



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アシルトランスフェラーゼAwat1およびAwat2が生み出すマイバム脂質多様性とドライアイ防止における役割
Author(s)	澤井, 恵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14848号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14848
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85649
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Sawai.pdf



令和4年3月
博士学位論文

アシルトランスフェラーゼ Awat1 および Awat2 が生み出す
マイバム脂質多様性とドライアイ防止における役割

北海道大学大学院 生命科学院 臨床薬学専攻
生化学研究室
澤井 恵

目次

目次.....	2
略語.....	5
脚注.....	6
1. 序論.....	7
1.1. 涙液層の構造と役割.....	7
1.2. マイボーム腺の構造.....	8
1.3. ドライアイの分類とマイボーム腺機能不全.....	8
1.4. マイバム脂質の組成と特徴.....	8
1.5. マイバム脂質の構造.....	9
1.6. 質量分析によるマイバム脂質組成解析.....	9
1.7. ドライアイ患者におけるマイバム脂質組成変化.....	10
1.8. マイバム脂質合成関連遺伝子ノックアウトマウス.....	11
2. 研究背景と目的.....	12
3. 結果.....	13
3.1. <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスの作製と解析	13
3.1.1. <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスの作製	13
3.1.2. <i>Awat1</i> および <i>Awat2</i> の欠損は MGD を引き起こす	13
3.1.3. <i>Awat2</i> は WE 産生に関与する	18
3.1.4. <i>Awat1</i> は OAHFA 産生に関与する	18
3.1.5. <i>Awat2</i> はタイプ 2 ω WdiE 産生に関与する	20
3.1.6. <i>Awat1</i> および <i>Awat2</i> は二価不飽和および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE 産生 に対しそれぞれ異なる寄与を示す	23
3.1.7. <i>Awat1</i> および <i>Awat2</i> はどちらも三価不飽和 OAHFA 産生に関与する	25
3.1.8. <i>Awat1</i> および <i>Awat2</i> は Chl-OAHFA 産生に対し主要には関与しない	26
3.2. ヒト涙液脂質組成解析.....	28
3.2.1. ヒト涙液中 WE 組成	28
3.2.2. ヒト涙液中 OAHFA 組成.....	28
3.2.3. ヒト涙液中タイプ 2 ω WdiE 組成.....	29
3.2.4. ヒト涙液中タイプ 1 ω WdiE 組成.....	30
4. 考察.....	34
4.1. マイバム脂質のドライアイ防止における役割.....	34
4.2. マウス <i>Awat1</i> および <i>Awat2</i> の基質特異性	35
4.3. ヒト AWAT1 および AWAT2 の基質特異性.....	40

4.4. MGD 新規治療薬開発にむけて	41
5. 材料と方法.....	43
5.1. マウス.....	43
5.2. 定量的リアルタイム PCR.....	44
5.3. ドライアイ表現型の評価.....	44
5.4. マイバムの融点測定.....	45
5.5. ヘマトキシリン/エオジン染色.....	45
5.6. タイプ 1 ω WdiE および Chl-OAHFA の化学合成.....	45
5.7. LC-MS/MS による脂質解析	46
5.8. サンプルングと統計解析.....	48
6. 表.....	49
表 1. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての WE 分子種の定量値 (図 5 関連)	49
表 2. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての OAHFA 分子種の定量値 (図 6 および図 9B 関連)	52
表 3. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 2 ω WdiE 分子種の定量値 (図 7A および 7B 関連)	56
表 4. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 2 α WdiE 分子種の定量値 (図 7C および 7D 関連)	61
表 5. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE 分子種の定量値 (図 8B および 8C 関連)	66
表 6. コントロールおよび <i>Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39</i> KO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE 分子種の定量値 (図 8D 関連) ...	71
表 7. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての Chl-OAHFA 分子種の定量値 (図 10B 関連)	74
表 8. 野生型, <i>Awat1</i> KO, <i>Awat2</i> KO および <i>Awat1 Awat2</i> DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての CE 分子種の定量値 (図 10C 関連)	76
表 9. ヒト涙液において測定したすべての WE 分子種の定量値 (図 11 関連)	78
表 10. ヒト涙液において測定したすべての OAHFA 分子種の定量値 (図 12 関連)	80

表 11. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 2 ω WdiE 分子種の定量値 (図 13 関連)	82
表 12. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 2 α WdiE 分子種の定量値	86
表 13. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE 分子種の定量値 (図 14 関連)	90
表 14. 本研究で使用したプライマー.....	93
表 15. WE の測定時に選択した m/z 値 (図 5 および図 11 関連)	94
表 16. OAHFA の測定時に選択した m/z 値 (図 6, 図 9 および図 12 関連)	98
表 17. タイプ 2 ω/α WdiE の測定時に選択した m/z 値 (図 7 および図 13 関連) ..	103
表 18. タイプ 1 ω WdiE の測定時に選択した m/z 値 (図 8 および図 14 関連)	111
表 19. Chl-OAHFA の測定時に選択した m/z 値 (図 10 関連)	117
表 20. CE の測定時に選択した m/z 値 (図 10 関連)	119
7. 参考文献.....	121
8. 謝辞.....	125

略語

- ADDE: aqueous-deficient dry eye (水分減少型ドライアイ)
EDE: evaporative dry eye (蒸発亢進型ドライアイ)
MGD: meibomian gland dysfunction (マイボーム腺機能不全)
CE: cholesteryl ester (コレステリルエステル)
WE: wax monoester (ワックスモノエステル)
OAHFA: (*O*-acyl)- ω -hydroxy fatty acid ((*O*-アシル)- ω -水酸化脂肪酸)
WdiE: wax diester (ワックスジエステル)
Chl-OAHFA: cholesteryl OAHFA (コレステリル OAHFA)
FA: fatty acid (脂肪酸)
Chl: cholesterol (コレステロール)
FAI: fatty alcohol (脂肪族アルコール)
 ω -OH: ω -水酸化
MS: mass spectrometry (質量分析)
MS/MS: タンデム質量分析
MRM: multiple reaction monitoring (多重反応モニタリング)
LC: liquid chromatography (液体クロマトグラフィー)
LC-MS/MS: LC 連結 MS/MS
KO: knockout (ノックアウト)
SOAT: sterol *O*-acyltransferase (ステロール *O*-アシルトランスフェラーゼ)
CYP: cytochrome P450 (シトクロム P450)
ELOVL: elongation of very long-chain FA (極長鎖脂肪酸伸長酵素)
AWAT: acyl-CoA wax alcohol acyltransferase (アシル CoA ワックスアルコールアシルトランスフェラーゼ)
DKO: double knockout (二重ノックアウト)
BUT: breakup-time (涙液層破壊時間)
PAM: protospacer adjacent motif
Het: hetero (ヘテロ)

脚注

本研究では、ヒトのタンパク質を全て大文字で表記し、マウスのタンパク質を頭文字のみ大文字で表記した。遺伝子はイタリックで表記した。

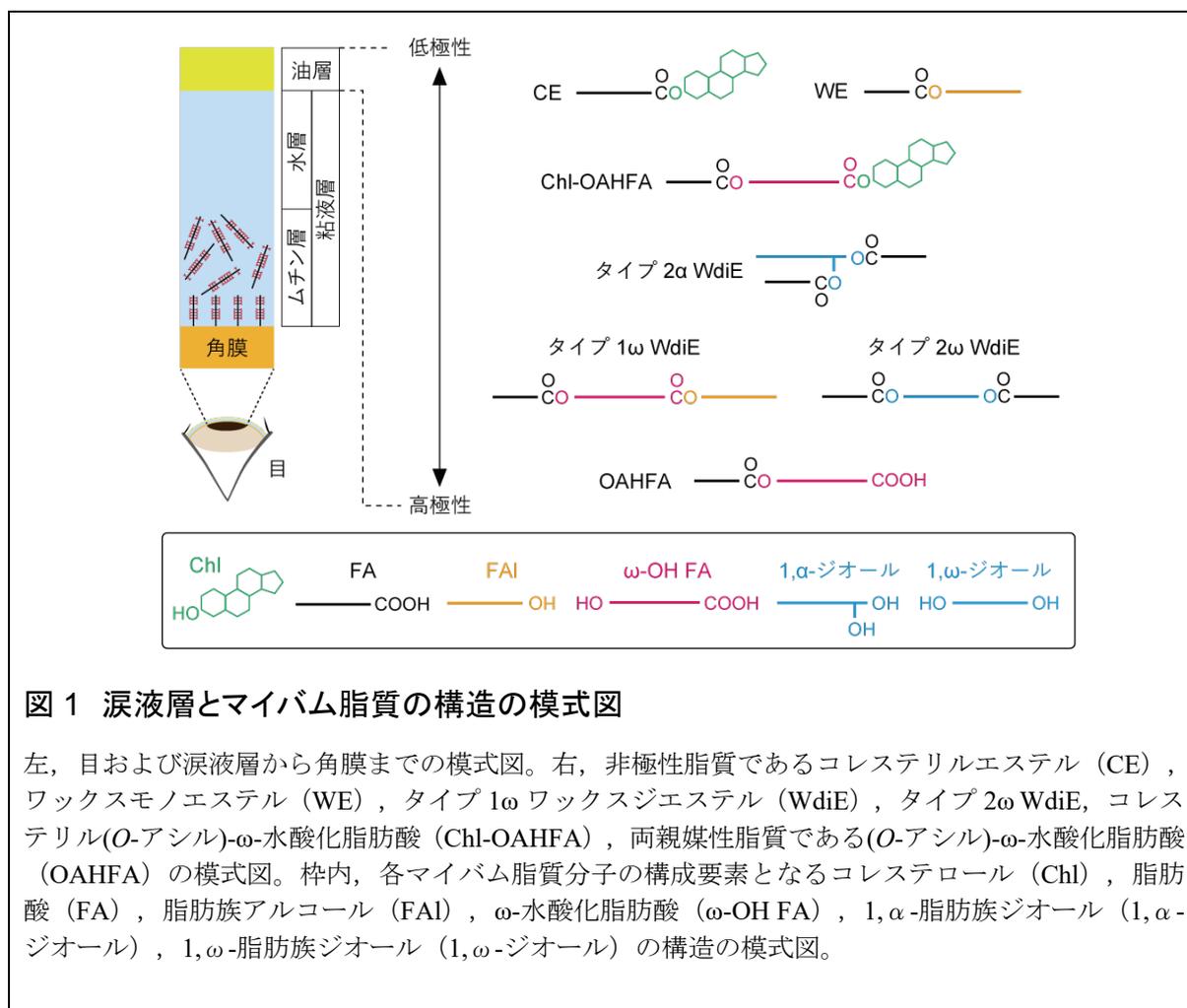
(例) ヒト：タンパク質AWAT1, 遺伝子*AWAT1*

マウス：タンパク質Awat1, 遺伝子*Awat1*

1. 序論

1.1. 涙液層の構造と役割

涙液層は眼表面を滑らかにし、光の屈折を助け、角膜の表面を潤し、角膜へ酸素や栄養分を供給するなどの様々な役割を有する。涙液層は角膜側からムチン層、水層、油層で構成され、そのうちムチン層と水層は明確な境界をもたないため、粘液層とまとめて呼ばれる（図1）¹⁻⁴⁾。それぞれの層は異なる役割を担う。ムチン層は涙液の角膜への保持に働く^{1,3-5)}。水層は酸素や栄養分の角膜への供給、感染防止などを担う^{4,6)}。油層の役割は水層中の水分蒸散防止、涙液表面張力の低下、適度な粘弾性の付与である^{1,7-9)}。ムチンは角結膜上皮細胞や杯細胞、水層の成分は涙腺、そして油層を構成する脂質はマイボーム腺から分泌される^{5,6,9)}。マイボーム腺分泌物はマイバムと呼ばれ、マイバム中の脂質は総称してマイバム脂質と呼ばれる^{9,10)}。



1.2. マイボーム腺の構造

マイボーム腺は皮脂腺が特殊に発達した腺組織であり、上下眼瞼の裏側に存在する。マイボーム腺はマイバム脂質合成が盛んに行われる腺房、マイバムが通る排出導管により構成される⁹⁾。腺房細胞(マイボサイト)は分化に伴ってマイバム脂質を合成し、最終的には自身の合成した脂質によって破裂することでマイバムとなる(全分泌)。マイバムは角化扁平上皮細胞で構成された排出導管を通り、眼瞼縁に並ぶ開口部より眼表面に排出される。

1.3. ドライアイの分類とマイボーム腺機能不全

TFOS (Tear Film & Ocular Surface Society) DEWS (Dry Eye Workshop) IIの2017年のレポートによると、ドライアイは涙液層のホメオスタシスの破綻を特徴とし、種々の眼症状を伴う多因性の眼表面疾患と定義されている^{3,11)}。ドライアイは涙液減少型ドライアイ (aqueous-deficient dry eye; ADDE) と蒸発亢進型ドライアイ (evaporative dry eye; EDE) の大きく二つに分類される¹²⁾。ADDEでは涙腺からの涙液層水層成分の分泌が低下するのに対し、EDEでは油層の異常によって水分蒸散が亢進する。また、多くの場合のドライアイでは両方の異常が見られる。EDEの最大の原因はマイボーム腺機能不全 (meibomian gland dysfunction; MGD) であり、その割合は報告あるいは調べた地域によって異なるが、ドライアイ全体の65-87%を占める¹²⁻¹⁵⁾。MGDにみられる所見としてマイボーム腺開口部の閉塞や後退、マイバムの性状変化、マイボーム腺の萎縮や脱落などが挙げられる^{1,16)}。マイボーム腺開口部の閉塞は主に排出導管の過角化によって引き起こされると考えられている¹⁾。また、正常な状態では透明な性状のマイバムが、MGD患者では不透明、黄ばんだ、あるいは練り歯磨き状であることがある¹⁶⁾。これらのマイバム性状変化がマイバム脂質組成の変化によるかは不明である。上記の異常を改善するような根本治療薬は現在市販されておらず、温罨法や洗浄法等による対症療法が行われている。

1.4. マイバム脂質の組成と特徴

マイバム脂質には様々な脂質クラスが含まれる。主要な構成成分はコレステリルエステル (cholesteryl ester; CE) とワックスモノエステル (wax monoester; WE) である。報告によって異なるが、両者をあわせるとマイバム脂質全体の54-88%を占めるとされている(図1)^{4,10)}。マイバム脂質には他に(*O*-アシル)- ω -水酸化脂肪酸 ((*O*-acyl)- ω -hydroxy fatty acid; OAHFA, 1-5%) やワックスジエステル (wax diester; WdiE, ~7%) , コレステリル OAHFA (cholesteryl OAHFA; Chl-OAHFA, ~3%) , トリアシルグリセロール (~1%) といった脂質クラスも含まれる。CE と WE は生体でみられる脂質の中

で最も疎水性が高く、その疎水性の高さが油層に高い水分蒸散防止能を付与していると考えられている。これらは油層の中でも非極性脂質サブレイヤーを構成している。一方、OAHFAは両親媒性分子であり、非極性サブレイヤーと液層の間に両親媒性脂質サブレイヤーを形成して両者をつなぎとめる役割があると考えられてきた。WdiEとChl-OAHFAはCE/WEとOAHFAの中間的な極性を示す。このことから、当研究室は油層が単純な非極性サブレイヤーと両親媒性脂質サブレイヤーの二層ではなく、より複雑な脂質の極性勾配が油層中に存在して涙液層を安定化しているというモデルを最近提唱した¹⁷⁾。マイバム脂質は他の組織にないユニークな脂質クラスで構成されており、多くの脂質クラスの標準品が市販されていない。そのため、正確な定量・定性解析がなされていないのが現状であり、前述した脂質クラスごとの量比も他の脂質クラスの標準品を代用して定量されている。

1.5. マイバム脂質の構造

CEとは脂肪酸 (fatty acid; FA) とコレステロール (cholesterol; Chl) のエステル結合体であり、WEとはFAと脂肪族アルコール (fatty alcohol; FAI) のエステル結合体である (図 1B)。FAやFAIは炭素鎖長の違いにより以下のように定義される: C11-20, 長鎖 FA/FAI; \geq C21, 極長鎖 FA/FAI; 極長鎖のうち特に \geq C26, 超長鎖 FA/FAI。マイバム脂質中 WEはFA側が長鎖 (ヒトでは C18:1, マウスでは C16:1 が主要) であるのに対し、FAI側は極長鎖が多い^{18,19)}。また、哺乳類のFA/FAIのほとんどは直鎖であるが、マイボーム腺には分岐鎖 FA/FAIが豊富に存在している^{19,20)}。OAHFAはFAと ω -水酸化 (ω -OH) FAのエステル結合体であり、マイバム脂質では長鎖FAと超長鎖 ω -OHFAをもつものがほとんどである^{10,17)}。Chl-OAHFAはOAHFAとChlのエステル結合体である。WdiEはタイプ1とタイプ2にわけられ、タイプ1では水酸化FAのカルボン酸と水酸基がそれぞれFAIとFAとエステル結合しており、タイプ2では脂肪族ジオールの2つの水酸基が2つのFAとのエステル結合している。これらはさらに、水酸基の位置の違い (α 位あるいは ω 位) によってタイプ1とタイプ2 WdiEはそれぞれさらにタイプ1 α とタイプ1 ω , タイプ2 α とタイプ2 ω に分類される。これまでに、少なくともマイバム脂質にはタイプ1 ω , タイプ2 α , タイプ2 ω WdiEが存在することが示されている¹⁷⁾。

