



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analytical approach for the measurement of oxidized lipids and medium-chain fatty acids : Emerging lipids in human health and nutrition [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Shrestha, Rojeet
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	乙第6962号
Issue Date	2015-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59673
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Rojeet_Shrestha_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：Rojeet Shrestha

審査委員	主査	齋藤 健
	副査	山内 太郎
	副査	恵 淑萍
	副査	千葉 仁志

学位論文題名

Analytical approach for the measurement of oxidized lipids and medium-chain fatty acids:

Emerging lipids in human health and nutrition

（酸化脂質と中鎖脂肪酸の測定のための分析的アプローチ：ヒトの健康と栄養に関する新規脂質）

当審査は平成 27 年 4 月 28 日実施の公開発表にて行われた。（出席者 27 名）

動脈硬化の原因として酸化リポタンパク質が注目されている。従来の酸化リポタンパク質研究は、銅イオン等により人工的に酸化したリポタンパク質を用いて、マクロファージや血小板への影響を観察し、そこから酸化リポタンパク質の病因的意義を論じており、生体から得た試料を化学的に分析した結果に基づいた議論となっていない。そのために、食品や薬品による抗酸化療法を客観的に評価しにくい状況が存在する。一方、従来のコレステロール蓄積型動脈硬化症に加えて、肥満に伴う異所性脂肪蓄積症を背景とする動脈硬化や臓器障害が問題となっている。その予防や治療において期待されているのが中鎖脂肪酸であるが、この物質は揮発性が高いために従来のメチルエステル誘導化／ガスクロマトグラフィー法では正確に測定できず、また、血中濃度が長鎖脂肪酸と比べて非常に低いこともあり、生体試料中の定量的な知見がほとんど得られていない。そのことが中鎖脂肪酸療法の発展の障害となっている。これらの課題の解決が本論文の目的である。

本論文では、ヒト血漿及びリポタンパク質を試料として、脂質ヒドロペルオキシド（コレステリルエステルヒドロペルオキシド、以下 CE00H 及びトリグリセリドヒドロペルオキシド、以下 TG00H）の質量分析法による分子種別の定性・定量法が開発された。さらに、中性脂肪蓄積心筋骨格筋血管症（TGCV）の治療に用いられている中鎖脂肪酸の新たな標識高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定法が開発された。

CE00H の分析にあたっては、ボランティアからの空腹時血漿から超低比重リポタンパク質（VLDL）及び中間比重リポタンパク質（IDL）を超遠心法により分離し、これらのリポタンパク質画分及び血漿から抽出した総脂質を HPLC／フーリエ変換質量分析計（LC/LTQ Orbitrap）により分析した。

分子種の同定は自家合成した標準物質を用いた。分析の結果、6つの CE00H 分子種 (Ch18:1-00H、Ch18:2-00H、Ch18:3-00H、Ch20:4-00H、Ch20:5-00H 及び Ch22:6-00H) が VLDL あるいは IDL に同定された。Ch18:3-00H を除く全 CE00H は新鮮血漿でも検出できた。同様に、TG00H をボランテアから得たリポタンパク質画分 (n=6) で LC/LTQ Orbitrap で観察し、TG00H 分子 11 種 (TG00H-18:1/18:2/16:0、TG00H-18:1/18:1/16:0、TG00H-16:0/18:2/16:0、TG00H-18:1/18:1/18:1、TG00H-16:0/18:2/16:0 などが主成分) を同定した。更に、LC-MS/MS による定量分析を構築し、TG00H の血漿濃度を求めたところ 56.1 ± 25.6 (mean $\pm$ SD) $\mu\text{mol/mol}$ TG であることを明らかにした。これらの TG00H 分子は LDL や HDL には存在せず、VLDL や IDL に含まれることが明らかとなった。このことは、TG に富むリポタンパク質が動脈硬化惹起性であるという考えに対して支持基盤を与えるものである。更に、VLDL よりも TG 含量が少ない IDL において、VLDL に匹敵する TG00H 濃度を認めたことは、IDL の易酸化性、更には動脈硬化惹起性を支持する所見と認められる。

一方、中鎖脂肪酸に関しては、中鎖脂肪酸の揮発性を下げると同時に検出感度を向上させる 2-ニトロフェニルヒドラゾン標識を用いて、高感度で特異的な HPLC 測定法を確立した。これを用いて、106 名の健常者血清を測定し、 0.3 ± 0.4 $\mu\text{mol/L}$ と決定した。この濃度は長鎖脂肪酸の濃度よりも著しく低い。現在、申請者らは、本法をラット、イヌ、ヒトにおける中鎖脂肪酸負荷試験に応用して好成績を収めている。

これを要するに、著者は、過酸化脂質である CE00H 及び TG00H について、血漿及び VLDL、IDL へ局在することの新知見を得たものであり、動脈硬化研究及び他の脂質酸化関連疾患に対して分析化学的立場から貢献するところ大なるものがある。また、中鎖脂肪酸の血中動態を明らかにしうる新しい測定法を開発し得たものであり、中鎖脂肪酸が治療に用いられつつあるトリグリセリド蓄積心筋骨格筋血管症 (TGCV) や他の異所性脂肪蓄積症において、治療法の客観的評価に必要な血中濃度測定を可能にした貢献は大なるものである。

よって著者は、北海道大学博士 (保健科学) の学位を授与される資格あるものと認める。