の摂取を継続する必要もあり、鉄の1日摂取量6 mg以下を目標とした鉄制限を継続するよう指導する。瀉血療法の効果については、本邦を中心にいくつかの研究が報告されているが、大規模無作為抽出試験(randomized controlled study: RCT)が行われたものは少ない。2004年にYanoらが行ったRCTでは、3カ月の瀉血継続によって38.1%の患者にALT値の改善が認められ、非施行群に比べ有意差があったとしている⁵⁾。

おわりに

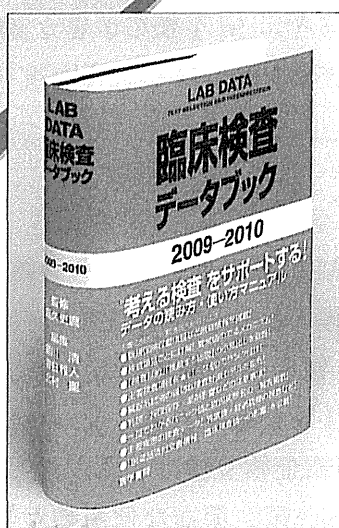
前述のように、ALT値が低ければ低いほど、肝発癌率は低率であるという臨床データが蓄積されてきた。ALT値を極力低値に改善し、その状態を維持する必要がある。よって、日常診療上、軽度の肝機能検査値の異常がみられても、ウルソ錠®やSNMC、瀉血などを使用し、積極的に正常値以下に改善させることが肝癌撲滅の道へつながる。また、健康診断などで肝機能異常(ALT, AST, γ -GTP)を指摘された際、判断が難しい場合は肝臓専門医に一度相談されることを勧める。これは重要な病診連携である。

肝疾患診療におけるネットワークを構築することが今や重要な課題となっている。

文献

- 1) Omata M, et al : A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 56 : 1747-1753, 2007
- 2) Tarao K, et al : Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 : 164-169, 2005
- 3) Iino S, et al : Therapeutic effects of stronger neominophagen C at different doses on chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepato Res* 19 : 31-40, 2001
- 4) Ikeda K, et al : A long-term glycyrrhizin injection therapy reduces hepatocellular carcinogenesis rate in patients with interferon-resistant active chronic hepatitis C : A cohort study of 1,249 patients. *Dig Dis Sci* 51 : 603-609, 2006
- 5) Yano M, et al : A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C : A multi-center, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* 39 : 570-574, 2004

“考える検査”を力強くサポートする、全医療関係者必携の検査値判読マニュアル



臨床検査データブック 2009-2010

監修 高久史磨
編集 黒川 清 / 春日雅人 / 北村 聖

大好評の「2007-2008」年版に続いて、読者の要望を可能な限り紙面に反映し、新規保険収載項目の追加、項目の見直し、検査各論には新小見出し「検査目的」「推奨する総説」が加わるなど、盛り沢山の改訂。必要な検査と無駄な検査を見極める全医療関係者必携の検査値判読マニュアルが、さらに強力になって登場。“考える検査”をサポートする1冊。

●B6 頁1016 2009年 定価5,040円 (本体4,800円+税5%) [ISBN978-4-260-00729-0]
消費税変更の場合、上記定価は税率の差額分変更になります。



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷1-28-23

【販売部】TEL: 03-3817-5657 FAX: 03-3815-7804

E-mail: sd@igaku-shoin.co.jp http://www.igaku-shoin.co.jp 振替: 00170-9-96693

携帯サイトはこちら



Medical Practice

2010 vol. 27 no. 1

IFN無効例に対する治療

—線維化伸展の抑制・発癌の抑制をめざして—

池上 正・松崎靖司

IFN無効例に対する治療

—線維化伸展の抑制・発癌の抑制をめざして—

池上 正・松崎靖司

東京医科大学茨城医療センター消化器内科/いけがみ・ただし まつざき・やすし

はじめに●

C型肝炎患者ではHCVウイルスの排除が可能であり、これにより肝硬変への伸展、あるいは肝発癌のリスクが明らかに減少する。前項までに述べられたように、抗ウイルス薬の発達、あるいは併用薬剤や投与方法の工夫により、C型肝炎では10年前と比較すると飛躍的にSVR率が向上している。今後新たな薬剤が次々に市場に投入される予定とされており、さらに治療効果は改善していくものと考えられる。しかし一方で、さまざまな理由でこれらの治療法の恩恵に預かれない患者群がいまだに存在する。現段階で最も問題になるのは、線維化が進行しつつあり、近い将来肝癌の超ハイリスク群に移行していくと思われるグループであり、年齢的には60歳代後半からの患者の多くがこれに属している。これらの患者は現行のIFN治療によっても、①すでに進行した線維化があり、このため治療抵抗性が存在する、②薬剤の耐容性が若年群に比較して低い、などの理由によりSVRに至らないことが多く、数年後に投入が予想される新規薬剤を待機するような時間的余裕もないことが多い。したがってこれらの患者の肝硬変への伸展を抑制し、さらには発癌を抑制することは臨床医としては差し迫った課題であるといえ、実際に多くの臨床医の頭を悩ませている問題だと思われる。本稿では、IFN無効例に対して現在行われている治療、特に線維化伸展や肝発癌抑制を視野に入れたものについて解説する。B型肝炎については、抗ウイルス薬の登場によりIFN無効例についての問題が比較的少なくなってきたこと、本稿ではC型肝炎患者に関する治療に絞って述べることにする。

C型慢性肝炎に対する再治療ガイドライン●

本特集の最初の項にもあるように、2008年度

版のC型肝炎治療ガイドラインでは、「再治療に関しては、初回治療の無効の要因を検討し、治療目的の治療か、進展予防(発癌予防)を目指したALT値の正常化、あるいは安定化のための治療法を選択すべき」と明記している。これは、65歳以上で、肝硬変のない患者については、ALT値が正常値以下に低下している症例($ALT \leq 40$)では、そうでない患者($ALT \geq 41$)に比べ明らかに肝疾患の進行、肝発癌のリスクが低かった、といういくつかの後ろ向き調査の結果を根拠としている。また、初回IFN無効例への再投与はIFN+リバビリン併用療法が治療の基本であるが、リバビリン併用療法の非適応例、無反応例ではIFNの長期投与が望ましい、としている。さらに、IFN非適応例およびIFNでALT値の改善が得られない症例は、肝庇護剤(強力ミノファージェンC、ウルソデオキシコール酸)、瀉血療法を単独あるいは組み合わせで治療することを推奨している。

以前IFN投与を別の医療機関で受けながら効果が得られなかった、として新たに受診した患者については、前回治療にどのような方法が用いられたのか、投与中止に至った場合はどのような理由で、といった内容を詳細に把握することが必要なため、詳しく投与歴を聴取すべきで、ときには前医療機関への問い合わせも必要になることもある。

IFN少量長期投与●

IFN投与後、SVRに至らなかった場合でも、長期間にわたり生化学的に軽快、すなわちALT正常化に至る症例が存在することが示されており、これらの症例では肝発癌のリスクが低下することが明らかになってきた。さらに、ランダムイズされた試験ではないものの、通常のIFN治療

- IFN 無効の要因(治療方法, 副作用, ウイルス側因子など)を検討する.
- IFN 無効例に対して, 進展(発癌)予防を目指した治療法を選択する.
- 肝機能正常化を目指した IFN 長期投与により HCC の発生率が低下する.

後, ウイルス消失がみられなかった症例に対して, 2年以上にわたり天然型 IFN α の投与を受けた群では, IFN 投与を受けなかった群に比べて有意に HCC の発生が低下したとする報告がある¹⁾.