1.6. 質量分析によるマイバム脂質組成解析

マイバム脂質組成解析の多くは質量分析 (mass spectrometry; MS) やタンデム質量分析 (MS/MS) を用いて行われている。MS解析にサンプルを直接導入する方法では同一質量の化合物の分離ができないため、MS解析と液体クロマトグラフィー (LC;

liquid chromatography) やガスクロマトグラフィー等を組み合わせて極性による分離を行う方法が望ましい。MS あるいは MS/MS の中にもいくつかの手法があるが、最も広く行われている方法はトータルイオンスキャンとプロダクトイオンスキャンを組み合わせた方法である。この方法では、はじめにトータルイオンスキャンを行って含有される分子種の質量電荷比 (m/z) (分子量に相当する情報) を調べて定量し、プロダクトイオンスキャンを行って生じるプロダクトイオンの情報から分子構造を推定する。つまり、前半の定量解析に MS、後半の定性解析に MS/MS をそれぞれ使用している。この方法の長所は網羅性であるが、短所として主要な分子種しか検出できないこと、同一分子量の化合物を区別して定量できないため特異性に乏しいことが挙げられる。一方、多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) モードでは 1 つめの質量分析部 (Q1) において特定の m/z をもつプリカーサーイオンが選択され、選択されたイオンのみがコリジョンセル (Q2) において衝突誘起解離を受け、2 つめの質量分析部 (Q3) において特定の m/z をもつプロダクトイオンが検出される。つまり、MRM モードでは定量解析に MS/MS を使用しており、分子全体の m/z と特異的なフラグメントの m/z の二重のふるいにかけているため、前述の方法に比べて特異性が高い。一方、指定した m/z のイオンしか検出できないため予期せぬ分子種の発見には不向きであり、網羅的に調べようとする場合に煩雑性が高い。また、プロダクトイオンの情報がないと Q3 に選択する m/z を設定できないため、標準品が必要となる。本研究では MRM モードによる LC 連結 MS/MS (LC-MS/MS) によってすべての脂質定量解析を行った。

これまでに WE については網羅的な MRM 測定¹⁸⁾の報告があるものの、OAHFA の MRM 測定については限られた分子種しか調べられておらず²¹⁾、WdiE に至っては MRM 測定の報告がない。マイバム脂質中 WdiE にはタイプ 1 ω 、タイプ 2 α 、タイプ 2 ω の 3 種類が存在し、LC-MS/MS と MRM 法を組み合わせなければこれらの異性体を区別して測定することはできない。

1.7. ドライアイ患者におけるマイバム脂質組成変化

ドライアイ患者マイバムあるいは涙液において種々のマイバム脂質の組成が変化していることが複数のグループから報告されている。Butovich らが報告した症例ではマイバムおよび涙液中の CE/WE 比が健常人に比べて 2 倍に増加し、トリアシルグリセロールが 20–30 倍に増加していた²²⁾。Lam らの報告ではマイバム中ドライアイ重症度が高いほど OAHFA 量が低いという相関がみられた²¹⁾。Khanal らは MGD 患者マイバムおよび涙液において OAHFA が短鎖化していることを報告している²³⁾。し

かし、いずれの報告においても脂質組成の変化が何に由来するのかは明らかにされていない。

1.8. マイバム脂質合成関連遺伝子ノックアウトマウス

マイバム脂質中の個々の脂質クラスのドライアイ防止における役割は、それぞれの生合成にかかわる遺伝子のノックアウト (knockout; KO) マウスの解析によって解明されつつある。CE 合成において FA と Chl 間のエステル結合形成を担う *Soat1* (sterol *O*-acyltransferase) を KO したマウスではマイボーム腺房の萎縮が報告されており、CE がマイボーム腺の形態維持に必須であることが明らかとなっている²⁴⁾。ω-OH 脂質 (OAHFA, Chl-OAHFA およびタイプ 2ω WdiE) の産生を担う FA ω 位水酸化酵素遺伝子 *Cyp4f39* (cytochrome P450。ヒトでは *CYP4F22*) を表皮以外の組織で KO したマウスを解析した当研究室の研究では、このマウスが涙液層安定性低下やマイボーム腺開口部の閉塞を示すことを明らかにした¹⁷⁾。FA 伸長酵素はアシル CoA を 2 炭素ずつ伸長させる FA 伸長サイクルの律速段階を触媒する。哺乳類には基質特異性の異なった 7 つの FA 伸長酵素アイソザイム *Elovl1-7* (elongation of very long-chain FA) が存在する。そのうち、C22-C24 アシル CoA に高い活性を示す *Elovl1*²⁵⁾ の遺伝子を表皮以外の組織で KO したマウスを解析した当研究室の研究では、このマウスが CE、WE の短鎖化、それに伴った涙液蒸散亢進と月齢に依存した角膜混濁を示すことを明らかにした²⁶⁾。また、C18-C22 アシル CoA に活性を示す *Elovl3* や ≥C26 アシル CoA に活性を示す *Elovl4* の遺伝子変異マウスもドライアイ様表現型を示しており^{27,28)}、マイバム脂質の炭素鎖長の維持が正常な油層形成に重要であることが示されている。これらの遺伝子の役割が解明されたのは近年であり、現状ドライアイ患者における発現変動や変異の有無について調べるには至っていない。上述した脂質組成変化の原因がこれらの遺伝子の発現変動や変異による可能性があり、今後の調査が期待される。

2. 研究背景と目的

WE の産生においてはアシル CoA ワックスアルコールアシルトランスフェラーゼ (acyl-CoA wax alcohol acyltransferase; AWAT) が FA と FAI 間のエステル結合形成を触媒する。哺乳類には AWAT として AWAT1 と AWAT2 の 2 種類のアイソザイムが同定されている^{29,30}。これらは *in vitro* の実験において長鎖 FA と長鎖 FAI からなる WE の合成活性を示した。しかし、これらのどちらがマイバム脂質中の大部分を占める極長鎖 FAI 含有 WE の産生に関与しているのかは未だ不明である。そのため、マイバム脂質中の WE が産生できないモデル動物は作製されておらず、WE のドライアイ防止における役割は明らかになっていない。さらに、AWAT1 と AWAT2 の OAHFA や WdiE の産生への関与も不明である。そこで本研究では *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* 二重 KO (double knockout; DKO) マウスを作製し、*Awat1* と *Awat2* のマイバム脂質中の WE や OAHFA, WdiE 産生への寄与、およびドライアイ防止における役割を調べた。

上記研究成果を MGD 患者の治療に応用するためには患者における脂質組成変化を調べる必要があるが、多くのマイバム脂質、特に WdiE に関して解析が乏しく、健康なヒトのマイバム脂質組成さえも正しく把握されていないのが現状である。そこで本研究では WdiE の MRM 測定法を確立し、ヒト涙液中 WE, OAHFA, WdiE の包括的 MRM 測定を行うことで、ヒトマイバム脂質組成情報をアップデートした。

3. 結果

3.1. *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスの作製と解析

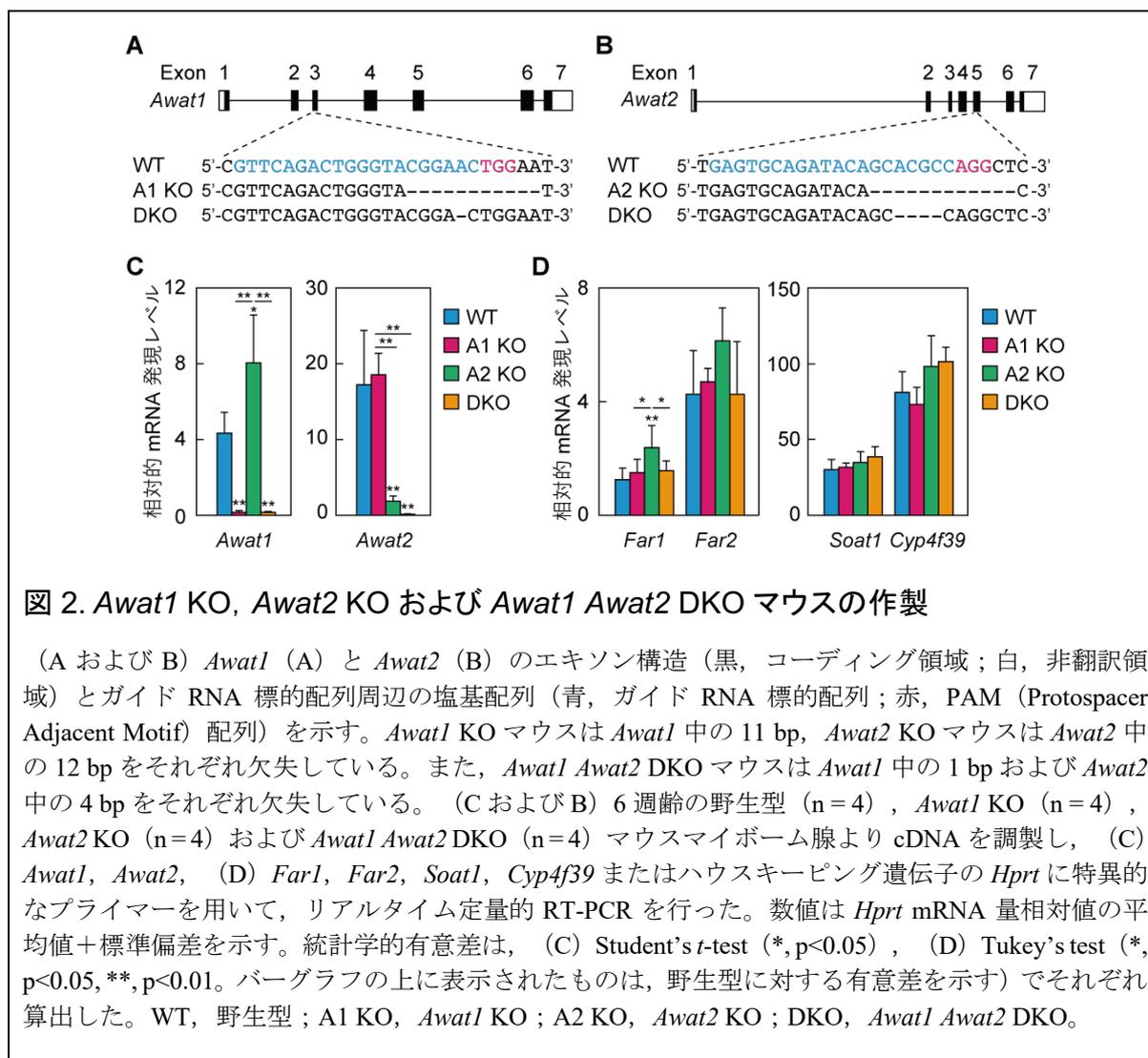
3.1.1. *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスの作製

Awat1 と *Awat2* のマイバム脂質中の WE や OAHFA, WdiE 産生への寄与, およびドライアイ防止における役割を調べるため, CRISPR/Cas9 システムを用いて *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスを作製した。*Awat1* 遺伝子および *Awat2* 遺伝子は同一染色体 (X 染色体) 上に近接して存在するため, 各単独 KO マウス同士の交配により *Awat1 Awat2* DKO マウスを得ることが困難であった。そのため, 本研究では *Awat1* と *Awat2* のガイド RNA を同時にマウス受精卵に導入することで両遺伝子の欠損を試みた。その結果, *Awat1* のエキソン 3 に 11 bp の欠損変異をもつ *Awat1* KO マウス, *Awat2* のエキソン 5 に 12 bp の欠損変異をもつ *Awat2* KO マウス, *Awat1* のエキソン 3 に 1 bp の欠損変異をもち, *Awat2* のエキソン 5 に 4 bp の欠損変異をもつ *Awat1 Awat2* DKO マウスが得られた (図 2A, 2B)。すべての KO/DKO マウスはメンデルの法則に従って生まれ, 3.1.2.以降に示す表現型を除き良好な健康状態で成長した。

定量的リアルタイム PCR を用い, 各 KO/DKO マウスにおいて *Awat* 遺伝子および他のマイバム脂質合成関連遺伝子の発現量に影響が出ていないかを調べた。*Awat2* KO マウスにおいては *Awat1* mRNA 発現量が野生型の 1.8 倍程度に増加していた (図 2C)。一方, *Awat1* KO マウスにおいては *Awat2* mRNA 発現量に変化はなかった。欠損変異が入った遺伝子の発現量はいずれも減少しており, ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構が働いたことが推測される。続いて, マイバム脂質合成関連遺伝子として, FAI 産生酵素の候補遺伝子である *Far1* および *Far2*³¹⁾, CE 産生酵素遺伝子 *Soat1*, FA ω 位水酸化酵素遺伝子 *Cyp4f39* の発現量を測定した。*Awat2* KO マウスにおいて *Far1* の発現量がわずかに増加していたものの, その他の遺伝子については変化がなかった (図 2D)。

3.1.2. *Awat1* および *Awat2* の欠損は MGD を引き起こす

野生型マウスが目を大きく見開いているのに対し, *Awat1* KO マウスは常時わずかに目を閉じ気味にしており, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスは常時ほとんど目を閉じかけた状態でいた (図 3A)。野生型マウスでは眼瞼縁に塞栓が観察されないのに対し, *Awat1* KO マウスでは半液状の, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスでは固体状の塞栓が観察された (図 3B)。*Awat2* KO マウスのマイボーム腺を圧搾すると, 中から白い練り歯磨き状のマイバムが出てきた (図 3C)。したがって



KO マウスで観察された塞栓はマイボーム腺開口部で詰まったものではなく, 固化あるいは半固化したマイバムが見えたものと考えられた。そこで, 各マウスよりマイバムを絞り出し, 融点測定を行った。野生型マウスマイバムの融点が 34°C であったのに対し, *Awat1* KO マウスでは 39°C と上昇しており, *Awat2* KO マウスでは 62°C, *Awat1 Awat2* DKO マウスでは 57°C と大幅に上昇していた (図 3D)。ヘマトキシリン/エオジン染色によりマイボーム腺内部の構造を観察すると, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスのマイボーム腺導管は野生型のものと比べて全体的に拡大していた (図 3E)。*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺は全体的に肥大化していた (図 3B) ことから, これらのマイボーム腺では固化したマイバムによって分泌が著しく阻害され, マイバムが腺内部に蓄積していると考えられる。一方で, 各 KO マウスとも腺房中に脱核した細胞が存在していた (図 3E) ことから, マイボサイトの分化に異常は見られなかった。

MGD 患者でたびたび見られるマイボーム腺の萎縮は, 継続的な分泌の停滞によっ

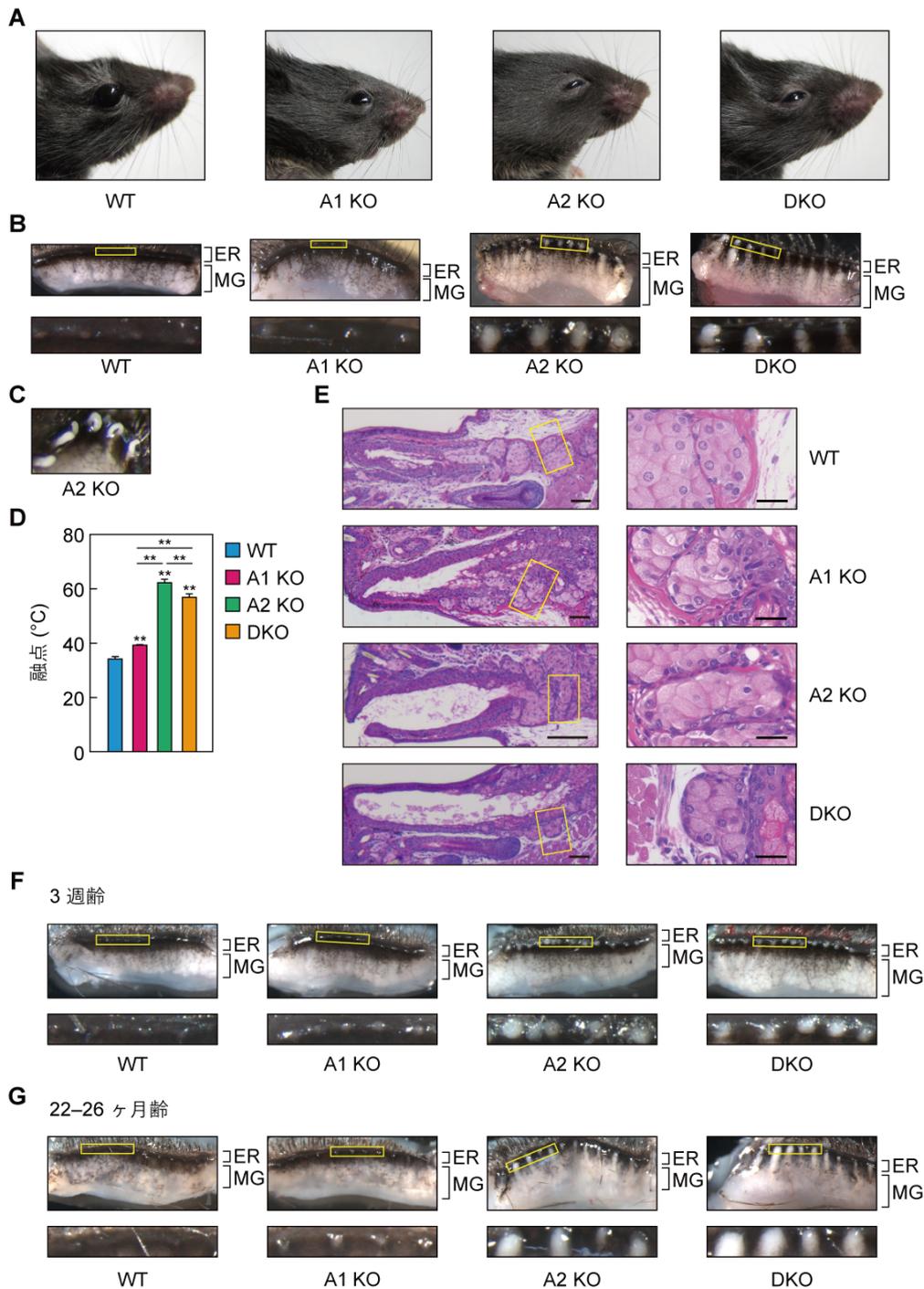


図 3. *Awat1* および *Awat2* の欠損はマイボーム腺閉塞を引き起こす

(A) 6 週齢の野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスの写真。(B) 6 週齢の野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスより上脛を回収し, 実体顕微鏡下で写真撮影を行った。下段には上段の写真上で黄色の四角で囲まれた部分の拡大図を示す。(C) 6 週齢 *Awat2* KO マウスマイバムを圧搾した際の写真。(D) 6 週齢の野生型 (n = 3), *Awat1* KO (n = 3), *Awat2* KO (n = 3) および *Awat1 Awat2* DKO (n = 3) マウスマイボーム腺から圧搾したマイバムの融点を測定した。数値は平均値 + 標準偏差を示す。統計学的有意差は Tukey's test (**, p < 0.01。バーグラフの上に表示されたものは, 野生型に対する有意差を示す) で算出した。(E) 6 週齢の野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウス上脛のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジンにより染色し, 顕微鏡下で明視野画像を取得した。右には左の写真上で黄色の四角で