一方, 2008 年に米国で発表された HALT-C スタディは, PEG-IFN α -2a+リバビリン投与を行ったが反応の得られなかった患者 1,050 名を, ランダムに PEG-IFN α -2a 90 μ g 投与群(n=515)と非投与群(n=533)に割付け, 3.5 年間の観察期間として, 線維化の進行や, 肝発癌についてフォローした²⁾. IFN 投与群では, 有意な ALT の低下や, HCV-RNA 量の低下, 肝組織上の壊死性変化の減少がみられたが, 臨床予後ならびに線維化に関しては有意な抑制効果が得られず, PEG-IFN α -2a の長期投与を推奨できる治療法とは認めがたい, と結論づけている. わが国を中心として報告された IFN 長期投与のメリットについては主張した論文の多くは, ランダム化されていない後ろ向き研究がほとんどであり, 臨床試験としては HALT-C に及ぶインパクトはないかもしれない. しかし, HALT-C では観察期間が 3.5 年間と比較的短期間であり, 5~10 年後といった長期間での肝発癌抑制効果について不明であること, またこのトライアルに参加した患者の多くが肝硬変症例であったことなどから, 結論とするには尚早であるように思う. 今後肝硬変症例を含めたインターフェロン長期投与療法の臨床予後に対する効果については, 前向きの研究が進むと思われ, 日本発のエビデンスが示されることが cost-benefit 追求の点からも期待される.

臨床レベルでは, 天然型 IFN α の自己注射が保険診療上認められるようになり, ALT 正常化を目指した投与がより行いやすくなった. 通常は 600 万単位を連日, もしくは隔日で使用開始し,

ALT 値の推移および血球系の副作用などをみながら, 投与量, 投与期間を調節する. 投与期間については一定の見解がなく, 年余にわたる投与を継続する患者も多い. ただし, 保険診療上は, 肝細胞癌患者には IFN 投与は認められていないので, いったん HCC が発生したのち, IFN 投与を継続するには, 治療により HCC がコントロールされていることが前提となる.

● いわゆる肝庇護療法

ウイルス排除のみでなく, ALT 改善効果も IFN 長期投与によって望めないとき, すなわち広義の IFN 無効例とってよいと思うが, いわゆる肝庇護療法により可能な限り ALT を正常値に近づける工夫が必要とされる. それぞれの単独使用により ALT が著明に改善する症例もまれに経験するが, 通常はいくつかの方法を組み合わせることが多い. ガイドラインにおいて示されている, ウルソデオキシコール酸, 強力ミノファゲン C, 瀉血療法について概説する.

1. ウルソデオキシコール酸(ウルソ)

胆汁酸製剤であるウルソは, 日本で開発され, 胆石溶解剤として臨床応用されたのを皮切りにして, 現在では原発性胆汁酸肝硬変や肝内胆汁うっ滞などの疾患の治療薬として世界中で広く用いられている. 慢性 C 型肝炎についても 1980 年代から使用が開始され, ALT 値の低下が期待できる薬剤として現在保険収載されている. 同製剤の作用機序については諸説があるが, 胆汁成分中の胆汁酸組成を変化させること, すなわち, 疎水性が強い, 言い換えれば細胞膜障害性の強い胆汁酸組成を比較的疎水性の弱いウルソデオキシコール酸を加えることによって変化させ, 細胞障害性を低下させることがその本質であるとする考えが一般的である³⁾. したがって, 投与量についても,

- ウルソの効果は濃度依存性であり，1日 600 mg 以上の投与が望ましい。
- 強力ミノファージェン C の投与は肝発癌リスクを低下させる。
- 瀉血療法は RCT の結果約 4 割の患者に肝機能改善効果があった。

300 mg (100 mg 錠, 3 錠, 3 回) よりも, 600 mg (100 mg 錠, 6 錠, 3 回) のほうが AST, ALT, Alp, γ -GTP の改善効果が有意に高いことが, わが国で行われた多施設共同試験の結果明らかになっており⁴⁾, 保険上は 900 mg までの投与が認められている。

同剤の慢性 C 型肝炎患者に対する ALT 改善効果, あるいは病勢進行の抑制, さらに発癌予防効果については, プロスペクティブな研究はないものの, Tarao らはウルソ投与を受けた群 (17.9%) では, 受けない群 (39.1%) に比べて 5 年以上の観察期間中での肝細胞癌の発生が有意に低かったとの後ろ向き研究の結果を発表している⁵⁾。興味深いのは, 彼らは ALT が 80 以下になるようにウルソだけでなく, 他の肝庇護剤を加えているが, ウルソ投与群と非投与群で ALT の値自体には有意な差がみられなかったとしている点で, ALT 改善とは別の発癌予防効果を推測している。

2. 強力ミノファージェン C (SNMC)

甘草中の成分であるグリチルリチンが主成分であり, わが国では古くから肝障害や蕁麻疹の治療のため用いられてきた。作用機序の本体はグリチルリチンのもつステロイド様作用とされ, 抗炎症効果により ALT の改善をみると考えられている。慢性肝疾患に対しては 1 日 1 回 40~60 ml を静脈内に注射または点滴静注する。なお, 増量する場合は 1 日 100 ml を限度とする。通常週 3 回程度の投与から開始することが多いが, ALT 値の変動によっては連日投与することもある。ただし, 慢性 C 型肝炎患者の場合は外来での投与が基本となり, 静脈注射であるので頻りに医療機関を訪れる必要があり, 時間的な制約のある患者には敬遠されることが多い。したがって, 柔軟に対応可能な小規模診療所などと連携し注射を行ってもらうことが必要となる。副作用として知られる

表 1 強力ミノファージェン注は肝発癌のリスクを低下させる

factors	category	risk ratio (95% CI)	p
線維化レベル	F1	1	0.018
	F2~3	2.94 (1.20~7.21)	
	F4	9.21 (3.73~22.8)	
性別	1: female	1	<0.001
	2: male	2.80 (1.35~5.81)	
SNMC 注の有無	1: No	1	0.006
	2: Yes	0.49 (0.27~0.86)	

342 名の慢性 C 型肝炎患者のうち, SNMC 投与を行った群での肝発癌率は 5 年で 13.3%, 10 年で 21.5%, 非投与群では 5 年で 26%, 10 年で 35.5% であった。比例ハザードモデルを用いた解析では, SNMC 注射の有無が有意に発癌率を低下させる要因として抽出された。

(文献 6) より抜粋引用)

のは, 血圧の上昇と偽アルドステロン症による低カリウム血症であり, ときどきモニターが必要であるが, おおむね安全に使用可能である。

SNMC の肝疾患進行の予防については, やはりわが国発の後ろ向き研究になるが, 投与群が非投与群に比べ有意に肝発癌率が低下したとする報告がある (表 1)⁶⁾。ただし, この報告では長期予後の違いについては言及されていない。現在各社からジェネリックが販売されているが, ALT 改善率については, オリジナルの製剤が最も優れているという評価がある。これを勘案して, ガイドライン上でも, 「グリチルリチン製剤」とせず, 「強力ミノファージェン C」と表記している。

3. 瀉血療法

血液中の鉄分は慢性 C 型肝炎の進展に影響していることが明らかになっている。すなわち, 細胞内の鉄蓄積増加に伴い, 自由鉄が増加し, この鉄がフェントン反応によってフリーラジカルを産生し, 細胞障害, DNA 障害を起こすとされている。鉄欠乏性貧血を人為的に作り出し肝臓におけ

- 他にいくつかの肝庇護剤があるが、使用の根拠となる科学的評価が乏しい。
- 肝庇護療法の組み合わせ、回数、投与量などをテーラーメイド化する。
- 肝庇護療法は病診連携の必要性の高い領域である。

表2 瀉血療法とALT値改善効果についての報告例

報告者	ALT改善率	ALT正常化率	備考
Hayashi, H. et al. (1994)	63.8%	50.0%	
Kato, J. et al. (2001)	77.0%	64.7%	
Yano, M. et al. (2002)	42.6% (1year)	46.2%	
Yano, M. et al. (2004) RCT	38.1% (3 mo)	N/A	対照と有意差あり
Kawamura, Y. et al. (2005)	65.2%	43.9%	