囲まれた部分の拡大図を示す。スケールバー：左，250 μm ；右，100 μm 。(FおよびG) (F) 3週齢あるいは(G) 22–26ヶ月齢(野生型と *Awat1* KO, 22ヶ月齢；*Awat2* KOと *Awat1 Awat2* DKO, 26ヶ月齢)の野生型，*Awat1* KO，*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスより上瞼を回収し，実体顕微鏡下で写真撮影を行った。下段には上段の写真上で黄色の四角で囲まれた部分の拡大図を示す。WT, 野生型；A1 KO, *Awat1* KO；A2 KO, *Awat2* KO；DKO, *Awat1 Awat2* DKO；ER, eyelid rim；MG, meibomian gland。

てマイボーム腺内圧が上昇することで引き起こされると考えられている⁹⁾。そこで、マイボーム腺閉塞が見られた KO マウスにおいて、閉塞の継続によるマイボーム腺萎縮が起こっているかどうかを調べた。各 KO マウスで眼瞼縁に見られた塞栓は3週齢時点で既に出現しており(図 3F)，22–26ヶ月齢でも観察された(図 3G)。22–26ヶ月齢マウスマイボーム腺は野生型のものも含めて加齢による弱い萎縮を示していたものの、KO 依存的な萎縮は特に観察されなかった。

これまでに当研究室では MGD モデルマウスの瞬目回数が増加していることを報告してきた^{17) 26)}。野生型マウスの1分間あたりの瞬目回数が平均0.4回であったのに対し、*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスはそれぞれ8.1および9.8回と大幅に増加していた(図 4A)。*Awat1* KO マウスも3.8回であり、野生型に比べて有意に増加していた。眼表面からの水分蒸散量と涙液量に関しては *Awat1* KO マウスにおいて変化がなかったものの、*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスにおいて有意に増加していた(水分蒸散量：*Awat2* KO において1.7倍，*Awat1 Awat2* DKO において1.6倍；涙液量：*Awat2* KO において2.7倍，*Awat1 Awat2* DKO において2.2倍；図 4B, 4C)。涙液量の増加は眼表面からの水分蒸散量の増加に対する代償機構であると考えられる。続いて涙液層の安定性の指標である涙液層破壊時間(Breakup time; BUT)を計測した。この試験では涙液層が形成されてから破壊されるまでの時間を計測しており、低値を示すほど安定性に乏しいと評価される。*Awat1* KO マウスは野生型と比べて低い BUT 値を示した(図 4D)。*Awat2* KO マウスも同様に低い BUT 値を示し、週齢依存的に低下した(図 4E)。測定したどの時点においても *Awat2* KO マウスの BUT 値は野生型よりも低値を示した。次に、*Awat2* KO マウスの角膜障害および角膜不整について調べた。11–23週齢における角膜障害スコアは野生型、*Awat2* KO どちらも7週齢時に比べて高値を示し、*Awat2* KO マウスについては11週齢時ではほぼ頭打ちになっていた(図 4F)。*Awat2* KO マウスのスコアは19週齢時を除く全ての時点において野生型のスコアよりも高値を示した。野生型の角膜不整については測定したどの時点においても異常が見られなかった(図 4G)。一方で、*Awat2* KO マウスに関しては11–23週齢時において角膜不整が見られ、そのスコアも週齢依存的に高くなっていった(図 4H)。したがって、*Awat2* KO マウスは週齢依存的に進行するドラ

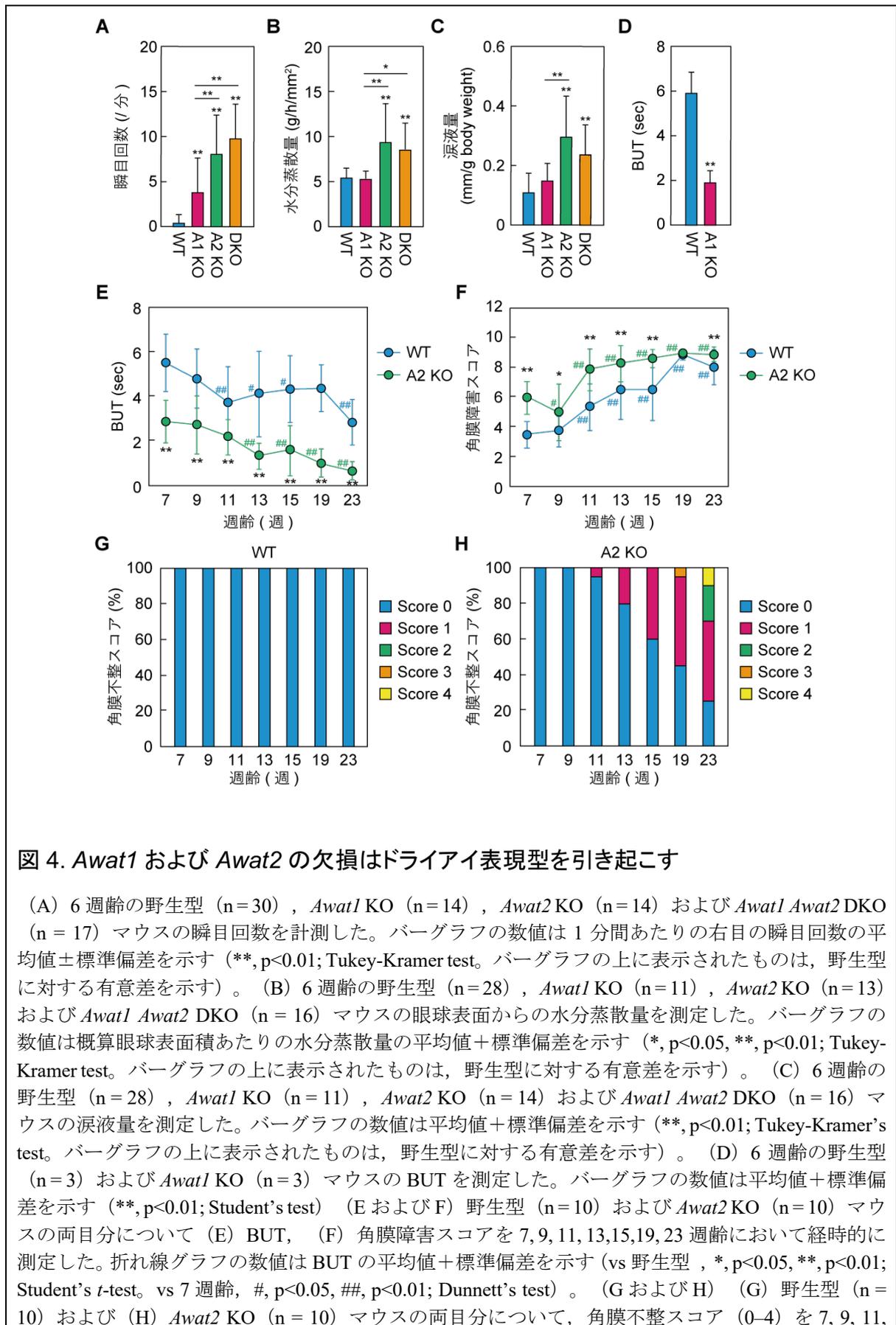


図 4. *Awat1* および *Awat2* の欠損はドライアイ表現型を引き起こす

(A) 6週齢の野生型 (n=30), *Awat1* KO (n=14), *Awat2* KO (n=14) および *Awat1 Awat2* DKO (n=17) マウスの瞬目回数を計測した。バーグラフの数値は1分間あたりの右目の瞬目回数の平均値±標準偏差を示す (**, p<0.01; Tukey-Kramer test。バーグラフの上に表示されたものは, 野生型に対する有意差を示す)。(B) 6週齢の野生型 (n=28), *Awat1* KO (n=11), *Awat2* KO (n=13) および *Awat1 Awat2* DKO (n=16) マウスの眼球表面からの水分蒸散量を測定した。バーグラフの数値は概算眼球表面積あたりの水分蒸散量の平均値+標準偏差を示す (*, p<0.05, **, p<0.01; Tukey-Kramer test。バーグラフの上に表示されたものは, 野生型に対する有意差を示す)。(C) 6週齢の野生型 (n=28), *Awat1* KO (n=11), *Awat2* KO (n=14) および *Awat1 Awat2* DKO (n=16) マウスの涙液量を測定した。バーグラフの数値は平均値+標準偏差を示す (**, p<0.01; Tukey-Kramer's test。バーグラフの上に表示されたものは, 野生型に対する有意差を示す)。(D) 6週齢の野生型 (n=3) および *Awat1* KO (n=3) マウスの BUT を測定した。バーグラフの数値は平均値+標準偏差を示す (**, p<0.01; Student's test) (E および F) 野生型 (n=10) および *Awat2* KO (n=10) マウスの両目分について (E) BUT, (F) 角膜障害スコアを7, 9, 11, 13, 15, 19, 23 週齢において経時的に測定した。折れ線グラフの数値は BUT の平均値+標準偏差を示す (vs 野生型, *, p<0.05, **, p<0.01; Student's t-test。vs 7 週齢, #, p<0.05, ##, p<0.01; Dunnett's test)。(G および H) (G) 野生型 (n=10) および (H) *Awat2* KO (n=10) マウスの両目分について, 角膜不整スコア (0-4) を7, 9, 11,

13,15,19,23 週齢において経時的に測定した。グラフは各スコアの割合を示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。

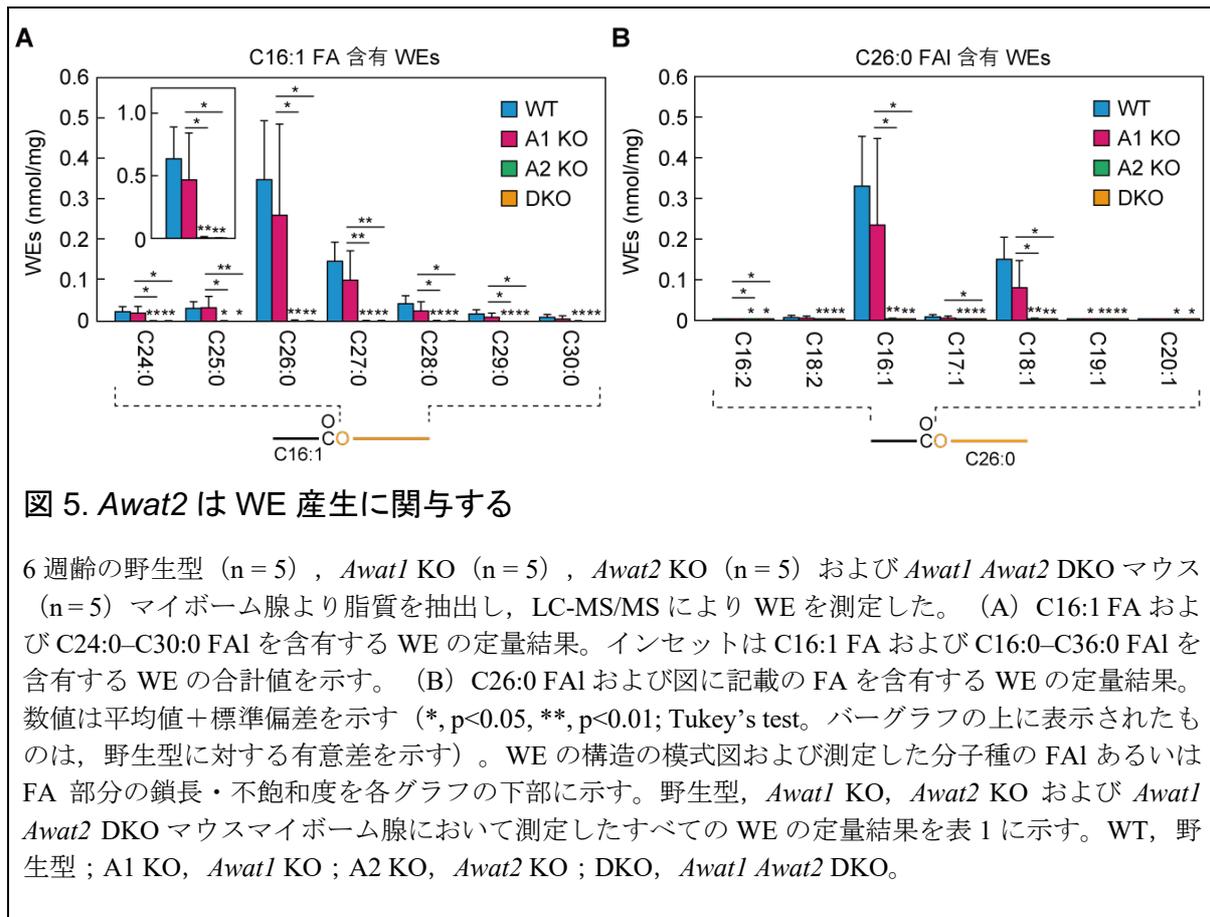
アイ表現型を示した。

3.1.3. *Awat2* は WE 産生に関与する

Awat1 と *Awat2* の WE 産生に対する寄与を調べるため、MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって野生型および各 KO マウスマイバム脂質中の WE を測定した。WE は FA と FAI から成り、マウスマイバム脂質中には C16:1 FA をもつものが最も多く存在する¹⁰⁾。野生型マウスマイバム脂質中の C16:1 FA をもつ WE のうち、C24:0-C30:0 の FAI をもつものが豊富に存在しており、最も多かったのは C26:0 FAI をもつものであった (図 5A, 表 1)。以前の報告¹⁰⁾と一致し、C26:0 FAI をもつ WE のうち最も多かったのは C16:1 FA をもつものであり、次いで C18:1 FA をもつものであった (図 5B, 表 1)。他の一価不飽和 FA や飽和 FA をもつ WE はわずか、あるいはほとんど存在しなかった (図 5B, 表 1)。*Awat1* KO マウスの WE 量は FA/FAI の組み合わせに関わらず、あらゆる分子種において野生型と同程度であった (図 5A, 5B, 表 1)。一方、*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスについてはほぼ全ての WE 分子種が消失していた。これらの結果より、*Awat2* のみがマイボーム腺における WE 産生を担うことが明らかになった。

3.1.4. *Awat1* は OAHFA 産生に関与する

OAHFA は長鎖 FA (主に C16:1, C18:1 および C18:2) と超長鎖 ω -OH FA (主に C30:1-C36:1) から成ると報告されている^{10,17)}。しかしながら、両者をつなぐエステル結合を形成するアシルトランスフェラーゼは未だ同定されていない。そこで、*Awat1* と *Awat2* の OAHFA 産生に対する寄与を調べるため、MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって野生型および各 KO マウスマイバム脂質中の OAHFA を測定した。以前の報告¹⁷⁾と一致し、C16:1 FA をもつ OAHFA のうち最も多かったのは C34:1 ω -OH FA をもつものであり、次いで C32:1 および C35:1 ω -OH FA をもつものであった (図 6A, 表 2)。 ω -OH FA 部分の大多数は一価不飽和であり、飽和 ω -OH FA をもつ OAHFA はわずかであった (表 2)。*Awat1* KO マウスの C16:1 FA をもつ OAHFA 量は主要な分子種すべて (C32:1-C36:1 ω -OH FA 含有) において減少しており、その総量は野生型の 29%程度であった (図 6A, 表 2)。*Awat2* KO マウスについては C16:1 FA をもついくつかの分子種がわずかに減少しており、*Awat1 Awat2* DKO マウスについては多くの C16:1 FA 含有分子種が *Awat1* KO マウスと同程度であった。続いて C34:1 ω -OH



FA をもつ OAHFA を測定したところ, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 および C18:2 FA をもつものが検出された (図 6B, 表 2)。*Awat1* KO マウスの OAHFA 量は野生型と比べてすべての分子種において減少していたが, 有意に減少していたのは C16:1 FA をもつ分子種のみであった。一方, *Awat2* KO マウスについては C16:1 FA をもつ OAHFA を除くすべての分子種において増加していた。*Awat1 Awat2* DKO マウスの C16:0, C16:1, C18:0 FA をもつ OAHFA は *Awat2* KO マウスほどの増加ではなかったものの, C18:1 あるいは C18:2 FA をもつ OAHFA は依然として高いレベルにあった。このことは *Awat1* あるいは *Awat2* が關与しない OAHFA 産生経路の存在を示唆しており, *Awat2* KO の影響によってこの経路における OAHFA 産生が代償的に促進された可能性が考えられる。しかしながら, *Awat1* KO マウスの OAHFA 量は野生型と比べてすべての分子種において減少しており, 最も主要な C16:1 FA をもつ分子種においても有意かつ大幅に減少していた。このことから, *Awat1* がマイボーム腺における OAHFA 産生を主要に担うことが示された。

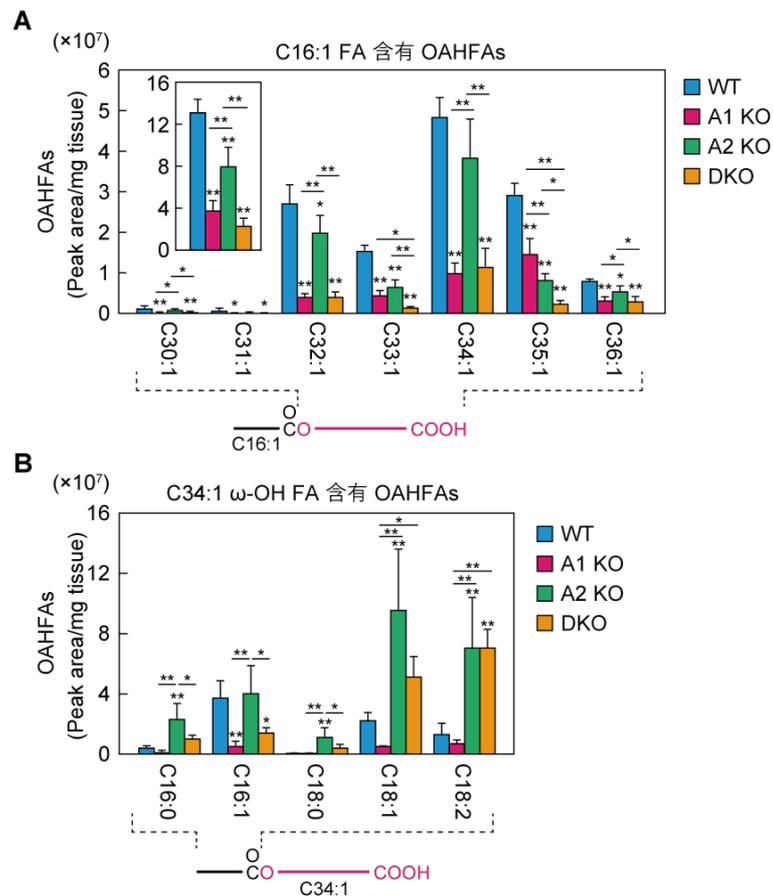


図 6. *Awat1* は OAHFA 産生に關与する

6 週齡の野生型 (n=4), *Awat1* KO (n=4), *Awat2* KO (n=4) および *Awat1 Awat2* DKO マウス (n=4) マイボーム腺より脂質を抽出した。N-(4-aminomethylphenyl)pyridinium により誘導體化したのち LC-MS/MS により OAHFA 誘導體を測定した。(A) C16:1 FA および C30:1–C36:1 ω -OH FA を含有する OAHFA の定量 (peak area/mg tissue) 結果。インセットは C16:1 FA および C16:1–C36:1 ω -OH FA を含有する OAHFA の合計値を示す。(B) C34:1 ω -OH FA および図に記載の FA を含有する OAHFA の定量 (peak area/mg tissue) 結果。数値は平均値+標準偏差を示す (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$; Tukey's test。バーグラフの上に表示されたものは、野生型に対する有意差を示す)。OAHFA の構造の模式図および測定した分子種の ω -OH FA あるいは FA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての OAHFA の定量結果を表 2 に示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。

3.1.5. *Awat2* はタイプ 2 ω WdiE 産生に關与する

タイプ 2 α あるいは 2 ω WdiE は 2 つの FA とそれぞれ 1, α -あるいは 1, ω -ジオールから成るジエステルである。まず, *Awat1* と *Awat2* のタイプ 2 ω WdiE 産生に対する寄与を調べるため, MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって野生型および各 KO マウスマイボーム脂質中のタイプ 2 ω WdiE を測定した。野生型マウスの C16:1 FA をもつタイプ 2 ω WdiE のうち, 残りのジオール-FA エステル部分の鎖長, 不飽和度の合計

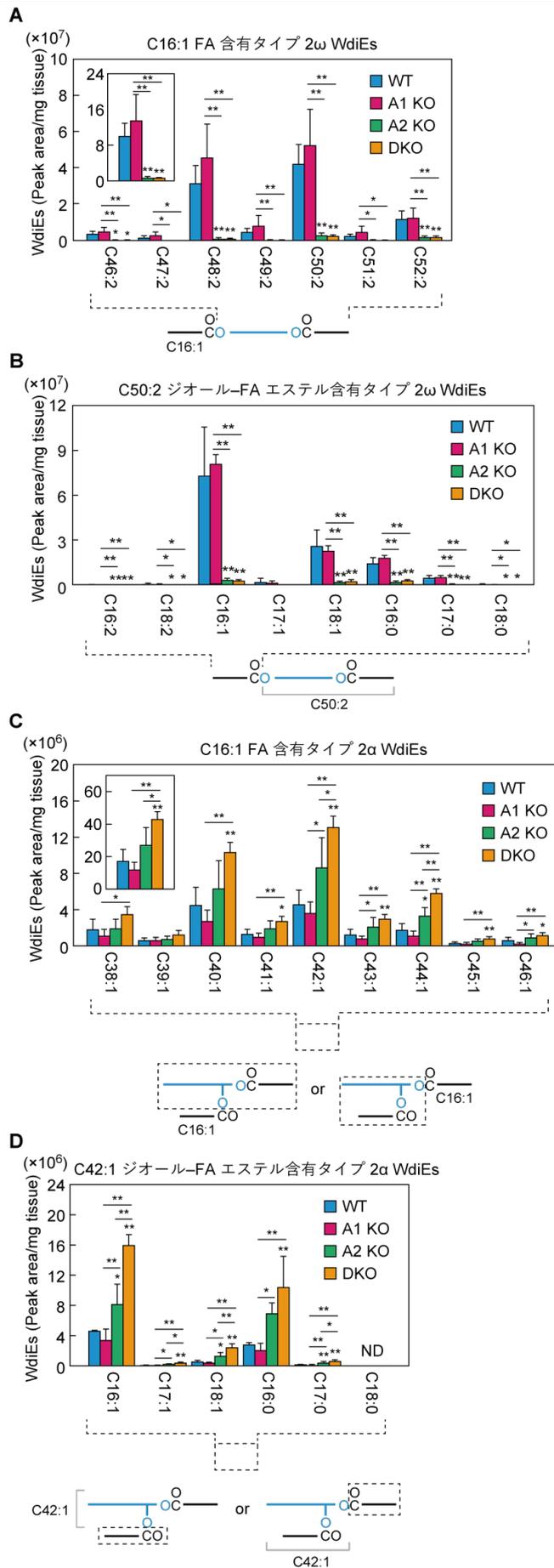


図 7. *Awat2* はタイプ 2 ω WdiE 産生に關与する

6 週齡の野生型 (n=4) , *Awat1* KO (n=4) , *Awat2* KO (n=4) および *Awat1 Awat2* DKO (n=4) マウスマイボーム腺より脂質を抽出し, LC-MS/MS により (A および B) タイプ 2 ω WdiE, (C および D) タイプ 2 α WdiE を測定した。(A) C16:1 FA および C46:2–C52:2 ジオール–FA エステルを含有するタイプ 2 ω WdiE の定量 (peak area/mg tissue) 結果。インセットは C16:1 FA および C32:2–C54:2 ジオール–FA エステルを含有するタイプ 2 ω WdiE の合計値を示す。(B) C50:2 ジオール–FA エステルおよび図に記載の FA を含有するタイプ 2 ω WdiE の定量 (peak area/mg tissue) 結果。(C) C16:1 FA および C38:1–C46:1 ジオール–FA エステルを含有するタイプ 2 α WdiE の定量 (peak area/mg tissue) 結果。インセットは C16:1 FA および C32:1–C54:1 ジオール–FA エステルを含有するタイプ 2 α WdiE の合計値を示す。(D) C42:1 ジオール–FA エステルおよび図に記載の FA を含有するタイプ 2 α WdiE の定量 (peak area/mg tissue) 結果。数値は平均値+標準偏差を示す (*, p<0.05, **, p<0.01; Tukey's test。バーグラフの上に表示されたものは, 野生型に対する有意差を示す)。タイプ 2 ω WdiE あるいはタイプ 2 α WdiE の構造の模式図および測定した分子種のジオール–FA エステルあるいは FA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 2 ω WdiE およびタイプ 2 α WdiE の定量結果を表 3 および表 4 にそれぞれ示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。

が C50:2 である分子種が最も多く, 次いで C48:2 となった (図 7A, 表 3)。ジオール–FA エステル部分については二価不飽和が最も多かったものの, 一価不飽和, 三価不飽和, 飽和も存在した (表 3)。逆に C50:2 ジオール–FA エステルをもつ分子種の FA 部分は C16:1 が最も多く, 次いで C18:1 (C16:1 の 36%), C16:0 (C16:1 の 20%) であった (図 7B, 表 3)。当研究室の以前の報告¹⁷⁾とあわせると, 野生型マウスマイボーム脂質において最も多いタイプ 2 ω WdiE は C16:1 FA–C34:1 ジオール–C16:1 FA のジエステルであることが明らかになった。*Awat1* KO マウスのタイプ 2 ω WdiE 組成は野生型と同様であった (図 7A, 7B, 表 3)。しかしながら, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスについてはほぼ全てのタイプ 2 ω WdiE 分子種が大幅に減少していた。これらのマウスにおけるタイプ 2 ω WdiE 総量は野生型の 6.4%程度にまで減少していた。したがって, *Awat2* がマイボーム腺におけるタイプ 2 ω WdiE 産生を担うことが明らかになった。

続いて, MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって野生型および各 KO マウスマイボーム脂質中のタイプ 2 α WdiE を測定した。野生型マウスのタイプ 2 α WdiE のうち, C16:1 FA をもち, 残りのジオール–FA エステル部分の鎖長, 不飽和度の合計が C38:1–C44:1 である分子種が主要であった (図 7C, 7D, 表 4)。*Awat1* KO マウスのタイプ 2 α WdiE 組成は野生型と同様であったが, *Awat2* KO マウスでは増加しており, *Awat1 Awat2* DKO マウスではさらに増加していた (図 7C, 7D, 表 4)。*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスでは WE やタイプ 2 ω WdiE が消失あるいは大幅に減少と脂質代謝の流れの大きな変化があり, その影響で増加したのではないかと考察される。

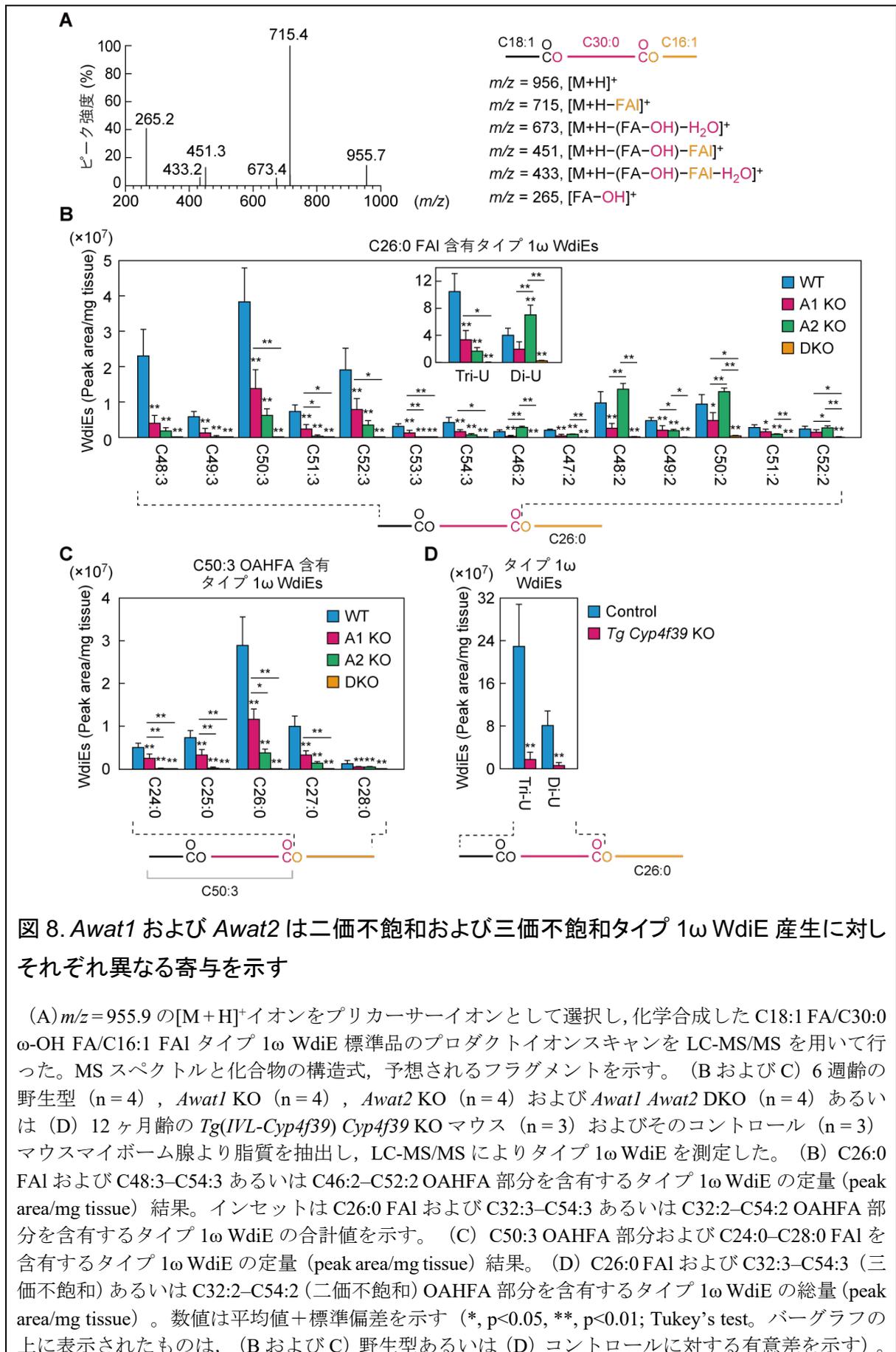
これらの結果より, *Awat1* および *Awat2* はいずれもタイプ 2 α WdiE 産生に関与しないことが明らかになった。

3.1.6. *Awat1* および *Awat2* は二価不飽和および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE 産生に対しそれぞれ異なる寄与を示す

タイプ 1 ω WdiE は FA, ω -OHFA, FAI から成るジエステルである。タイプ 1 ω WdiE については MRM モードによる LC-MS/MS 解析および標準品を用いてピークの同定を行った報告がなかったため, 本研究において標準品 (C18:1 FA/C30:0 ω -OHFA/C16:1 FAI) を化学合成し, ピークの同定を行った。本標準品のプロダクトイオンスキャンを行ったところ, $[M+H-FAI]^+$ と一致する特徴的なプロダクトイオンが検出された (図 8A)。この結果を基に, $[M+H-FAI]^+$ をプロダクトイオンに設定した MRM モードの測定メソッドを作成し, LC-MS/MS を用いてタイプ 1 ω WdiE を測定した。

野生型マウスマイバム脂質中のタイプ 1 ω WdiE は C26:0 FAI, 残りの OAHFA 部分の鎖長の合計が C46–C54, 不飽和度の合計が二価あるいは三価不飽和のものが主要であった (図 8B, 8C, 表 5)。三価不飽和 OAHFA をもつ分子種の総量は二価不飽和の 2.6 倍程度であった (図 8B)。*Awat2* KO マウスにおいては三価不飽和タイプ 1 ω WdiE が大幅に減少しており, *Awat1* KO マウスにおいても減少していた (総量: *Awat2* KO において野生型の 16.2%, *Awat1* KO において野生型の 32.2%)。*Awat1 Awat2* DKO マウスにおいては全ての三価不飽和分子種が消失していた。したがって, *Awat1* および *Awat2* はどちらも三価不飽和タイプ 1 ω WdiE 産生に関与し, 特に *Awat2* の寄与が高いことが明らかになった。しかしながら, 二価不飽和に関しては *Awat1* KO マウスにおいて有意な差ではないものの野生型の 49.5% に減少していたのに対し, *Awat2* KO マウスにおいては野生型よりもわずかに増加していた。*Awat1 Awat2* DKO マウスにおいては三価不飽和と同様, 二価不飽和分子種もほとんど消失していた (野生型の 5.4%)。これらの結果より, *Awat1* および *Awat2* は二価不飽和および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE 産生に対しそれぞれ異なる寄与を示すことが明らかになった。

OAHFA, Chl-OAHFA およびタイプ 2 ω WdiE と同様, タイプ 1 ω WdiE も ω -OH 脂質であり, *Cyp4f39* が産生を担うと考えられた。そこで, 本研究において確立した測定法を用い, 当研究室で保有する *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウス (表皮以外で *Cyp4f39* を KO したマウス¹⁷⁾) についてもマイバム脂質中のタイプ 1 ω WdiE を測定した。三価および二価不飽和どちらのタイプ 1 ω WdiE についてもコントロールに比べて大幅に減少しており (図 8D, 表 6), *Cyp4f39* がタイプ 1 ω WdiE 産生を担うことが示された。



タイプ 1 ω WdiE の構造の模式図および測定した分子種の OAHFA あるいは FAI 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE の定量結果を表 5, *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウスおよびそのコントロールマウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE の定量結果を表 6 にそれぞれ示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。Tri-U, 三価不飽和; Di-U, 二価不飽和。

3.1.7. *Awat1* および *Awat2* はどちらも三価不飽和 OAHFA 産生に関与する

三価不飽和タイプ 1 ω WdiE が一価不飽和 FA と二価不飽和 ω -OH FA を有するのか、あるいは二価不飽和 FA と一価不飽和 ω -OH FA を有するのかは不明であった。そこで、野生型マウスマイバム脂質中の C76:3 タイプ 1 ω WdiE (C50:3 OAHFA 部分と C26:0 FAI をもつタイプ 1 ω WdiE に該当) のプロダクトイオンスキャンを行った。その結果、C16:1 FA に該当するフラグメントイオンと C34:2 ω -OH FA に該当するフラグメントイオンが検出された (図 9A)。

これまでに二価不飽和 ω -OH FA を含有する三価不飽和 OAHFA の存在は報告されていなかったため、野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイバム脂質中の C16:1 FA および二価不飽和 ω -OH FA を含む三価不飽和 OAHFA を測定した。野生型マウスマイバム脂質中には C32:2–C36:2 ω -OH FA 含有三価不飽和 OAHFA が豊富に存在しており、C34:2 ω -OH FA 含有 OAHFA が最も主要であった (図 9B, 表 2)。C34:2 ω -OH FA 含有 OAHFA 量は今まで最も主要な OAHFA であると考えられていた C34:1 ω -OH FA 含有 OAHFA 量の 3 倍程度あり、マウスマイバム脂質中で最も主要な OAHFA 分子種であることが明らかになった。*Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスではすべての主要な二価不飽和 (C30:2–C36:2) ω -OH FA 含有分子種において減少しており、総量では *Awat1* KO で野生型の 1/4 程度, *Awat2* KO で 1/3 程度, *Awat1 Awat2* DKO で 1/8 程度に減少していた。一方、C34:1 ω -OH FA 含有 OAHFA については *Awat1* KO および *Awat1 Awat2* DKO のみで減少しており、*Awat2* KO では減少していなかった。このことから、一価不飽和 ω -OH FA を有する二価不飽和 OAHFA については *Awat1* が主に産生を担う一方、二価不飽和 ω -OH FA を有する三価不飽和 OAHFA については *Awat1* および *Awat2* どちらも産生を担うことが示唆される。