る過剰な鉄を赤血球造血に動員して、結果として肝臓での鉄含有量を減少させることを目的として瀉血療法が考案された⁷⁾。具体的には1回200 ml/週を、約3ヵ月をめぐってヘモグロビン値で11 g/dl、もしくはフェリチン値を10 ng/ml以下となるまで瀉血を行う。続いて維持瀉血期間として、ヘモグロビン値、フェリチン値を上記程度に維持するように1~3ヵ月間隔で200 mlの瀉血を行う。鉄欠乏状態を維持するためには鉄制限食の摂取を持続することも必要であり、鉄の一日摂取量6 mg以下を目標とした鉄制限を継続するよう指導する。瀉血療法の効果については、わが国を中心にいくつかの研究が報告されているが、RCTが行われたものは少ない(表2)。2004年にYanoらが行ったRCTでは、3ヵ月の瀉血継続によって、38.1%の患者にALT値の改善が認められ、非施行群に比べ有意差があったとしている⁸⁾。

4. その他の肝庇護剤

古くから、牛肝からの抽出成分を用いた製剤(プロヘパール[®])や、グリチルリチン含有の経口製剤(グリチロン[®])などの肝庇護剤が用いられてきたが、これらに関してはエビデンスとなる検討

結果がほとんどなく、標準的な肝庇護療法としては推奨しにくい。

まとめ●

ウイルス排除を目標としたIFN療法の恩恵に預かれない患者群がいまだに存在し、さらにこれらの患者の多くは肝硬変への進展、肝発癌の危険にさらされている。本稿であげた治療法は完全ではないが、これらのリスクを軽減させる可能性がある。同一の内容を漫然と続けるのではなく、いくつかの治療法の組み合わせや、回数、投与量を調節することでできるだけALTを正常値に近づける努力をすべきであり、その方法は個々の患者によって異なるため、外来主治医がそれぞれにテーラーメイド化して処方内容を決めていく必要がある。また、肝庇護療法は安価であり、安全性も高いため、診療所レベルでの取り組みが行いやすいというメリットがある。病診連携の観点から考えても、多くのかかりつけ医にこれらの方法に習熟してもらい、積極的に行ってもらうことが重要である。肝疾患拠点病院の役割の中心の一つはインターフェロン療法の普及であるが、これとは別に肝庇護療法についてもノウハウを地域で蓄積し、公開することでこれをサポートすることができるのではないかと考えている。

文献

- 1) Arase, Y. et al. : Interferon therapy for 2 years or longer reduces the incidence of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C viral infection. *Intervirology* 47 (6) : 355-361, 2004
- 2) Di Bisceglie, A.M. et al. : Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N Engl J Med* 359 (23) : 2429-2441, 2008
- 3) Takano, S. et al. : A multicenter randomized controlled dose study of ursodeoxycholic acid

for chronic hepatitis C. *Hepatology* 20 (3): 558-564, 1994

- 4) Omata, M. et al.: A large-scale, multicentre, double-blind trial of ursodeoxycholic acid in patients with chronic hepatitis C. *Gut* 56 (12): 1747-1753, 2007
- 5) Tarao, K. et al.: Ursodiol use is possibly associated with lower incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-associated liver cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (1): 164-169, 2005
- 6) Ikeda, K. et al.: A long-term glycyrrhizin injection therapy reduces hepatocellular carcinogenesis rate in patients with interferon-

resistant active chronic hepatitis C: a cohort study of 1249 patients. *Dig Dis Sci* 51 (3): 603-609, 2006

- 7) Hayashi, H. et al.: Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 89 (7): 986-988, 1994
- 8) Yano, M. et al.: A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* 39 (6): 570-574, 2004

救急・応急処置に必要なすべての手技と処置を
わかりやすく図解した実践ガイドの最新版!

M.P.
2008年
臨時増刊号
vol.25

新・図解救急・ 応急処置ガイド

救急・応急時に必ず役立つ基本手技と処置のすべて

Medical Practice 編集委員会・編

好評を博した『図解救急・応急処置ガイド 縮刷版』（2000年発行）に最新の情報を盛り込み刷新した大改訂版。第一線で活躍する実地医家が、救急患者の救急・応急処置を的確に施行するために必要なすべての情報を盛り込んだ実践ガイド。実際の手技・方法などを図解などでわかりやすく具体的に解説した。小児科や眼科・耳鼻科などのポイントもまとめ、集団災害の救急・応急対応の基本など役立つ周辺知識も満載。実地医家必携の1冊。



好評発売中

B5判・1,148頁・2色刷
定価 **9,450円** (本体9,000円+税5%)

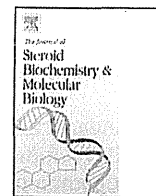
文光堂

<http://www.bunkodo.co.jp> 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 tel.03-3813-5478/fax.03-3813-7241



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC–ESI–MS/MS[☆]

Akira Honda^{a,b}, Teruo Miyazaki^{a,b}, Tadashi Ikegami^c, Junichi Iwamoto^c,
Kouwa Yamashita^d, Mitsuteru Numazawa^d, Yasushi Matsuzaki^{b,c,*}

^a Center for Collaborative Research, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center, Ami, Ibaraki 300-0395, Japan

^b Department of Development for Community Medicine, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center, Ami, Ibaraki 300-0395, Japan

^c Department of Gastroenterology, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center, Ami, Ibaraki 300-0395, Japan

^d Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Miyagi 981-8558, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2009

Received in revised form 27 January 2010

Accepted 2 March 2010

Keywords:

Review

Analysis

Cholesterol

Sterol

Oxysterol

GC–MS

HPLC–MS/MS

Derivatization

ABSTRACT

High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) is a powerful method for the microanalysis of compounds in biological samples. Compared with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), this method is more broadly applicable to various compounds and usually does not require a derivatization step before analysis. However, when neutral sterols are analyzed, the sensitivities of usual HPLC–MS/MS method are not superior to those of GC–MS because the sterols are relatively resistant to ionization. In this review, we introduce the recent development of HPLC–MS/MS analysis for the quantification of non-cholesterol sterols. By adding an effective derivatization step to the conventional procedure, sterol analysis by HPLC–MS/MS surpassed that obtained by GC–MS in sensitivity. In addition, sufficient specificity of this method was achieved by selected reaction monitoring (SRM) and thorough chromatographic separation of each sterol.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Some cholesterol precursors and oxidized cholesterol (oxysterols) are important molecules in the regulation of lipid homeostasis in the body [1]. In addition, they have been used as serum biomarkers for whole body cholesterol synthesis [2,3], intestinal cholesterol absorption [4], hepatic bile acid synthesis [5,6] and the diagnosis of inherited disorders in cholesterol metabolism [7–12]. Therefore, quantification of non-cholesterol sterols in biological samples is a very important technique in studies of lipid metabolism.

Gas chromatography (GC) with flame ionization detection [2,13], high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection [14–16] or HPLC with refractive index (RI) detection [16] are the most generally used methods for the

analyses of sterols. However, these methods cannot quantify minor components of endogenous sterols with sufficient sensitivity and specificity.

Mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) are powerful detection methods, which are suitable for GC and HPLC systems. These detectors are not only superior in terms of sensitivity but are also highly specific compared with flame ionization, UV and RI detectors. GC–MS has been widely accepted as a reliable analytical method for the determination of sterols in biological samples [17–19]. However, during the last decade, HPLC–MS or HPLC–MS/MS has also come to be used conveniently because these methods do not always require deconjugation and derivatization steps before analysis [20,21]. In addition, while HPLC methods do not cause decomposition of some labile sterols, such as 24S,25-epoxycholesterol, the high temperatures achieved during GC methods can cause degradation of unstable sterols [22,23].

In this review, we introduce the recent development of HPLC–MS/MS methods for the quantification of sterols in biological samples. An effective derivatization step, thorough chromatographic separation and selected reaction monitoring (SRM) by MS/MS have achieved excellent sensitivity and specificity for this method. The method has become a central approach for the simultaneous quantification of sterols in small amounts of biological samples.

[☆] Article from special issue on “Steroid profiling and analytics: going towards Sterome”.

* Corresponding author at: Department of Gastroenterology, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center, 3-20-1 Chuoh, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0395, Japan. Tel.: +81 29 887 1161; fax: +81 29 887 9113.

E-mail address: ymatsuzaki-gi@umin.ac.jp (Y. Matsuzaki).

2. Methods to increase the sensitivity of sterols

2.1. Ionization

Advances in ionization techniques have greatly contributed to the development of LC–MS. Electron impact ionization (EI) is the most commonly used approach for GC–MS analysis of sterols. This ionization method was applied to HPLC–MS by using a particle beam (PB) interface. In 1995 Sattler et al. [24] analyzed plasma 7-dehydrocholesterol and in 1998 Careri et al. [25] quantified oxysterols by HPLC–PB–EI–MS, with detection limits of 10 ng (about 26 pmol) and 2–3 ng (about 5–7.5 pmol), respectively.

While EI is not applicable to polar or high molecular weight compounds, electrospray ionization (ESI) is broadly applicable method for polar compounds in a wide range of molecular weights (Fig. 1). In addition, this ionization source is generally exchangeable in the same mass spectrometer with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or atmospheric pressure photoionization (APPI) sources that are applicable to less polar and low molecular weight compounds. Thus, ESI and the complementary use of APCI or APPI have recently become the standard ionization methods for HPLC–MS.

Since sterols are less polar and relatively low molecular weight compounds, APCI [26–33] or APPI [20,34] have been preferentially used for analysis by HPLC–MS. The detection limits of cholesterol precursors and sitosterol by HPLC–APCI–MS were well below 1 pmol [31], that of cholesterol by HPLC–APCI–MS/MS was 2.2 pmol [32], and those of oxysterols by HPLC–APCI–MS were in the range of 0.2–0.8 ng (about 0.5–2.0 pmol) [26] or 0.1–0.75 ng (about 0.25–1.9 pmol) [27].

While it had previously been considered that ESI was not suitable for the analysis of neutral sterols, in 2007 McDonald et al. reported that sterols were sufficiently ionized when HPLC–ESI–MS/MS was employed using the Applied Biosystems 4000 QTrap triple quadrupole system [21]. According to this report, detection limits of dihydroxy- or epoxysterols were 5–60 fmol while those of monohydroxysterols were 175–2000 fmol on-

column. These sensitivities are not inferior to those of APCI, but one weak point is that the sensitivity depends greatly on the instruments.

2.2. Derivatization

As shown in Table 1, conventional HPLC–APCI–MS for the detection of one of the representative oxysterols, 7 α -hydroxycholesterol (1.2 pmol) [27], is not as sensitive as GC–MS (4–120 fmol) [35,36] because sterols are relatively resistant to ionization. On the other hand, this oxysterol may be quantified by HPLC–ESI–MS/MS [21] with sensitivity (60 fmol) equivalent to GC–MS, but not all HPLC–ESI–MS/MS instruments are applicable to this sensitive analysis of sterols.

To overcome these problems, sterols have been derivatized to more polar structures. The charged moieties were introduced into the hydroxyl group of the sterols as an *N*-methylpyridyl ether [37], a ferrocenecarbamate ester [38], a sulfate [39], a mono-(dimethylaminoethyl) succinyl ester [40], a dimethylglycine ester [41], and a picolinyl ester [42–44]. Furthermore, the native carbonyl group of oxysterols or the 3-oxo structure, converted from 3 β -hydroxysterols by cholesterol oxidase, was derivatized to Girard P hydrazone [45–47]. Each of these derivatizations enhanced the ionization efficiency of the sterols in the ESI process and markedly increased the sensitivity.

As for ionization polarity, the sulfate derivatives are easily deprotonated and exhibit a high ionization efficiency in the negative ESI mode [39]. In contrast, the other derivatives are positively charged permanently or easily protonated, so that they are suitable for the positive ESI mode. Generally speaking, the negative mode exhibits lower background noise compared with that in positive mode. However, the positive mode provides much abundant ions than negative one [48].

It may be noted here that derivatizations are useful to increase the ionization of steroids, not only in ESI, but also in the APCI processes [49,50]. However, derivatized sterols have been preferably analyzed by ESI because ESI is broadly applicable to various deriva-

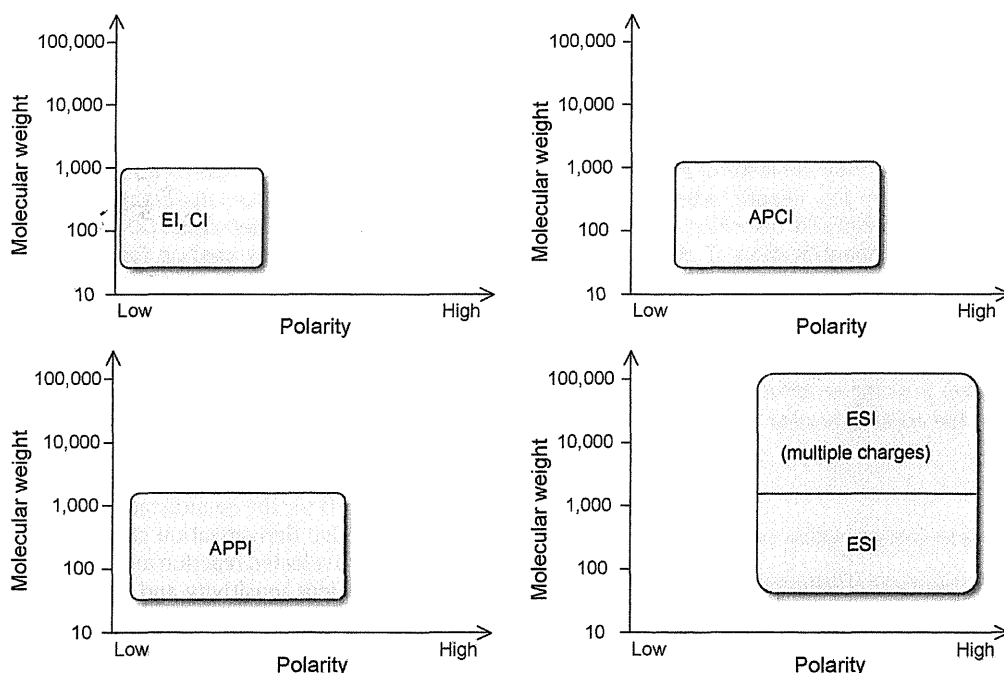


Fig. 1. Applications of various ionization methods to LC–MS. EI, electron impact ionization; CI, chemical ionization; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI, atmospheric pressure photoionization; ESI, electrospray ionization.

Table 1
Detection limits of cholesterol and representative oxysterols by different analytical methods.

Author	Year	Reference	Method (ionization mode)	Derivatization	Lower limit of detection	
					Cholesterol	Oxysterol ^a
Sanghvi et al.	1981	[36]	GC-MS (P-EI)	TMS ether	NA	120 fmol (7 α OH)
Hylemon et al.	1989	[14]	HPLC-UV	C4	NA	20 pmol (7 α OH)
Honda et al.	1991	[35]	GC-HR-MS (P-EI)	DMES ether	NA	4 fmol (7 α OH)
Careri et al.	1998	[25]	HPLC-PB-MS (P-EI)	– ^b	5 pmol	5 pmol (7 β OH)
Manini et al.	1998	[26]	HPLC-MS (P-APCI)	–	NA	500 fmol (7 β OH)
Van Berkel et al.	1998	[38]	HPLC-MS/MS (P-ESI)	FC ester	41 amol	NA
Razzazi-Fazeli et al.	2000	[27]	HPLC-MS (P-APCI)	–	NA	1.2 pmol (7 α OH)
Nagy et al.	2006	[31]	HPLC-MS (P-APCI)	–	<1 pmol	NA
Tian et al.	2006	[32]	HPLC-MS/MS (P-APCI)	–	2.2 pmol	NA
Griffiths et al.	2006	[46]	HPLC-MS/MS (P-ESI)	Girard P hydrazone	NA	<2.5 fmol
McDonald et al.	2007	[21]	HPLC-MS/MS (P-ESI)	–	1 pmol	60 fmol (7 α OH)
Honda et al.	2008	[43]	HPLC-MS/MS (P-ESI)	picolinyl ester	260 amol	NA
Honda et al.	2009	[44]	HPLC-MS/MS (P-ESI)	picolinyl ester	NA	10 amol (7 α OH)

Abbreviations: P-EI, positive electron impact ionization; TMS, trimethylsilyl; NA, not available; 7 α OH, 7 α -hydroxycholesterol; HPLC-UV, HPLC equipped with an ultraviolet detector; C4, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one; GC-HR-MS, high-resolution GC-MS; DMES, dimethylethylsilyl; HPLC-PB-MS, HPLC-MS with particle beam interface; 7 β OH, 7 β -hydroxycholesterol; P-APCI, positive atmospheric pressure chemical ionization; P-ESI, positive electrospray ionization; FC, ferrocenecarboxylate.