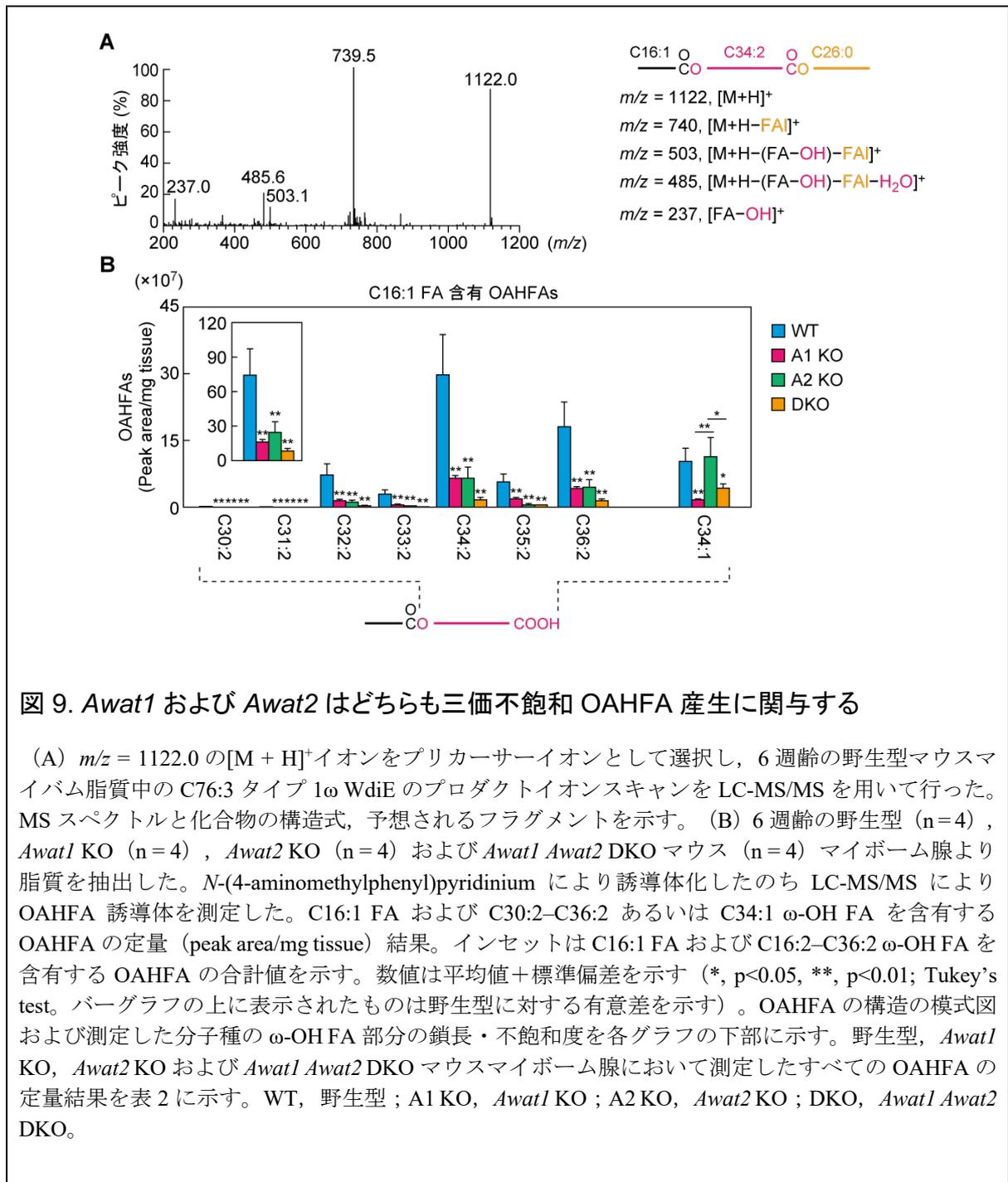


図 9. *Awat1* および *Awat2* はどちらも三価不飽和 OAHFA 産生に関与する

(A) $m/z = 1122.0$ の $[M+H]^+$ イオンをプリカーサーイオンとして選択し、6週齢の野生型マウスマイバム脂質中の C76:3 タイプ 1 ω WdiE のプロダクトイオンスキャンを LC-MS/MS を用いて行った。MS スペクトルと化合物の構造式、予想されるフラグメントを示す。(B) 6週齢の野生型 ($n=4$)、*Awat1* KO ($n=4$)、*Awat2* KO ($n=4$) および *Awat1 Awat2* DKO マウス ($n=4$) マイバム腺より脂質を抽出した。*N*-(4-aminomethylphenyl)pyridinium により誘導体化したのち LC-MS/MS により OAHFA 誘導体を測定した。C16:1 FA および C30:2–C36:2 あるいは C34:1 ω -OH FA を含有する OAHFA の定量 (peak area/mg tissue) 結果。インセットは C16:1 FA および C16:2–C36:2 ω -OH FA を含有する OAHFA の合計値を示す。数値は平均値+標準偏差を示す (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$; Tukey's test。バーグラフの上に表示されたものは野生型に対する有意差を示す)。OAHFA の構造の模式図および測定した分子種の ω -OH FA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイバム腺において測定したすべての OAHFA の定量結果を表 2 に示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。

3.1.8. *Awat1* および *Awat2* は Chl-OAHFA 産生に対し主要には関与しない

Chl-OAHFA は Chl と OAHFA のエステルである。両者をつなぐエステル結合を形成するアシルトランスフェラーゼは未だ同定されていないため、*Awat1* と *Awat2* の Chl-OAHFA 産生に対する寄与を調べた。Chl-OAHFA についても MRM モードによる LC-MS/MS 解析によってピークの同定を行った報告がなかったため、本研究におい

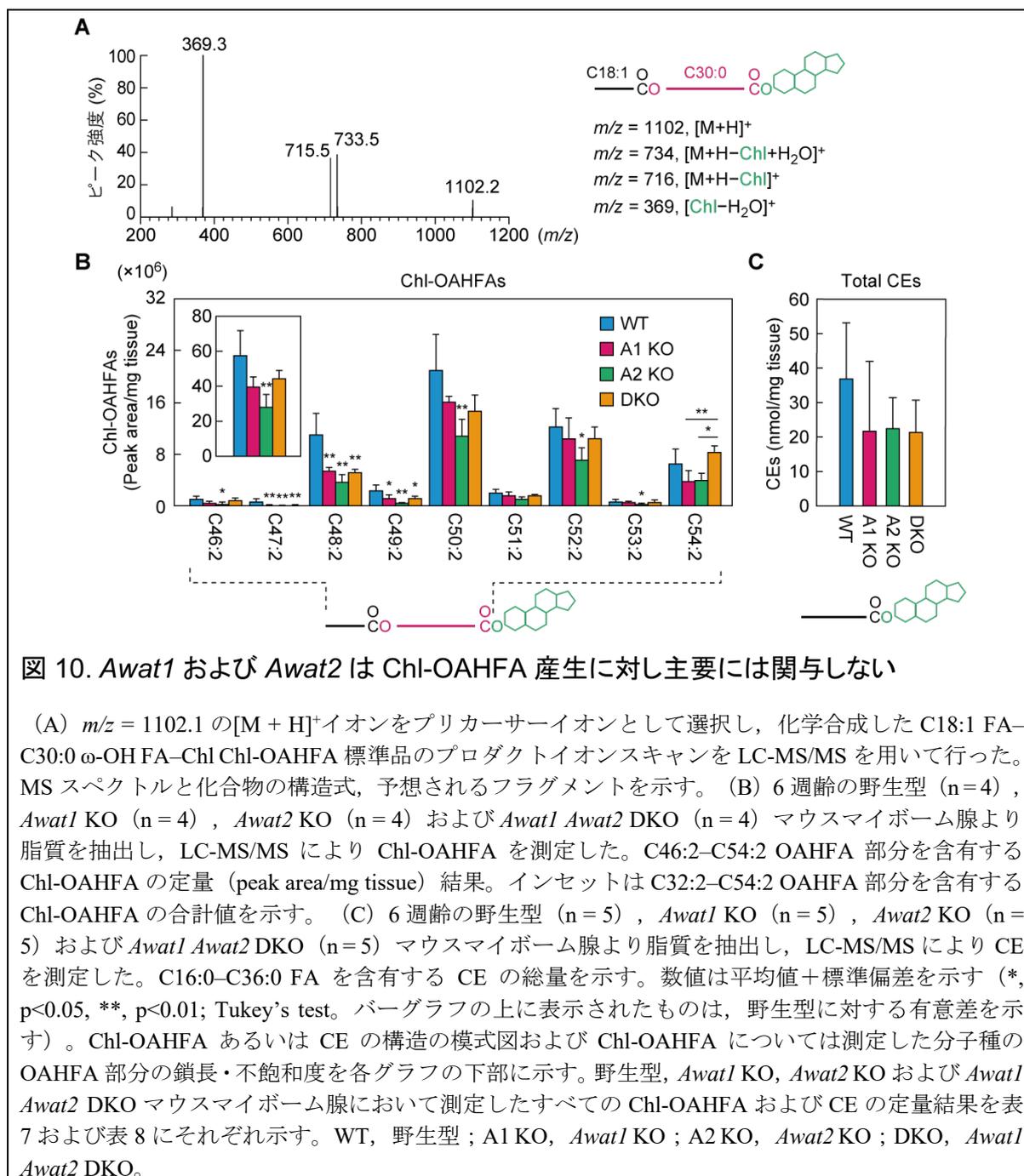


図 10. *Awat1* および *Awat2* は Chl-OAHFA 産生に対し主要には関与しない

(A) $m/z = 1102.1$ の $[M+H]^+$ イオンをプリカーサーイオンとして選択し、化学合成した C18:1 FA-C30:0 ω -OH FA-Chl Chl-OAHFA 標準品のプロダクトイオンスキャンを LC-MS/MS を用いて行った。MS スペクトルと化合物の構造式、予想されるフラグメントを示す。(B) 6 週齢の野生型 ($n=4$)、*Awat1* KO ($n=4$)、*Awat2* KO ($n=4$) および *Awat1 Awat2* DKO ($n=4$) マウスマイボーム腺より脂質を抽出し、LC-MS/MS により Chl-OAHFA を測定した。C46:2-C54:2 OAHFA 部分を含む Chl-OAHFA の定量 (peak area/mg tissue) 結果。インセットは C32:2-C54:2 OAHFA 部分を含む Chl-OAHFA の合計値を示す。(C) 6 週齢の野生型 ($n=5$)、*Awat1* KO ($n=5$)、*Awat2* KO ($n=5$) および *Awat1 Awat2* DKO ($n=5$) マウスマイボーム腺より脂質を抽出し、LC-MS/MS により CE を測定した。C16:0-C36:0 FA を含む CE の総量を示す。数値は平均値+標準偏差を示す (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$; Tukey's test。バーグラフの上に表示されたものは、野生型に対する有意差を示す)。Chl-OAHFA あるいは CE の構造の模式図および Chl-OAHFA については測定した分子種の OAHFA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。野生型、*Awat1* KO、*Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての Chl-OAHFA および CE の定量結果を表 7 および表 8 にそれぞれ示す。WT, 野生型; A1 KO, *Awat1* KO; A2 KO, *Awat2* KO; DKO, *Awat1 Awat2* DKO。

て標準品 (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/Chl) を化学合成し、ピークの同定を行った。本標準品のプロダクトイオンスキャンを行ったところ、 $[\text{Chl}-H_2O]^+$ と一致する特徴的なプロダクトイオンが検出された (図 10A)。この結果を基に、 $[\text{Chl}-H_2O]^+$ をプロダクトイオンに設定した MRM モードのメソッドを作成し、LC-MS/MS を用いて Chl-OAHFA を測定した。

野生型マウスマイバム脂質中の Chl-OAHFA は鎖長 C46-C54、二価不飽和の OAHFA をもつ分子種が多く、C50:2 が最も豊富であった (図 10B, 表 7)。マイバム脂質中 OAHFA の組成と照らし合わせると (図 6)、C16:1 FA と C34:1 ω -OH FA の組み合わせ

せである可能性が高い。*Awat1* KO および *Awat2* KO マウスでは、いくつかの Chl-OAHFA 分子種が減少していた (図 10B, 表 7)。総量では *Awat1* KO マウスで野生型の 69%まで減少していたが、有意な差ではなかった。一方、*Awat2* KO マウスでは野生型の 49%にまで有意に減少していた。*Awat1 Awat2* DKO マウスにおいてもいくつかの分子種が減少していたが、各単独 KO マウスに比べてより減少することはなく、C54:2 に関しては各単独 KO マウスに比べて増加していた。総量についても野生型の 77%まで減少していたものの、有意な差ではなかった。これらの結果より、*Awat1* および *Awat2* は Chl-OAHFA 産生に対し部分的に関与するものの、別の主要な産生経路が存在することが示唆される。CE についても測定したが、野生型、各 KO マウス間で有意な差はなかった (図 10C, 表 8)。

3.2. ヒト涙液脂質組成解析

3.2.1. ヒト涙液中 WE 組成

フェノールレッド錦糸を用いて採取したヒト涙液中の WE を MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって測定した。ヒトマイバム中 WE は C18:1 FA を含有するものが最も多く、次いで C16:1 FA を含有するものが多いとの報告¹⁸⁾を参考にし、FA 側については C18:1 と C16:1 に絞り、FAI 側については様々な鎖長・不飽和度のものを測定した。報告通り、FAI の鎖長にかかわらず C18:1 FA を含むものは C16:1 FA を含むものの 2-7 倍程度であった (図 11A, 11B, 表 9)。FAI については一価不飽和よりも飽和の方が多く、総量で 4 倍程度の差があった (図 11A, 11B, 表 9)。飽和 FAI の中には C26:0 が最も多く、その周辺の C24:0-C28:0 が主要であった (図 11A, 表 9)。

3.2.2. ヒト涙液中 OAHFA 組成

ヒト涙液中の OAHFA を MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって測定した。FA 側は C18:1 と C16:1 に絞って様々な鎖長の ω -OHFA をもつ分子種を測定した。 ω -OHFA の鎖長や不飽和度にかかわらず、C18:1 FA をもつものが C16:1 FA をもつものより 3-12 倍程度多かった (図 12A, 12B, 表 10)。C18:1 FA をもつ OAHFA に関しては二価不飽和 ω -OH FA よりも一価不飽和 ω -OH FA を含むものの方が総量で 10 倍程度多かった (図 12A, 12B, 表 10)。一価不飽和 ω -OH FA の中で最も多かったのは C32:1 であり、次いで C30:1 が多かった (図 12A, 表 10)。

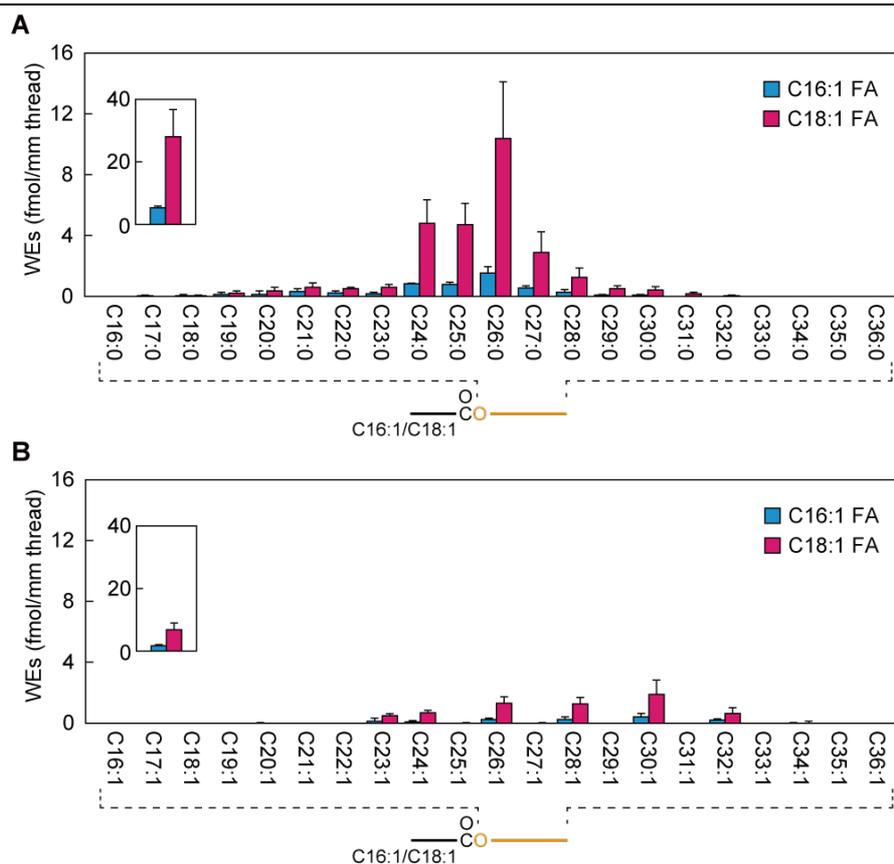


図 11. ヒト涙液中 WE 組成

フェノールレッド錦糸により採取したヒト涙液 (n=3) より脂質を抽出し、LC-MS/MS により WE を測定した。C16:1 あるいは C18:1 FA および (A) C16:0–C36:0 FAI あるいは (B) C16:1–C36:1 FAI を含有する WE の定量結果。インセットはそれぞれの総量を示す。数値は平均値+標準偏差を示す。WE の構造の模式図および測定した分子種の FAI 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。ヒト涙液において測定したすべての WE の定量結果は表 9 に示す。

3.2.3. ヒト涙液中タイプ 2 ω WdiE 組成

ヒト涙液中タイプ 2 ω あるいは 2 α WdiE を MRM モードによる LC-MS/MS 解析によって測定した。初めに FA 側を C18:1 と C16:1 に絞って様々な鎖長のジオール-FA エステル部分をもつタイプ 2 ω WdiE 分子種を測定した。タイプ 2 ω WdiE については C18:1 FA 含有, C16:1 FA 含有両方が検出され, ジオール-FA エステル部分の鎖長に関わらず, C18:1 FA 含有の方が C16:1 FA 含有の 2–7 倍程度多かった (図 13A–D, 表 11)。ジオール-FA エステル部分の不飽和度は二価不飽和であるものが最も多く, 次いで一価不飽和, 三価不飽和の順になり, 飽和はわずかであった。二価不飽和ジオール-FA エステルのうち最も多かったのは C50:2 と C48:2 であった (図 13C, 表 11)。この結果をもとに, C50:2 ジオール-FA エステルをもつ分子種の FA 側のバリエーションについて調べた。C18:1 FA をもつものが最も多く, 次いで C16:1 FA がその 1/3