^a Data of 7 α -hydroxycholesterol or other oxysterols with the structures similar to 7 α -hydroxycholesterol.

^b Without derivatization.

tives. In the positive APCI mode, the introduction of moieties with proton affinity increases ionization, while those with highly polar functional groups inhibit ionization and decrease the sensitivity [50]. Thus, the selection of effective derivatives for positive APCI is not as easy as that for ESI. Negative APCI is also used after the addition of electron affinity moieties to sterols. This electron-capturing derivatization in negative APCI mode was first reported by Singh et al. [51] and has been applied to the determination of tissue cholesterol by Kuo et al. [52].

3. Methods to increase the selectivity of each sterol

3.1. Use of appropriate internal standards

Deuterium-labeled sterols are ideal internal standards for quantification by HPLC-MS. The addition of internal standards compensates for the loss of target sterols during clean-up procedures and for the variation in injection volume onto the HPLC column. Thus, internal standards are necessary for accurate quantification by chromatographic methods. In addition, internal standards are used to determine the variation in the retention time of each sterol among samples. When peaks of target sterols are very small or they are not completely separated from interfering peaks, the retention time of the internal standard gives additional information to identify the target peaks. Several deuterated standards are commercially available, as reported by McDonald et al. [21]. Although deuterated analogs are not available for all sterols, deuterated sterol with a structure similar to the target sterol can be used as a surrogate [21,44]. Alternatively, we can use coprostanol as a convenient internal standard for monohydroxysterols in human serum [43]. Coprostanol is synthesized from cholesterol by intestinal bacteria but is not absorbed from the intestine and is not detected in human serum.

3.2. Sample clean-up

The structures of non-cholesterol sterols are similar to native cholesterol, which usually exists at least 100–10,000 times greater than the target sterols in bulk-lipid extracts from biological samples. Therefore, good separation from cholesterol is necessary for reliable quantification of the non-cholesterol sterols. Because oxysterols and epoxysterols are more polar than cholesterol, most of them can be separated from cholesterol by a solid-phase extraction cartridge [18,53]. However, the complete separation of some less

polar oxysterols and non-cholesterol monohydroxysterols from cholesterol by using such a cartridge is difficult. Thus, for the analysis of whole sterol profiles in biological samples, the role of solid-phase extraction is limited to the elimination of nonpolar compounds, such as fatty acyl esters of cholesterol [53], that are strongly retained on reversed-phase HPLC columns.

3.3. Separation by HPLC

Since we have not achieved selective elimination of cholesterol from bulk-lipid extracts using solid-phase extraction cartridges, non-cholesterol sterols must be separated from cholesterol by the final HPLC-MS or HPLC-MS/MS analyses. In addition, the separation between non-cholesterol sterols is also important to quantify each sterol. However, isobaric sterol isomers, e.g. cholesterol and lathosterol [43] or 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol [21,44], often exhibit similar precursor to product ion fragmentations, so that even SRM cannot always differentiate these sterols. Therefore, careful HPLC separation of each sterol is crucially important to quantify these isomers by selected ion monitoring (SIM) or SRM [33,43].

Although normal phase columns can be used for the separation of sterols by HPLC-PB-MS [24,25] and HPLC-APCI-MS [16], reversed-phase columns are preferably used in HPLC-PB-MS [25], most of the HPLC-APCI-MS [26–31,33], HPLC-APPI-MS [20,34], and virtually all HPLC-ESI-MS methods with [42–44,47] and without derivatization [21]. Normal phase HPLC sometimes achieves better separation of each sterol compared with reversed-phase HPLC [16], but the latter is preferred for HPLC-MS because it displays higher reproducibility than normal phase and the polar mobile phase favors ionization.

Our experiences show that there are many minor unidentified sterols in biological samples and complete chromatographic or mass spectrometric separation of all sterols by a single analysis is impossible at present. We need to select the best column and mobile phase according to the target sterols in which we are interested.

3.4. Selection by MS/MS

Although MS/MS is not an almighty method for the differentiation of each sterol, it is much more specific and sensitive than UV and RI detectors [16]. The triple quadrupole mass spectrometer is the most suitable instrument for the highly sensitive

quantification of sterols. SRM obtained by MS/MS can eliminate interfering peaks with different precursor to product ion fragmentations at specific collision energies. In addition, the monitoring of multiple SRM pairs for a single sterol adds confidence to the identification of the compound and provides further information regarding compound identification based on their relative intensities [21].

Another way to improve the selectivity of SRM is to increase the resolution of the triple quadrupole mass spectrometer. Although the resolution depends on the capacity of the mass spectrometer, analysis with higher resolution reduces interfering peaks and improves S/N ratio of the chromatogram. Furthermore, Griffiths et al. have reported high-resolution MS by a hybrid quadrupole/time of flight (TOF) mass spectrometer [46] or high-resolution MSⁿ by a hybrid linear ion-trap/Fourier transform mass spectrometer [54]. These mass spectrometers exhibit excellent selectivity, but sensitivity and dynamic range for quantification do not reach those achieved by the triple quadrupole mass spectrometer.

4. Characteristics of picolinyl ester derivative of sterols

4.1. Sensitivity

We have successfully introduced a picolinyl moiety into the hydroxyl group of various sterols and have demonstrated that the picolinyl ester derivatization is a simple and versatile method for sensitive and specific quantification using positive HPLC–ESI–MS/MS [42–44]. The idea originated from a report by Yamashita et al. [55] in which they compared HPLC–ESI–MS/MS behaviors among the picolinyl, 6-methylpicolinyl, nicotinyl, 2-methoxynicotinyl and isonicotinyl derivatives of estrone, estradiol, dehydroepiandrosterone and testosterone. The picolinyl derivatives showed the best HPLC–ESI–MS/MS behavior and 100-fold higher detection response by SRM compared with underivatized steroid molecules [55,56]. In addition, they have successfully applied the picolinyl derivatization to corticosteroids [57,58] and aldosterone [59,60].

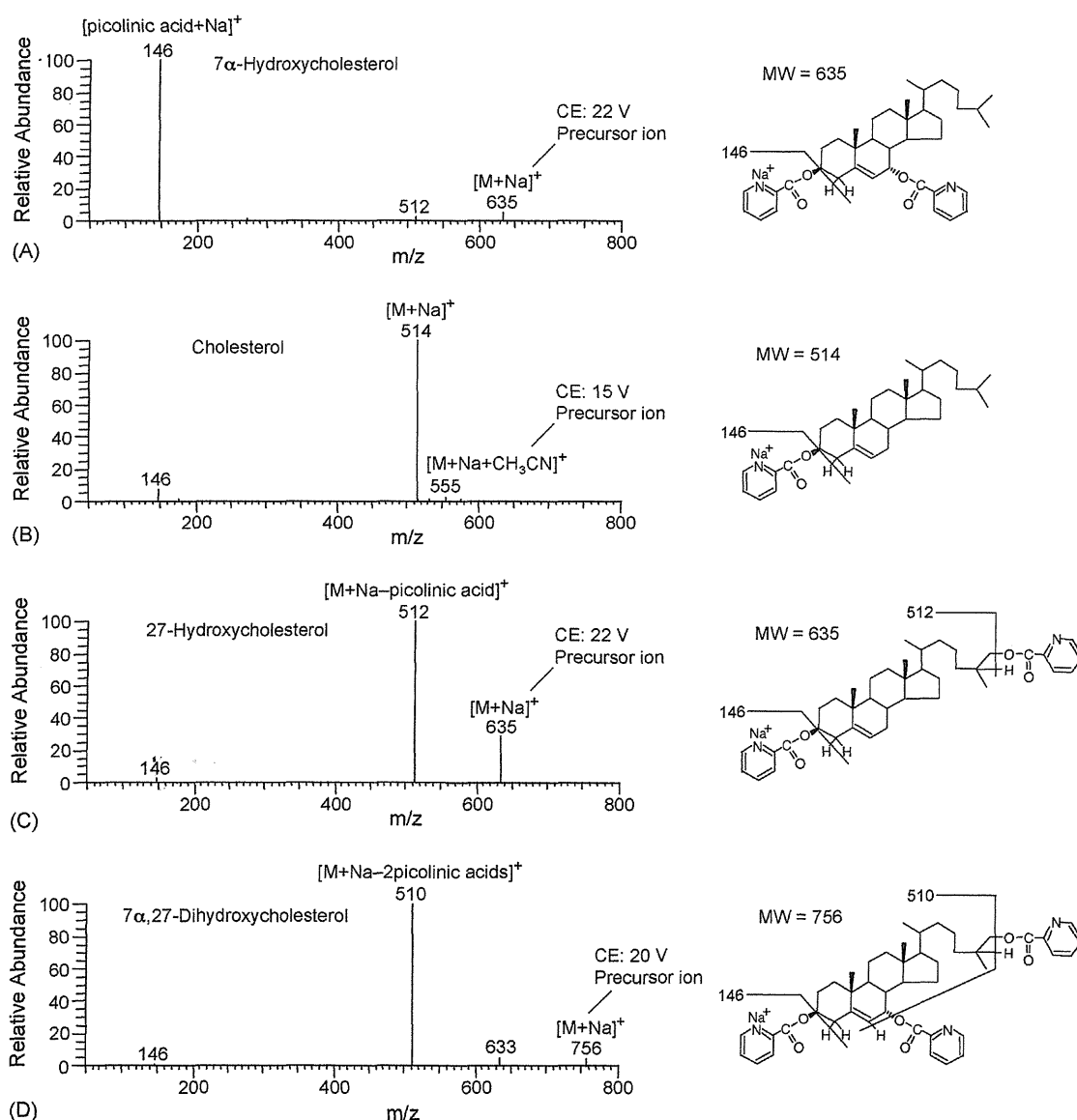


Fig. 2. Representative positive ESI–MS/MS fragmentation patterns of the picolinyl ester derivatives of sterols. (A) 7 α -hydroxycholesterol, (B) cholesterol, (C) 27-hydroxycholesterol, (D) 7 α ,27-dihydroxycholesterol. [M+Na]⁺ was used as precursor ions for A, C and D, while [M+Na+CH₃CN]⁺ was used as a precursor ion for B. Fragmentation patterns of A, B, C and D correspond to those in Table 2. The general LC–MS/MS conditions were as follows: introducing solvent, acetonitrile–methanol–water (45:45:10, v/v/v) containing 0.1% acetic acid; flow rate, 300 μ l/min; spray voltage, 1000 V. CE, collision energy. In the case of oxysterols with multiple hydroxyl groups (A, C and D), the position of sodium in the picolinyl derivatives has not been determined. In structural formulae, sodium ion was tentatively added to picolinyl group at the C-3 β position.

As for sterols, the detection limits ($S/N=3$) of cholesterol picolinate and oxysterol dipicolinates by HPLC–ESI–MS/MS (SRM) analysis were about 260 amol and 5–25 amol on-column, respectively [43,44], which was about 3860-fold and 1000-fold, respectively, more sensitive than those with underivatized HPLC–ESI–MS/MS analysis [21]. On the other hand, the detection limits of native cholesterol and oxysterols by HPLC–APCI–MS/MS analysis were about 100 fmol and 10 fmol, respectively [43,44].

4.2. Mass spectra

All picolinyl ester derivatives of 3β -monohydroxysterols exhibited adduct ions of $[M + Na + CH_3CN]^+$ as the base peaks [43], while those of di-, tri- and tetra-hydroxysterols and 3-ketosterols showed $[M + Na]^+$ ions as the base peaks under our HPLC–ESI–MS conditions [44]. However, it should be noted here that the base peaks would change depending on the composition of mobile phase. In contrast to other derived moieties, the picolinyl group is not permanently charged, so that even in the case of oxysterols with multiple hydroxyl groups, a single charged ion was predominant in the positive ESI mass spectra.

Collision of $[M + Na + CH_3CN]^+$ of the picolinyl derivatives of 3β -monohydroxysterols at a relatively low collision energy (10–15 V) resulted in the predominant formation of $[M + Na]^+$ as product ions, while the use of higher collision energies (25–30 V) resulted in the [picolinic acid + Na]⁺ ($m/z=146$) ion as the most abundant product ion. In contrast, collision of $[M + Na]^+$ of the picolinyl derivatives of di-, tri- and tetra-hydroxysterols and 3-ketosterols resulted in the formation of $[M + Na - \text{picolinic acid}]^+$ or [picolinic acid + Na]⁺ ions at any specific collision energy depending on the sterols (10–30 V). Representative MS/MS fragmentation patterns of the picolinyl derivatives are shown in Fig. 2, and the most suitable collision energies and precursor to product ions of each sterol for SRM are listed in Table 2.

4.3. Synthesis of derivatives

The derivatization and purification steps are very simple [44]. As shown in Fig. 3, the reagent mixture, consisting of 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride, 4-dimethylaminopyridine, picolinic acid, pyridine and triethylamine, is added to the sterol extract, and incubated at 80 °C for 60 min. Excess reagents are then precipitated by the addition of *n*-hexane, and the clear supernatant containing picolinyl ester derivatives is collected and evaporated at 80 °C under nitrogen. The residue is redissolved in 50 μ L of acetonitrile and an aliquot is used for HPLC–ESI–MS/MS analysis. The

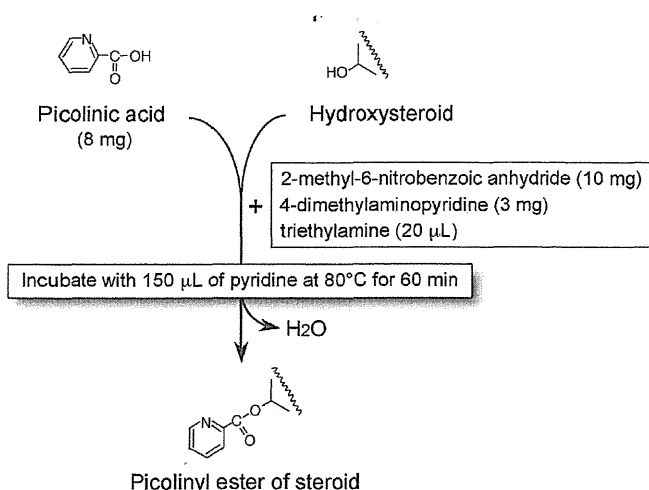


Fig. 3. The formation of picolinyl ester derivative and the conditions of the reaction.

derivatives are stable for at least 6 months in the acetonitrile solution.

In general, this esterification progresses easily at room temperature, but the hydroxyl groups at the C-5 α , C-20 α and C-25 positions of oxysterols are resistant to picolinyl ester formation at room temperature. In these resistant positions, C-25 is completely esterified by heating at 80 °C for 60 min, but the C-5 α and C-20 α positions are not esterified at all even if the reaction mixture is heated at 80 °C.

It has been pointed out that cholesterol can be autoxidized during sample preparation [61]. However, to analyze whole sterol profiles in biological samples, it is difficult to remove cholesterol selectively before derivatization. Therefore, we determined the formation of oxysterols from pure cholesterol in the derivatizing conditions, and no significant amounts of oxysterols were detected. The results suggest that the autoxidation of cholesterol during the derivatization step is negligible.