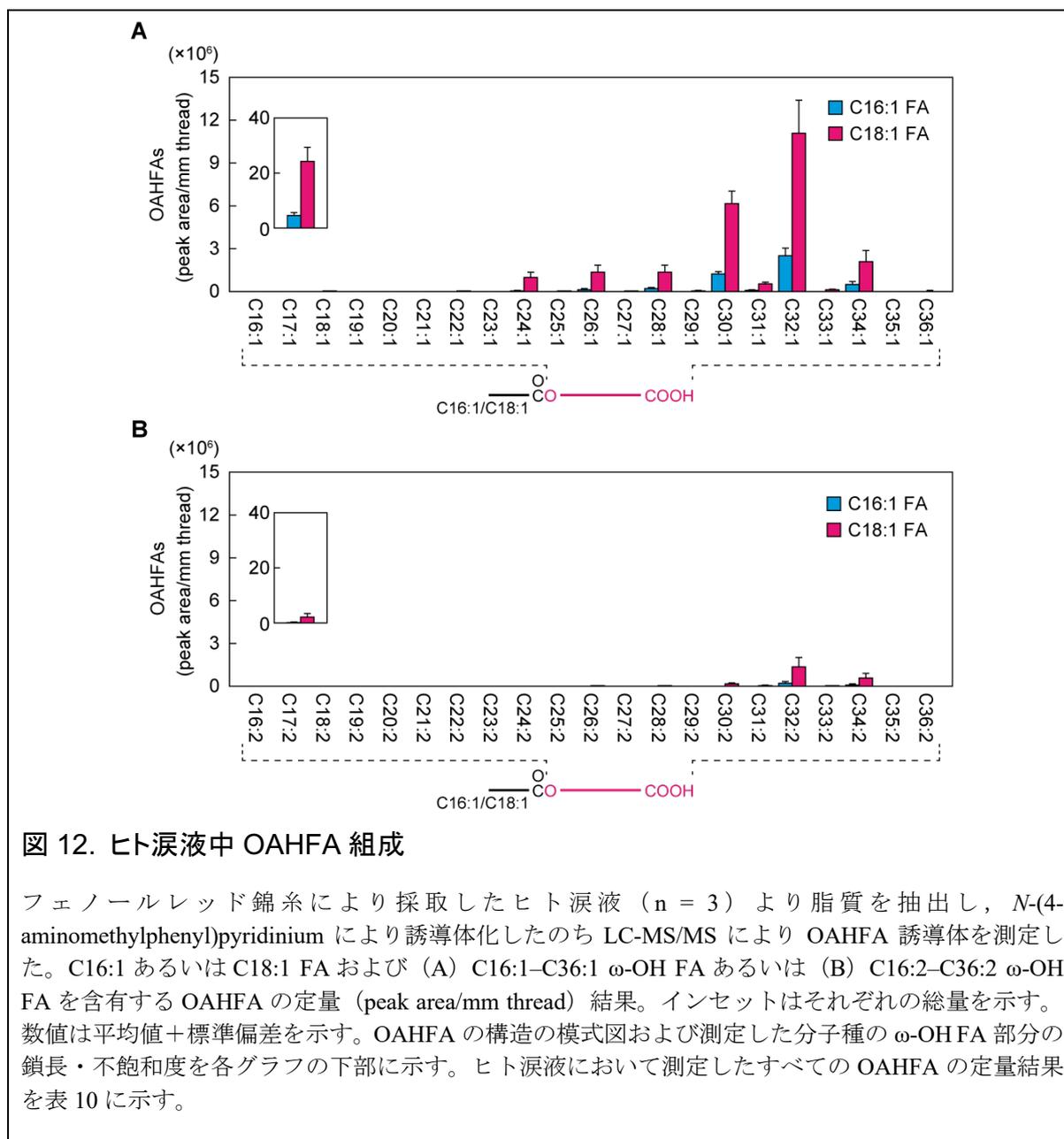


図 12. ヒト涙液中 OAHFA 組成

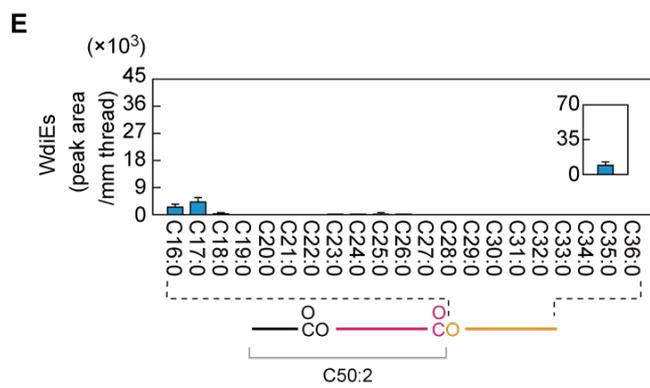
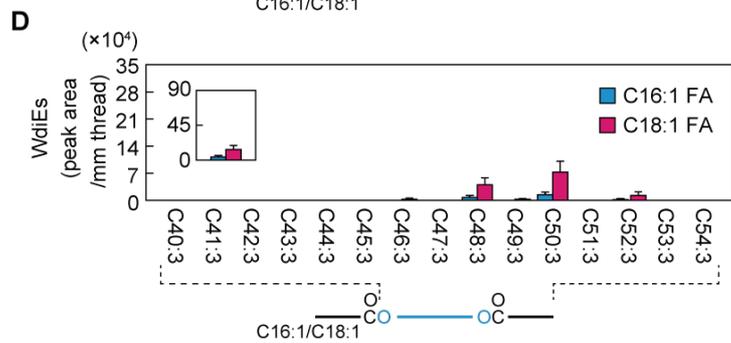
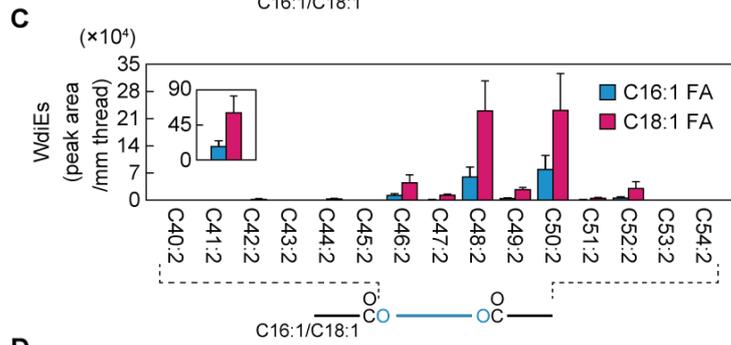
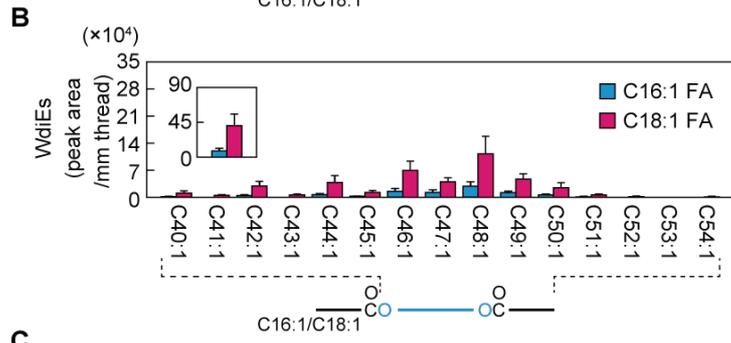
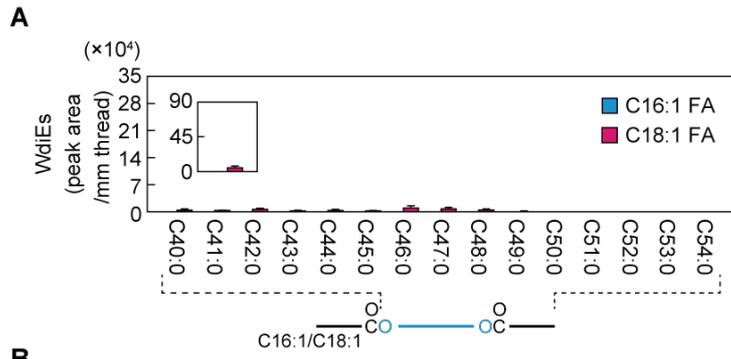
フェノールレッド錦糸により採取したヒト涙液 ($n = 3$) より脂質を抽出し、*N*-(4-aminomethylphenyl)pyridinium により誘導体化したのち LC-MS/MS により OAHFA 誘導体を測定した。C16:1 あるいは C18:1 FA および (A) C16:1–C36:1 ω -OH FA あるいは (B) C16:2–C36:2 ω -OH FA を含有する OAHFA の定量 (peak area/mm thread) 結果。インセットはそれぞれの総量を示す。数値は平均値+標準偏差を示す。OAHFA の構造の模式図および測定した分子種の ω -OH FA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。ヒト涙液において測定したすべての OAHFA の定量結果を表 10 に示す。

程度であり、C17:0, C16:0, C17:1 といった FA をもつものも検出されたが、それより長い鎖長についてはほとんど検出されなかった (図 13E, 13F, 表 11)。

タイプ 2 α WdiE については測定したすべての分子種において検出限界以下であった (表 12)。

3.2.4. ヒト涙液中タイプ 1 ω WdiE 組成

ヒト涙液中タイプ 1 ω WdiE を LC-MS/MS と MRM 法を用いて測定した。初めに FAI を C26:0 に絞って様々な OAHFA 部分をもつ分子種を測定した。OAHFA 部分の不飽和度が二価不飽和である分子種が最も多く、次いで一価不飽和 (総量で二価不



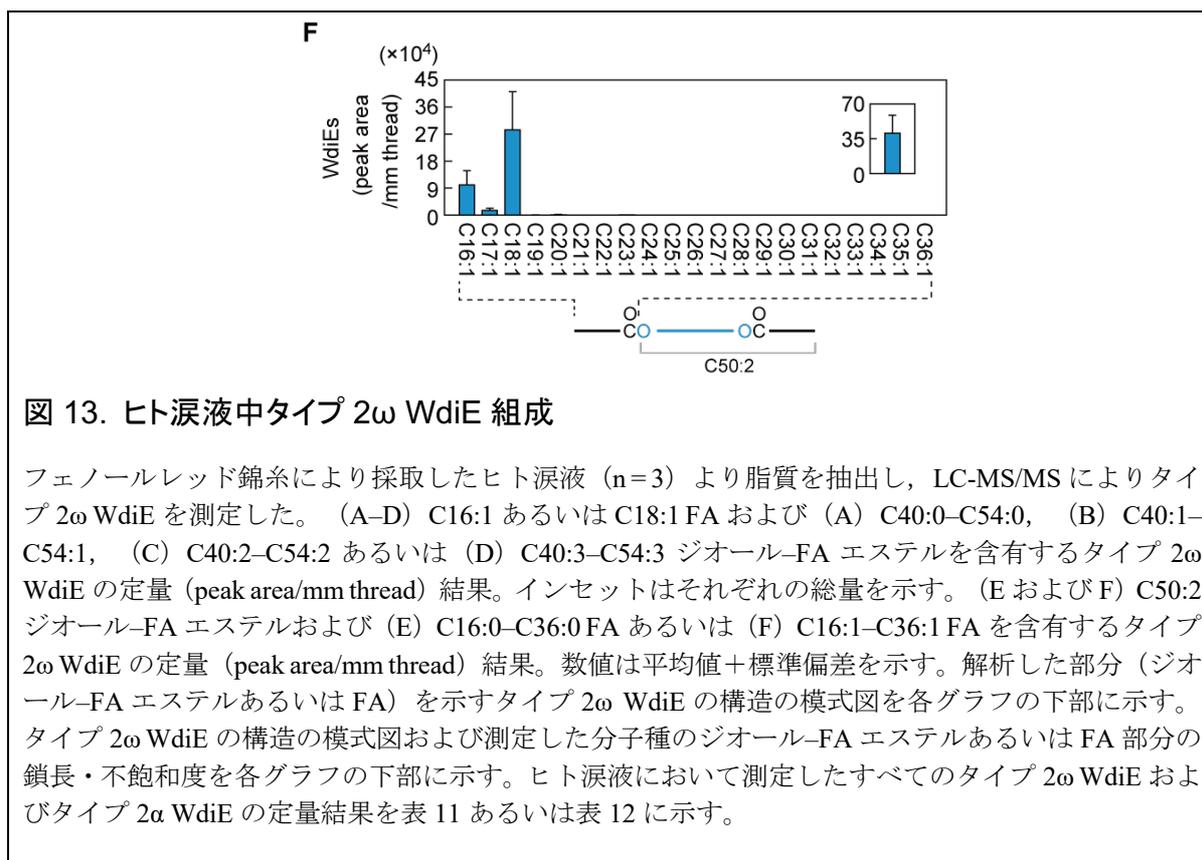


図 13. ヒト涙液中タイプ 2ω WdiE 組成

フェノールレッド錦糸により採取したヒト涙液 (n=3) より脂質を抽出し, LC-MS/MS によりタイプ 2ω WdiE を測定した。(A-D) C16:1 あるいは C18:1 FA および (A) C40:0-C54:0, (B) C40:1-C54:1, (C) C40:2-C54:2 あるいは (D) C40:3-C54:3 ジオール-FA エステルを含有するタイプ 2ω WdiE の定量 (peak area/mm thread) 結果。インセットはそれぞれの総量を示す。(E および F) C50:2 ジオール-FA エステルおよび (E) C16:0-C36:0 FA あるいは (F) C16:1-C36:1 FA を含有するタイプ 2ω WdiE の定量 (peak area/mm thread) 結果。数値は平均値+標準偏差を示す。解析した部分 (ジオール-FA エステルあるいは FA) を示すタイプ 2ω WdiE の構造の模式図を各グラフの下部に示す。タイプ 2ω WdiE の構造の模式図および測定した分子種のジオール-FA エステルあるいは FA 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 2ω WdiE およびタイプ 2α WdiE の定量結果を表 11 あるいは表 12 に示す。

飽和の 2/3 程度), 三価不飽和 (総量で二価不飽和の 1/10 程度) となり飽和は検出されなかった (図 14A-C, 表 13)。二価不飽和 OAHFA 部分の中で最も多かったのは C50:2 と C48:2 であった (図 14B, 表 10)。C50:2 OAHFA 部分をもつ分子種の FAI 側の鎖長を様々変えて測定すると, 飽和, 一価不飽和ともに C16-C28 の幅広い鎖長の FAI をもつ分子種が検出された (図 14D, 14E, 表 13)。総量で比較すると飽和 FAI が一価不飽和 FAI の 2 倍程度であった。飽和 FAI の中で最も多かったのは C26:0 であったが, C16:0 もそれと同程度に主要であった。

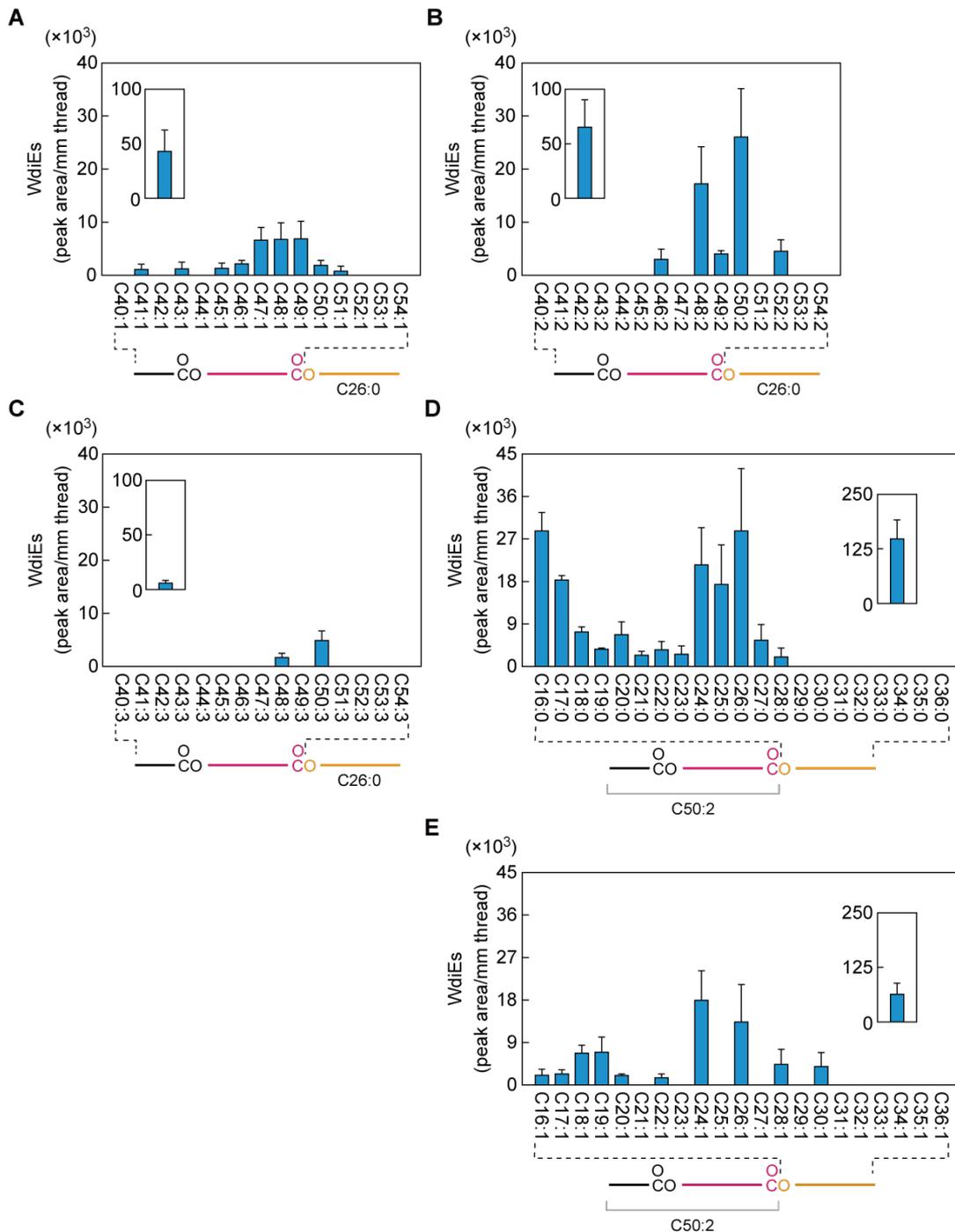


図 14. ヒト涙液中タイプ 1 ω WdiE 組成

フェノールレッド錦糸により採取したヒト涙液 (n=3) より脂質を抽出し、LC-MS/MS によりタイプ 1 ω WdiE を測定した。(A–C) C26:0 FAI および (A) C40:1–C54:1, (B) C40:2–C54:2 あるいは (C) C40:3–C54:3 OAHFA 部分を含有するタイプ 2 ω WdiE の定量 (peak area/mm thread) 結果。インセットはそれぞれの総量を示す。(D および E) C50:2 OAHFA 部分および (D) C16:0–C36:0 あるいは (E) C16:1–C36:1 FAI を含有するタイプ 1 ω WdiE の定量 (peak area/mm thread) 結果。数値は平均値+標準偏差を示す。タイプ 1 ω WdiE の構造の模式図および測定した分子種の OAHFA あるいは FAI 部分の鎖長・不飽和度を各グラフの下部に示す。ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE の定量結果を表 13 に示す。