Transesterification of fatty acyl esters during the formation of picolinyl esters is another possibility for the overestimation of sterols. However, the incubation of pure cholesteryl stearate in the reaction mixture showed that the transesterification was not probable.

4.4. Chromatographic separation

HPLC is performed using a reversed-phase Hypersil GOLD column (150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). In our previous reports, monohydroxysterols [43] and oxysterols [44] were measured separately, but both sterols can be analyzed simultaneously because the HPLC column and gradient conditions are the same. Initially, the mobile phase is comprised of acetonitrile–methanol–water (40:40:20, v/v/v) containing 0.1% acetic acid, and it is then programmed in a linear manner to acetonitrile–methanol–water (45:45:10, v/v/v) containing 0.1% acetic acid over 20 min. The final mobile phase is maintained constant for an additional 20 min. The flow rate is 300 μ L/min, and the column is maintained at 40 °C using a column oven.

Relative retention times (RRTs), expressed relative to the retention time of cholesterol, are listed in Table 2. The RRTs show that the separation of sterols by the Hypersil GOLD column is excellent, but several weak points are also indicated. First, 7β -hydroxycholesterol gives a peak just before 7α -hydroxycholesterol, and reliable quantification of each hydroxycholesterol can occasionally be difficult. Second, the retention times of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one and 24S,25-epoxycholesterol are very close to each other, and these sterols show similar MS and MS/MS spectra. However, because 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one does not survive alkaline hydrolysis, the peak detected after alkaline hydrolysis is 24S,25-epoxycholesterol alone. Third, lanosterol gives a peak just after cholesterol. Although the monitoring ion for lanosterol is different from that for cholesterol, a huge cholesterol peak in biological samples can sometimes interfere with the lanosterol peak.

These problems are resolved by using another reversed-phase column, Hypersil GOLD aQ (150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m, Thermo Fisher Scientific). This column is usually used for separations employing highly aqueous mobile phases, but we use it as follows: initially, the mobile phase is comprised of acetonitrile–methanol–water (40:40:20, v/v/v) containing 0.1% acetic acid; it is then programmed in a linear manner to acetonitrile–methanol (50:50, v/v) containing 0.1% acetic acid over 40 min. The final mobile phase is maintained constant for an additional 2 min. The flow rate is 300 μ L/min, and the column is maintained at 40 °C using a column oven.

The RRTs by the Hypersil GOLD aQ column are also shown in Table 2. Compared with the Hypersil GOLD column, the width of each peak tends to be wide, and the order of elution from the column is very different. Good chromato-

Table 2
Positive ESI-SRM and HPLC data of the picolinyl ester derivative of each sterol^a.

Picolinyl ester derivatives	SRM condition			HPLC data (RRT ^c)	
	Precursor to product (m/z)	Collision energy (V)	Pattern ^b	C18 ^d	C18 aQ ^e
24S-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.34	0.30
25-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.36	0.37
27-Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.40	0.42
7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.42	0.33
7 β -Hydroxy-4-cholesten-3-one	528 → 146	24	A	0.44	0.36
5 α -Cholesta-8(9),14,24-trien-3 β -ol	551 → 510	12	B	0.71	0.71
Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol	551 → 510	12	B	0.73	0.79
Cholesta-5,8,24-trien-3 β -ol	551 → 510	12	B	0.75	0.78
5 α -Cholesta-7,24-dien-3 β -ol	553 → 512	12	B	0.81	0.87
Zymosterol	553 → 512	12	B	0.82	0.86
Desmosterol	553 → 512	12	B	0.83	0.88
5 α -Cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	553 → 512	12	B	0.84	0.87
5 α -Cholesta-6,8(9)-dien-3 β -ol	553 → 512	12	B	0.85	0.83
7-Dehydrocholesterol	553 → 512	12	B	0.87	0.92
8-Dehydrocholesterol	553 → 512	12	B	0.89	0.91
Lathosterol	555 → 514	15	B	0.97	0.98
8-Lathosterol	555 → 514	15	B	0.98	0.98
Cholesterol	555 → 514	15	B	1.00	1.00
Coprostanol	557 → 516	14	B	1.05	0.91
Cholestanol	557 → 516	14	B	1.10	1.04
4-Methyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol	567 → 526	12	B	0.89	0.89
4-Methyl-5 α -cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	567 → 526	12	B	0.90	0.92
24S,25-Epoxycholesterol	569 → 528	12	B	0.42	0.53
7-Ketocholesterol	569 → 528	12	B	0.53	0.48
4-Methyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol	569 → 528	12	B	1.07	1.01
Campesterol	569 → 528	12	B	1.10	1.03
20 α -Hydroxycholesterol ^f	571 → 530	14	B	0.40	0.43
5 β ,6 β -Epoxycholestanol	571 → 530	14	B	0.68	0.64
5 α ,6 α -Epoxycholestanol	571 → 530	14	B	0.70	0.68
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),14,24-trien-3 β -ol	579 → 538	14	B	0.84	0.78
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol	581 → 540	14	B	0.97	0.93
4,4'-Dimethyl-5 α -cholesta-8(9),14-dien-3 β -ol	581 → 540	14	B	1.01	0.99
4,4'-Dimethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol	583 → 542	14	B	1.19	1.04
Sitosterol	583 → 542	14	B	1.22	1.07
Sitostanol	585 → 544	14	B	1.36	1.11
Lanosterol	595 → 554	12	B	1.01	0.90
Dihydrolanosterol	597 → 556	15	B	1.24	1.01
27-Hydroxy-7-dehydrocholesterol	633 → 510	22	C	0.49	0.62
7 β -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	A	0.61	0.53
7 α -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	A	0.62	0.51
6-Hydroxycholesterol	635 → 146	22	A	0.69	0.63
4 β -Hydroxycholesterol	635 → 146	22	A	0.78	0.76
22R-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.47	0.55
22S-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.50	0.48
24R-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.50	0.56
24S-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.50	0.57
25-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.53	0.66
27-Hydroxycholesterol	635 → 512	22	C	0.58	0.71
5 β -Cholestane-3 α ,7 α -diol	637 → 514	22	C	0.64	0.49
7 α ,27-Dihydroxy-4-cholesten-3-one	649 → 146	28	A	0.18	0.17
7 α ,12 α -Dihydroxy-4-cholesten-3-one	649 → 146	28	A	0.19	0.14
Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ^f	653 → 146	28	A	0.60	0.50
7 α ,27-Dihydroxycholesterol	756 → 510	20	D	0.33	0.31
5 β -Cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol	758 → 635	28	C	0.32	0.24
5 β -Cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrol	879 → 756	20	C	0.15	0.12

Abbreviations: ESI, electrospray ionization; SRM, selected reaction monitoring; RRT, relative retention time.

^a Some data in this table have been reported in our previous paper [43,44].

^b Patterns of precursor to product ions. A: $[M+Na]^+ \rightarrow [picolinic\ acid+Na]^+$; B: $[M+Na+CH_3CN]^+ \rightarrow [M+Na]^+$; C: $[M+Na]^+ \rightarrow [M+Na-picolinic\ acid]^+$; D: $[M+Na]^+ \rightarrow [M+Na-2\ picolinic\ acids]^+$. A, B, C and D correspond to those in Fig. 2.

^c RRTs are expressed relative to the retention time of cholesterol 3 β -picolinate.

^d A reversed-phase C18 column, Hypersil GOLD (150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m, Thermo Fisher Scientific) was employed. Initially, the mobile phase was comprised of acetonitrile–methanol–water (40:40:20, v/v/v) containing 0.1% acetic acid, then it was programmed in a linear manner to acetonitrile–methanol–water (45:45:10, v/v/v) containing 0.1% acetic acid over 20 min. The final mobile phase was kept constant for an additional 20 min. The flow rate was 300 μ l/min, and the column was maintained at 40 °C using a column oven. The retention time of cholesterol 3 β -picolinate by this condition was around 28.5 min.