4. 考察

4.1. マイバム脂質のドライアイ防止における役割

本研究において、*Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺中のエステル結合含有マイバム脂質はタイプ 2 α WdiE を除いてそれぞれ特徴的に減少していた。*Awat1* KO マウスでは二価不飽和および三価不飽和 OAHFA (それぞれ一価不飽和あるいは二価不飽和 ω -OHFA 含有) と三価不飽和タイプ 1 ω WdiE が大きく減少しており, 二価不飽和タイプ 1 ω WdiE も 50%程度減少していた (図 6, 8, 9, 表 2, 5)。 *Awat2* KO マウスでは WE が消失しており, 三価不飽和 OAHFA, タイプ 2 ω WdiE および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE が大きく減少していた (図 5, 7, 8, 9, 表 1-3, 5)。さらに, *Awat1 Awat2* DKO マウスでは WE および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE が消失しており, C16:1 FA 含有二価不飽和および三価不飽和 OAHFA, タイプ 2 ω WdiE および二価不飽和タイプ 1 ω WdiE が大きく減少していた (図 5, 6, 7, 8, 9, 表 1-3, 5)。

Awat2 KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスはマイバムの固化などの激しい MGD 表現型を示していた (図 3, 4) ことから, マイバム脂質中の WE および WdiE 類が油層の機能に重要であることが示唆される。このうち WE は CE とならんで最も主要なマイバム脂質クラスであるため, WE の消失が特に大きな影響を及ぼしていると考えられる。WE と CE はマイバム脂質の中でも最も疎水性の高い脂質クラスであり, 特に水層からの水分蒸散防止に大きく寄与していると考えられている。それに加えて, 本研究では新たな WE の役割としてマイバムの融点調節を提唱する。CE の融点は WE の融点よりも著しく高い。例えば, C18:1 FA と C18:1 FAI から成る WE の融点が -4°C であるのに対し, C18:1 FA 含有 CE の融点は 46.5°C である^{32,33)}。したがって, CE 単体では体温で固体であり, マイボーム腺から分泌されることは不可能となる。しかし, CE と WE の混合物は角膜表面温度 (32°C) に近い融点を示す¹⁾。実際に, 野生型マウスマイバムの融点が 34°C と角膜表面温度付近の融点を示すのに対し, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイバムの融点はそれぞれ 62°C および 57°C と大幅に上昇していた (図 3D)。したがって, WE はマイバムの融点を角膜表面温度付近に保つのに必須であると考えられる。

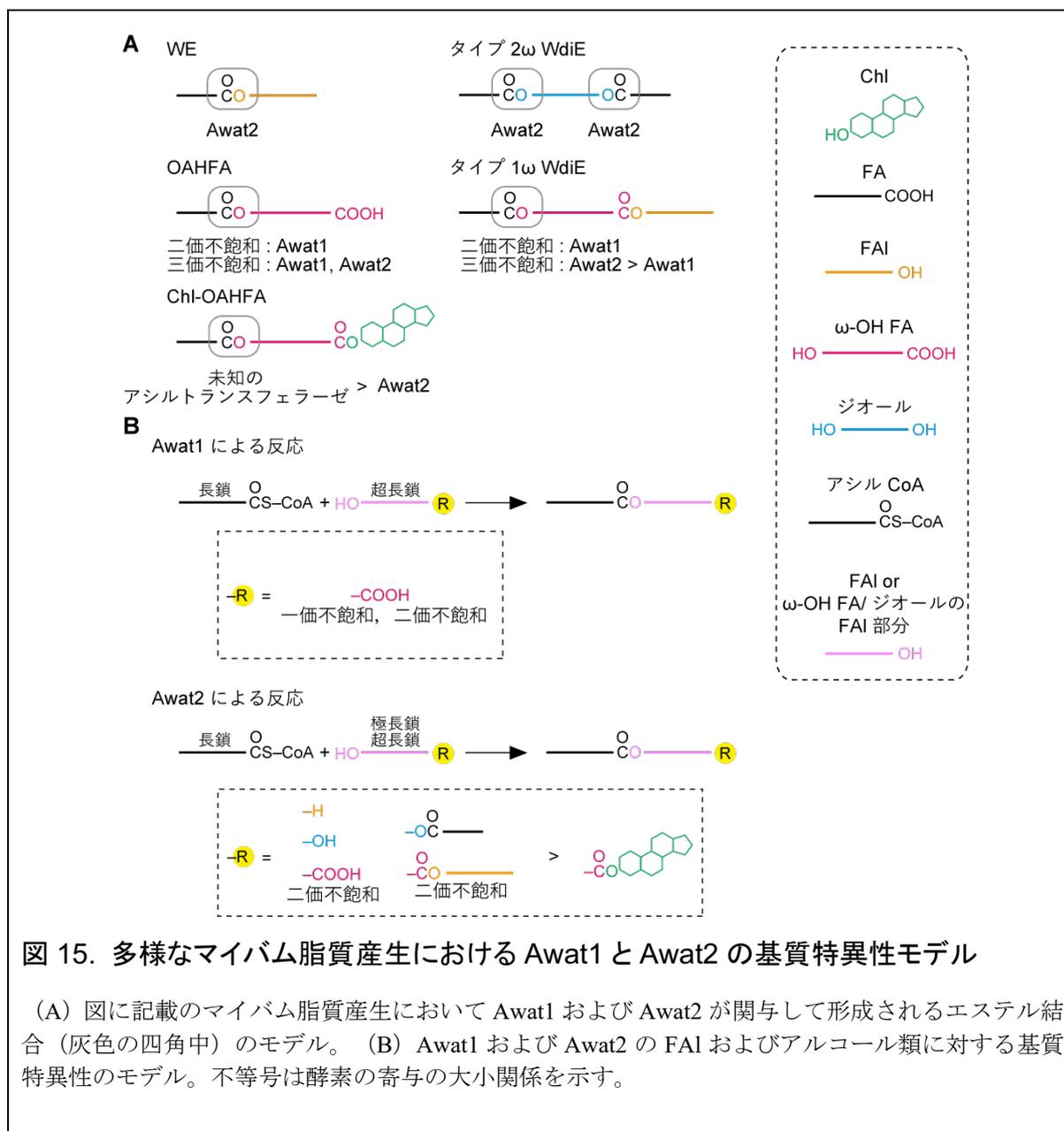
Awat1 KO マウスは弱い MGD 表現型を示した (図 3, 4)。 *Awat1* KO マウスでは OAHFA とタイプ 1 ω WdiE の減少によって油層の脂質極性勾配の形成が一部損なわれていると推察される。 *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウスでは, すべての ω -OH 脂質 (OAHFA, タイプ 1 ω WdiE, タイプ 2 ω WdiE および Chl-OAHFA) が大きく減少していた (図 8D)¹⁷⁾。ドライアイ表現型の強さは強い順に *Awat2* KO マウス \approx *Awat1 Awat2* DKO マウス $>$ *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウス $>$ *Awat1* KO マウスであった。

Awat1 KO マウスに比べて *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウスの方が表現型が強かったのは、OAHFA, タイプ 1 ω WdiE に加えてタイプ 2 ω WdiE および Chl-OAHFA も減少しており、油層の脂質極性勾配の形成がさらに損なわれているためだと考えられる。

4.2. マウス *Awat1* および *Awat2* の基質特異性

Awat1 KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスのマイバム脂質組成変化をもとに、*Awat1* および *Awat2* の基質特異性についてのモデルを提唱する (図 15)。 *Awat2* KO マウスマイバム脂質中の WE は消失していた (図 5, 表 1)。マウスマイバム脂質中 WE は C16:1 あるいは C18:1 FA と C24:0–C30:0 FAI を含有するものが主要であった。したがって、*Awat2* は長鎖アシル CoA と極長鎖/超長鎖 FAI を基質とし、エステル結合形成を触媒すると考えられる (図 15A, 15B)。マウスマイバム脂質中 WE には極長鎖/超長鎖 FA がほとんど存在していなかった (図 5, 表 1) ことから、*Awat2* のアシル CoA 側の基質特異性は長鎖, 特に C16–C18 に強いと考えられる (図 15B)。

Awat1 KO マウスマイバム脂質中の OAHFA は二価不飽和, 三価不飽和ともに大きく減少しており, *Awat2* KO マウスマイバム脂質中では二価不飽和 OAHFA が大きく減少していた (図 6, 9B, 表 2)。マウスマイバム脂質中 OAHFA は C16–C18 FA と C30–C36 ω -OHFA を含有するものが主要であった (図 6B, 9B, 表 2)。したがって, *Awat1* および *Awat2* は長鎖アシル CoA と超長鎖 ω -OHFA を基質とし, エステル結合形成を触媒すると考えられる (図 15A, 15B)。マウスマイバム脂質中 OAHFA には極長鎖/超長鎖 FA がほとんど存在していなかった (図 6, 表 2) ことから, *Awat2* と同様 *Awat1* についてもアシル CoA 側の基質特異性は長鎖, 特に C16–C18 に強いと考えられる (図 15B)。また, *Awat1* KO マウスにおいて二価不飽和, 三価不飽和いずれの OAHFA も減少していたのに対し, *Awat2* KO マウスでは二価不飽和のみが減少していた (図 6A, 9B, 表 2)。このことから, *Awat1* が一価不飽和, 二価不飽和いずれの ω -OHFA も基質として用いるのに対し, *Awat2* は二価不飽和の ω -OHFA のみを基質として用いると推測される (図 15A, 15B)。マウスマイバム脂質中には C16:1, C18:1 および C18:2 FA を有する OAHFA が存在していた (図 6B, 表 2)。 *Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39* KO マウスでは C16:1 FA 含有 OAHFA が大きく減少していたものの, C18:1 および C18:2 FA 含有 OAHFA については減少していなかった¹⁷⁾。 *Cyp4f39* は FA ω 位水酸化反応を担う唯一の酵素であることから, C18:1 および C18:2 FA 含有 OAHFA は *IVL* プロモーター下でレスキューされた *Cyp4f39*, すなわち表皮や導管上皮細胞由来であると考えられる。 *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスにおいて増加していた C16:0, C18:0, C18:1 および C18:2 FA 含有 OAHFA は表皮や導管上皮



細胞由来であり、*Awat2* KO の影響によりこれらの細胞における OAHFA 産生が代償的に促進されたと考えられる。

Awat2 KO マウスマイバム脂質中のタイプ 2ω WdiE は大きく減少していた(図 7A, 7B, 表 3)。マウスマイバム脂質中タイプ 2ω WdiE は C16:1 あるいは C18:1 FA と C50:2 あるいは C48:2 ジオール-FA エステルを含有するものが主要であった。タイプ 2ω WdiE は 2 つのエステル結合を有するため、Awat2 はどちらかあるいは両方のエステル結合形成に関与しうる。C50:2 ジオール-FA エステルは C34:1 ジオールと C16:1 FA から成る可能性が高いため、C16:1 FA を基質として好む Awat2 が両方のエステル結合形成を担う可能性が高いと考えられる(図 15A, 15B)。その場合、Awat2 はヒ

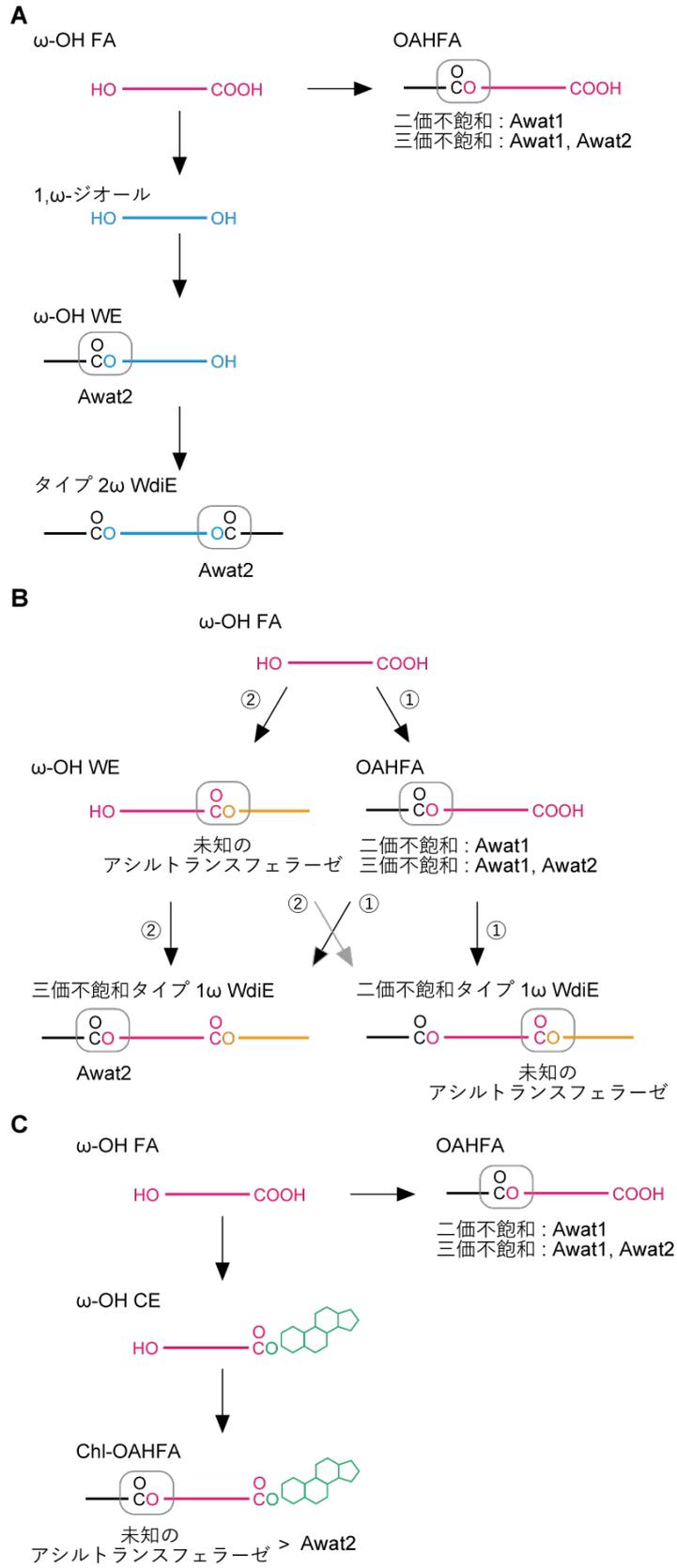


図 16. タイプ 2 ω WdiE, タイプ 1 ω WdiE および Chl-OAHFA 産生経路モデル

(A-C) (A) タイプ 2 ω WdiE, (B) タイプ 1 ω WdiE および (C) Chl-OAHFA の予想産生経路。Awat1 および Awat2 あるいは未知のアシルトランスフェラーゼが関与して形成されるエステル結合は灰色の四角で囲まれている。矢印横の数字は①OAHFA が産生されてから FAI が結合する経路, ② ω -OHFA に先に FAI が結合し, 最後にアシル化される経路中の反応をそれぞれ示す。灰色の矢印は寄与が小さい反応であることを示す。

ドロキシ基の逆側の末端にヒドロキシ基あるいはヒドロキシ基に FA がエステル結合したアルコールを基質として使用できることになる。また, OAHFA が減少していた *Awat1* KO マウスにおいてタイプ 2 ω WdiE が減少していなかったことから, タイプ 2 ω WdiE は OAHFA を介さずに産生される, すなわち先に 1 ω -ジオールが生じてから 2 回のアシル基転移反応を経て産生されると考えられる (図 16A)。

Awat1 KO マウスマイバム脂質中のタイプ 1 ω WdiE は二価, 三価不飽和どちらも大きく減少しており, *Awat2* KO マウスマイバム脂質中においても三価不飽和のタイプ 1 ω WdiE が *Awat1* KO マウス以上に大きく減少していた (図 8B, 表 5)。三価不飽和タイプ 1 ω WdiE は一価不飽和 FA と二価不飽和 ω -OH FA, 飽和 FAI から成るものが主要, つまり OAHFA 部分としては一価不飽和 FA と二価不飽和 ω -OH FA から成る三価のものが主要であることが明らかになった (図 9A, 9B, 表 2)。二価不飽和タイプ 1 ω WdiE の OAHFA 部分についても C50:2 や C48:2 が多く (図 8B, 表 5), 一価不飽和 FA と一価不飽和 ω -OH FA から成る二価不飽和 OAHFA の鎖長分布と類似していた (図 6A, 表 2)。また, 二価不飽和および三価不飽和いずれについても OAHFA とタイプ 1 ω WdiE の KO マウスにおける増減パターンが一致していた (図 8B, 9B, 表 2, 5)。このことから, タイプ 1 ω WdiE 産生経路には OAHFA が産生されてから FAI が結合する経路が存在すると考えられる (図 16B; 経路①)。一方, 当研究室で所持している FAI 合成酵素遺伝子 *Far2* KO マウスでは, 二価不飽和および三価不飽和タイプ 1 ω WdiE がほぼ消失していたのに対し, OAHFA については二価不飽和のみが有意に増加していた (大塚, 未発表データ)。*Far2* KO マウスでは FAI が合成されないため, それと結合できなくなった OAHFA が蓄積することが予想される。しかし, 増加していたのは二価不飽和 OAHFA のみであった。このことは, 特に三価不飽和タイプ 1 ω WdiE については OAHFA を介さない経路, すなわち ω -OHFA に先に FAI が結合し, 最後にアシル化される経路 (図 16B; 経路②) も存在する可能性がある。タイプ 1 ω WdiE はこれら 2 種類の経路によって複合的に産生されており, その中でも二価不飽和は経路①によって産生される方が主要であると考えられる。また, タイプ 1 ω WdiE は FA- ω -OHFA 間および ω -OHFA-FAI 間の 2 種類のエステル結合を有するが, *Awat1* および *Awat2* が長鎖アシル CoA に基質特異性を示すことから, *Awat1* お