^e Polar endcapped C18 column, Hypersil GOLD aQ (150 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m, Thermo Fisher Scientific) was used. Initially, the mobile phase was comprised of acetonitrile–methanol–water (40:40:20, v/v/v) containing 0.1% acetic acid; then it is programmed in a linear manner to acetonitrile–methanol (50:50, v/v) containing 0.1% acetic acid over 40 min. The final mobile phase was kept constant for an additional 2 min. The flow rate was 300 μ l/min, and the column was maintained at 40 °C. The retention time of cholesterol 3 β -picolinate by this condition was around 36.5 min.

^f Hydroxyl groups at the C-5 α and C-20 α positions of oxysterols are not derivatized.

graphic separations are achieved between 7 α -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxycholesterol, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one and 24S,25-epoxycholesterol, and cholesterol and lanosterol. However, the lathosterol and 8-lathosterol peaks are not differentiated.

The separations of picolinylated sterols by these reversed-phase columns are not at all inferior to the separation of free sterols by reversed-phase HPLC [15,21]. For example, the separation of 24-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol was difficult, but DeBarber et al. achieved the chromatographic separation and quantification by using a mobile phase consisted of acetonitrile–methanol–water and APCI-MS/MS detector [33]. In contrast, McDonald et al. failed to quantify these sterol isomers separately by using an eluent of methanol–water and ESI-MS/MS detector [21]. They did not use acetonitrile because the presence of acetonitrile significantly reduced signal intensity of sterols analyzed by this detector. As for picolinylated 24- and 25-hydroxycholesterols, they were well separated each other by using acetonitrile–methanol–water as a mobile phase, and excellent sensitivities were achieved by ESI-MS/MS detector.

4.5. Sample preparation

Long term storage or repeated freeze and thaw of biological samples should be avoided because it stimulates cholesterol autoxidation [61]. Addition of the antioxidant, butylated hydroxytoluene, to the sample before sample preparation produced only a modest decrease in oxidation. Therefore, minimizing oxidation by using good lab practices is important [21].

To analyze the unesterified fraction of sterols, serum (1–5 μ l), subcellular fraction of tissue (0.1–1.0 mg protein), or cell homogenate (1×10^4 – 1×10^5 cells) is dried with the added internal standards, and directly derivatized to the picolinyl esters [43]. To analyze the total (unesterified + esterified) fraction, saponification is carried out in 1 N ethanolic KOH at 37 °C for 1 h, and sterols are extracted with *n*-hexane before derivatization [44]. It may be mentioned here that some sterols occur as conjugates with sulfuric or glucuronic acid [62–64]. Negative ESI mode without derivatization is suitable for the analyses of these conjugated sterols, and the conjugated sterols are much more polar than picolinyl esters of unconjugated sterols.

Because this assay method is very sensitive, we can minimize the loading of derivatized sample on the HPLC column. Although the solid-phase extraction/purification step is omitted, target sterols are successfully separated by the HPLC-MS/MS step. In case of human serum analysis, less than 1 ng of picolinyl esters of non-cholesterol sterols are injected onto the column with approximately 200 ng of cholesterol picolinate. Under our HPLC conditions, this amount of cholesterol picolinate is easily trapped in the Hypersil GOLD and Hypersil GOLD aQ columns and eluted at around 28.5 min and 36.5 min, respectively, which is well separated from the picolinyl esters of most non-cholesterol sterols.

While picolinyl esters of sterols are very soluble in acetonitrile, nonpolar compounds, such as fatty acyl esters of cholesterol, remain underivatized and do not dissolve in the final acetonitrile solution. Nonpolar compounds are strongly retained on reversed-phase HPLC columns, but in this method, loading of the nonpolar compounds on the column is minimized.

4.6. Precision and accuracy

The linearity of the standard curves, as determined by simple linear regression, was excellent, as reported in our previous papers [43,44]. Reproducibilities and recoveries of some sterols were validated according to a one-way layout and polynomial equation, respectively [43,44]. The variances between sample preparations and between measurements by this method were calculated to

be 1.6–12.7% and 2.5–16.5%, respectively. In these results, higher values of the variances (over 10%) were obtained by the quantification of sterols that showed extremely low concentrations in the samples. To test matrix effects, the recovery experiments were performed using human serum or rat liver microsomes spiked with 0.05–12 ng of sterols. Recoveries of the sterols ranged from 86.7% to 107.3% with a mean recovery of 99.3%, which suggests that matrix effects are not significant in this assay. This method provides reproducible and reliable results for the quantification of sterols in small amounts of biological samples.

5. Perspectives

HPLC-MS or HPLC-MS/MS does not require a derivatization step before the analysis of sterols, which is advantageous for a high-throughput assay. However, the addition of the derivatization step has markedly improved the sensitivities of the neutral sterols. Thus, simple and rapid procedures do not always produce good results for the microanalysis of biological samples. In addition, since many sterols have the same molecular weight and similar structures, a thorough chromatographic separation is essential to maintain the selectivity even if the latest model of mass spectrometer is operated in a high-resolution mode.

The recent development of steroid biochemistry has demonstrated that there are considerable bioactive or biomarker sterols among intermediates and their derivatives in the biosynthetic pathways of cholesterol, bile acids and steroid hormones. Moreover, there are still many unidentified sterols in biological samples. Therefore, not only sensitive and specific quantification of targeted sterols but also metabolomic analysis of whole sterol profiles will become an important methodology for steroid biochemistry and its clinical applications.

References

- [1] S. Gill, R. Chow, A.J. Brown, Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised, *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 391–404.
- [2] I. Björkhem, T. Miettinen, E. Reihner, S. Ewerth, B. Angelin, K. Einarsson, Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver, *J. Lipid Res.* 28 (1987) 1137–1143.
- [3] H.J. Kempen, J.F. Glatz, J.A. Gevers Leuven, H.A. van der Voort, M.B. Katan, Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans, *J. Lipid Res.* 29 (1988) 1149–1155.
- [4] T.A. Miettinen, R.S. Tilvis, Y.A. Kesäniemi, Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population, *Am. J. Epidemiol.* 131 (1990) 20–31.
- [5] I. Björkhem, E. Reihner, B. Angelin, S. Ewerth, J.-E. Åkerlund, K. Einarsson, On the possible use of the serum level of 7 α -hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7 α -hydroxylase in humans, *J. Lipid Res.* 28 (1987) 889–894.
- [6] T. Yoshida, A. Honda, N. Tanaka, Y. Matsuzaki, B. He, T. Osuga, N. Kobayashi, K. Ozawa, H. Miyazaki, Simultaneous determination of mevalonate and 7 α -hydroxycholesterol in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry as indices of cholesterol and bile acid biosynthesis, *J. Chromatogr.* 613 (1993) 185–193.
- [7] G.S. Tint, M. Irons, E.R. Elias, A.K. Batta, R. Frieden, T.S. Chen, G. Salen, Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith–Lemli–Opitz syndrome, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 107–113.
- [8] D.R. FitzPatrick, J.W. Keeling, M.J. Evans, A.E. Kan, J.E. Bell, M.E. Porteous, K. Mills, R.M. Winter, P.T. Clayton, Clinical phenotype of desmosterolosis, *Am. J. Med. Genet.* 75 (1998) 145–152.
- [9] R.I. Kelley, W.G. Wilcox, M. Smith, L.E. Kratz, A. Moser, D.S. Rimoin, Abnormal sterol metabolism in patients with Conradi–Hünemann–Happle syndrome and sporadic lethal chondrodysplasia punctata, *Am. J. Med. Genet.* 83 (1999) 213–219.
- [10] P.A. Krakowiak, C.A. Wassif, L. Kratz, D. Cozma, M. Kovarova, G. Harris, A. Grinberg, Y. Yang, A.G. Hunter, M. Tsokos, R.I. Kelley, F.D. Porter, Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1631–1641.
- [11] G. Salen, S. Shefer, L. Nguyen, G.C. Ness, G.S. Tint, V. Shore, Sitosterolemia, *J. Lipid Res.* 33 (1992) 945–955.
- [12] G. Halperin, M. Elisaf, E. Leitersdorf, D. Harats, A new method for determination of serum cholestanol by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 742 (2000) 345–352.