よび *Awat2* は前者のエステル結合形成を担うと考えられる (図 15A, 15B)。すなわち, *Awat1* および *Awat2* は経路①において長鎖アシル CoA と超長鎖 ω -OH FA 間のエステル結合を形成し, OAHFA を産生することでタイプ 1 ω WdiE 産生に寄与するのであろう。また, *Awat2* はタイプ 2 ω WdiE 産生において嵩高いエステル体も基質とすることが予想されており, 経路②において長鎖アシル CoA と超長鎖 ω -OH FA-極長鎖 FAI エステル間のエステル結合形成によってタイプ 1 ω WdiE を直接産生することも可能であると考えられる (図 15, 16B)。超長鎖 ω -OH FA と極長鎖 FAI 間のエステル結合については *Awat1* および *Awat2* 以外の未知の酵素によって形成されることが推察される (図 16B)。

Awat2 KO マウスマイバム脂質中の Chl-OAHFA は減少していたものの, *Awat1* *Awat2* DKO マウスマイバム脂質中においては減少していなかった (図 10B, 表 7)。*Awat1* と *Awat2* の基質特異性を考慮すると, *Awat1* および *Awat2* は長鎖 FA と超長鎖 ω -OH FA の間のエステル結合形成を一部担うと考えられる。また, OAHFA が減少していた *Awat1* KO マウスにおいてほとんどの Chl-OAHFA が減少していなかったことから, 大部分の Chl-OAHFA は OAHFA を介さずに産生される, すなわち先に Chl と ω -OH FA が結合し, その後に FA が結合すると考えられる (図 16C)。*Awat2* はこの最後のアシル基転移反応においてヒドロキシ基の逆側の末端がカルボキシル基-Chl エステルであるアルコールを基質として使用できるものの, 末端の Chl によって基質認識が減弱しているものと推察される (図 15B)。

AWAT1 と AWAT2 はジアシルグリセロール *O*-アシルトランスフェラーゼ DGAT2 ファミリーに属する。哺乳類の DGAT2 ファミリーには 7 つのメンバー (DGAT2, AWAT1, AWAT2, DGAT2L6, MOGAT1-3) が存在し, すべて小胞体に局在する³⁰⁾³⁴⁾。このうち DGAT2 と DGAT2L6 についてはジアシルグリセロールと長鎖アシル CoA を基質としてトリアシルグリセロールを合成する活性を有する。MOGAT1-3 はモノアシルグリセロールと長鎖アシル CoA を基質としてジアシルグリセロールを合成する。したがって, 長鎖アシル CoA は DGAT2 ファミリーに共通する基質であり, 逆にアルコール側の基質特異性はメンバー間で異なっている (AWATs : 種々のアルコール ; DGATs : ジアシルグリセロール ; MOGATs : モノアシルグリセロール)。これらのいずれのメンバーについても結晶構造解析は行われておらず, 詳細な三次元構造は明らかになっていない。アラインメント解析によると, DGAT2 ファミリータンパク質は 2 回膜貫通型タンパク質であり, AWAT1 と AWAT2 も同様の膜トポロジーを示すと予想されている³⁵⁾。*Awat1* と *Awat2* に三次元構造の違いを生み出す要因は明らかになっていないが, 図 15B の基質特異性を考慮すると, *Awat1* が作る疎水性ポケットは狭く, 末端にカルボン酸をもつアルコール, すなわち ω -OH FA しか受

け入れないのに対し，Awat2 が作る疎水性ポケットは広く，2 本鎖エステルを含めた様々なアルコール類を基質として受け入れられると推察される。

以上の考察はあくまで KO マウスの脂質組成変化を基にして行ったものであり，Awat1 および Awat2 の活性について実験的に証明するためには *in vitro* の実験が必要になる。しかし，マイバム脂質を合成する反応に用いられる多くの基質が市販されておらず，現状入手が困難である。また，仮に入手できたとしても極長鎖の基質は水溶性が低く，*in vitro* の活性測定は不可能であることが多い。そのため，今後，遊離の FAI や ω -OH FA，ジオール，FA-ジオールのエステルおよび ω -OH FA-FAI のエステルといったマイバム脂質の前駆体，合成中間体を探索し，KO マウスにおける増減を網羅的に調べていくことで，マイバム脂質産生における Awat の関わりや産生経路を推察できるかもしれない。

4.3. ヒト AWAT1 および AWAT2 の基質特異性

AWAT1 および AWAT2 は哺乳類にのみ存在する。ヒト/マウス間で AWAT1 および AWAT2 はそれぞれ次のような高い相同性を示す：AWAT1: Identity 81.7%，Similarity 89.6%；AWAT2：Identity 84.4%，Similarity 94.0%³⁵⁾。したがって，ヒト/マウス間で AWAT の基質特異性は概ね保存されている可能性が高い。

ヒト涙液中 WE，OAHFA，タイプ 1 ω および 2 ω WdiE は C18:1 FA および C16:1 FA を含むものが主要であり，C18:1 FA 含有の方がより豊富であった（図 11-16，表 9-13）。マウスではこれらの脂質クラスの含有 FA は C16:1 が主要であった（図 5-8，表 1-3，5）ことから，ヒト/マウス AWAT で得意とする基質がそれぞれ C18:1/C16:1 である可能性が考えられる。

ヒト涙液中 WE の FAI については一価不飽和よりも飽和の方が多く，C26:0 が最も主要であった（図 11，表 9）。この FAI 組成はマウスとよく似ていた（図 5A，表 1）。また，ヒト涙液中タイプ 2 ω WdiE のジオール-FA エステル部分の不飽和度は二価不飽和であるものが最も多く，次いで一価不飽和，三価不飽和の順になり，飽和はわずかであった（図 13，表 11）。二価不飽和ジオール-FA エステルのうち最も多かったのは C50:2 と C48:2 であり，この特徴もマウスとよく似ていた（図 7A，13，表 3，11）。これらの結果より，AWAT2 のアルコール側の基質特異性はヒト/マウスで類似している可能性が考えられる。

ヒト涙液中 OAHFA に含有される ω -OH FA の中で最も多かったのは C32:1 であり，次いで C30:1 が多かった（図 12A，表 10）。このように，ヒトでは二価不飽和 OAHFA が主要であった。マウスでは C34:2 を筆頭とした二価不飽和 ω -OH FA をもつ三価不飽和 OAHFA が最も多く（図 9B，表 2），ヒトとマウス間で主要な OAHFA の不飽和

度が異なることが明らかになった。このことから、ヒト AWAT2 は OAHFA 産生に対して主要には関与しない可能性が考えられる。一方、C30 以上の ω -OH FA が大多数を占めるという点はヒトとマウスで共通していた。したがって、AWAT1 のアルコール側の基質特異性はヒト/マウスで類似している可能性が考えられる。

ヒト涙液中タイプ 1 ω WdiE は OAHFA 部分の不飽和度が二価不飽和である分子種が最も多く、次いで一価不飽和、三価不飽和となり飽和は検出されなかった (図 14A-C, 表 13)。この結果は、三価不飽和が最も多く、次いで二価不飽和が多かったマウスの組成と大きく異なっており (図 8B, 表 4), 三価不飽和よりも二価不飽和の方が主要であった OAHFA の結果と類似していた (図 12A, 表 10)。二価不飽和 OAHFA 部分の中で最も多かったのは C50:2 と C48:2 であり (図 14B, 表 13), OAHFA の主要分子種と合致していた (図 12A, 表 10) ことから、AWAT1 によって産生された OAHFA を介するタイプ 1 ω WdiE 産生経路がヒトにも存在する可能性が考えられる。一方、三価不飽和 OAHFA 部分をもつタイプ 1 ω WdiE がヒトには少なかったことから、AWAT2 の寄与についてはヒトでは小さい可能性が考えられる。FAI 側については C16-C28 の幅広い鎖長の FAI をもつ分子種が検出された (図 14D, 15E, 表 13)。この組成は WE 中の FAI 組成と大きく異なる (図 11, 表 10) ことから、タイプ 1 ω WdiE 産生における ω -OH FA と FAI 間のエステル結合形成にも AWAT2 は関与しないと考えられる。

WE や OAHFA, WdiE を構成する FA はヒトとマウス間で異なっており、OAHFA やタイプ 1 ω WdiE については不飽和度の点で違いがあった。そのため AWAT1 や AWAT2 の関与についてもヒトとマウスで全く同じとは言い難い。一方、その他の組成の特徴はヒトとマウス間でよく似ていたため、組成の違いにも考慮した上で使用するのであれば *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスは MGD のモデル動物として有用であると考えられる。

4.4. MGD 新規治療薬開発にむけて

油層は水層からの水分蒸散防止、涙液への適度な粘弾性の付与、涙液の表面張力の低下、瞬目時の涙液層の再構成促進といった多数の役割を果たす^{1,7-9)}。油層は上記すべての役割を満たすため、疎水性、粘弾性、水層上での再進展性、角膜表面温度付近の融点といった特徴をすべて有する必要がある。このような絶妙な物性の獲得を可能にするため、マイバム脂質は多くの脂質クラス、幅広い鎖長の分子種によって複雑に構成される必要があると考えられる。逆に言えば、一部脂質クラスのわずかな増減や鎖長の変化だけでも油層の機能が損なわれる可能性がある。そのため、MGD の治療を目指す際には脂質組成変化およびその原因を正確に把握し、過不足なくマイバム脂

質組成を正常に近づける努力が必要となるであろう。本研究において確立したヒト涙液脂質組成解析法は MGD 病態の分子機構解明や診断の際に有用であると考えられる。

マイバム脂質の質や量を改善する治療薬は長年上市されていなかった。最近、当研究室とライオン株式会社との共同研究により、*Elovl1* を表皮以外の組織で KO したマウスのドライアイ表現型をミネラルオイル入り点眼薬が改善することが報告された³⁶⁾。このマウスではマイボーム腺開口部の閉塞とそれに伴うマイボーム腺内部の脂質凝集がみられていたが、ミネラルオイルの点眼によって開口部の閉塞および腺内部の脂質凝集が緩和された。この理由について、当報告ではミネラルオイルが開口部の塞栓を溶解し、マイバム分泌が促されたのではないかと考察していた。このミネラルオイル入り点眼薬は第3類医薬品「スマイルうるおいタイム®」として発売されており、薬局や薬店で購入できるようになっている。マイバム改善薬の第一号が実際に上市されたことで、今後 MGD 治療の研究が注目され、ますます発展していくことが期待される。

5. 材料と方法

5.1. マウス

Awat1 KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスは CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。*Awat1* 遺伝子のエキソン 3 および *Awat2* 遺伝子のエキソン 5 の PAM (Protospacer Adjacent Motif) 配列に隣接する 20 塩基のガイド RNA 標的配列をそれぞれ設定した。Cas9 タンパク質による切断の標的となるように、各ガイド RNA 標的配列を含むプライマーペア (*Awat1*, *Awat1-F1/R1*; *Awat2*, *Awat2-F1/R1*) (表 14) を設計し、アニーリングさせたものを、ガイド RNA と Cas9 タンパク質を共発現させる CRISPR/Cas9 ベクターである pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene, Watertown, MA, USA) の *BbsI* サイトにそれぞれクローニングした。*Awat1* 遺伝子および *Awat2* 遺伝子は互いに X 染色体上の 0.2 Mb 以内の近傍に位置することから、各単独 KO マウスの交配によって *Awat1 Awat2* DKO マウスを得るのは困難であった。そのため、これら 2 つのプラスミドを C57BL/6J マウスの受精卵に同時に注入することで、同一染色体上で 2 つあるいは 1 つの遺伝子を欠損させることとした。産仔の尾からゲノム DNA を抽出し、*Awat1* 遺伝子のエキソン 3 および *Awat2* 遺伝子のエキソン 5 の標的配列周辺を増幅する各プライマーペア (表 14) を用いて PCR を行い、増幅断片のシーケンス解析を行った。その結果、*Awat1* 遺伝子の 11 塩基が欠失した個体、*Awat2* 遺伝子の 12 塩基が欠失した個体、*Awat1* 遺伝子の 1 塩基および *Awat2* 遺伝子の 4 塩基が欠失した個体がそれぞれ得られた。これらのマウスを C57BL/6J マウスとそれぞれ交配し、*Awat1* ヘテロ (Het) , *Awat2* Het および *Awat1 Awat2* 二重 Het マウス系統を確立した。*Awat1* 遺伝子および *Awat2* 遺伝子は X 染色体上にあるため、Het マウスはメスのみが得られる。したがって、各 KO マウスは対応する Het メスマウスと C57BL/6J オスマウスを交配することで作製した。マウスのジェノタイプピングはマウスの尾から抽出したゲノム DNA、野生型配列および KO 配列にそれぞれ特異的なプライマーペア (表 14) を用い、PCR による増幅によって確定させた。全ての解析においてオスの KO マウス、あるいはコントロールとして同腹のオスの野生型マウスを用いた。

Tg(IVL-Cyp4f39) Cyp4f39 KO マウスの作製については当研究室の以前の報告に記載されている¹⁷⁾。全身で *Cyp4f39* を KO したマウスは皮膚バリア異常によって新生致死となるため、表皮および上皮においてインボルクリン (*IVL*) プロモーター制御下で *Cyp4f39* を発現する本マウスを実験に用いた。

マウスの飼育は、SPF 環境下、室温 23±1° C ; 湿度 50±5% , 12 時間毎に明/暗サイクルを繰り返す条件で行った。通常食 (PicoLab Rodent Diet 20; LabDiet, St. Louis,

MO) の摂餌と給水は自由に行える状態で行った。動物実験はすべて、北海道大学動物実験委員会の規定に従って行った。

5.2. 定量的リアルタイム PCR

マイボーム腺は、実体顕微鏡 (Stemi DV4; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 下でマウス上部および下部眼瞼より摘出した。総 RNA は NucleoSpin RNA Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて精製し、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA へと変換した。リアルタイム定量的 RT-PCR はプライマーペア (Awat1-F4/-R4, Awat2-F4/-R4, Far1-F/-R, Far2-F/-R, Soat1-F/-R, Cyp4f39-F/-R, and Hprt-F/-R) (表 14) と One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara Bio) を用いて行った。

5.3. ドライアイ表現型の評価

マウスドライアイ表現型の評価として瞬目回数計数、涙液量測定、眼表面からの水分蒸散量測定、BUT、角膜障害評価および角膜不整評価を行った。涙液量測定はペントバルビタール (0.05 mg/g 体重; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) 腹腔内投与、水分蒸散量測定、BUT、角膜障害評価および角膜不整評価はイソフルラン (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) による麻酔下で行った。

瞬目回数の計数は左手でマウスを保定し、顔面の右側をデジタルカメラで 1 分間撮影、動画中の瞬目回数を目視で計数することで行った。涙液量測定は添付のマニュアルに従い、フェノールレッド錦糸法 (Zone-Quick, AYUMI Pharmaceutical Corporation, Tokyo, Japan) を用いて行った。水分蒸散量測定は水分蒸散計 (AS-VT100RS, Asahi Biomed, Yokohama, Japan) をマウス右目を覆うように密着させて測定した。

BUT 測定の手順は以下の通りである。0.5% (w/v) フルオレセインナトリウム (Tokyo Chemical Industry あるいは FUJIFILM Wako Pure Chemical) 生理食塩水溶液 1 μ L をマウス右目に点眼し、眼表面全体を溶液が覆うように手動で速やかに瞬目させた。眼表面を細隙灯顕微鏡 (SL-17, Kowa, Nagoya, Japan, あるいは Luneau Technology Operations, Pont-de-l' Arche, France) とコバルトブルーフィルターを用いて観察し、フルオレセイン溶液が一様に広がってから割れや穴が出現するまでの時間を測定した。

BUT 測定に続き、角膜障害の評価を行った。生理食塩水で眼球を洗い、余分なフルオレセイン溶液を取り除いた。眼表面の染色像を細隙灯顕微鏡とコバルトブルーフィルターを用いて観察し、眼表面を上・中・下の 3 つの区画に分け、それぞれの区画において 0 から 3 までのスコアで染色の度合いを評価した。スコア評価の基準は次の

通りである。0, ほとんど染色なし; 1, 面積として $<1/3$ に染色あり; 2, 面積として $1/3$ から $<2/3$ に染色あり; 3, 面積として $>2/3$ に染色あり^{17) 37)}。

角膜不整評価は以下のように行った。リング状光源 (LED Lumiloupe, Elaice, Tokyo, Japan) をマウス角膜表面に当て、反射光の乱れを細隙灯顕微鏡を用いて観察し、0 から 5 までのスコア評価を行った。スコア評価は次の基準に従って行った。0, 不整なし; 1, リングの $1/4$ で不整; 2, リングの半分で不整; 3, リングの $3/4$ で不整; 4, リング全体で不整; 5, リングと識別できないほどの不整。

5.4. マイバムの融点測定

マイボーム腺はマウス上眼瞼より実体顕微鏡下で回収し、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。融点測定機 (ATM-02, AS ONE Corporation, Osaka, Japan) の熱板状に解凍したマイボーム腺を載せ、実体顕微鏡下でピンセットにより圧をかけ、開口部よりマイバムを絞り出した。マイボーム腺を取り除き、室温から 70°C まで $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速さで熱板の温度を上昇させ、マイバムが融解する様子を実体顕微鏡下で観察した。マイバムがオイル状に完全融解した温度を融点とした。

5.5. ヘマトキシリン/エオジン染色

マウス上眼瞼を Super Fix (Kurabo, Osaka, Japan) に漬け、 4°C 、24 時間以上で固定した。固定した上眼瞼をメタノールで脱水したのちキシレンで洗浄し、密閉式自動固定包埋装置 (Tissue-Tek VIP-6; Sakura, Torrance, CA) を使用してパラフィンを浸透させた。これをパラフィンプロック包埋装置 (TEC-P-DC; Sakura) によってブロック化した。パラフィンプロックをミクロトーム REM-710 (Yamato Kohki, Asaka, Japan) を用いて切断し、 $4\ \mu\text{m}$ の切片を作製した。切片は自動染色装置 (Tissue-Tek DRS 2000; Sakura) を使用してキシレンとエタノールで脱パラフィン処理、水洗の後ヘマトキシリン/エオジン溶液で染色し、再度キシレンとエタノールで脱水した。染色後の切片は Leica DM5000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて明視野観察を行い、DFC295 digital color camera で撮影した。

5.6. タイプ 1ω WdiE および ChI-OAHFA の化学合成

OAHFA (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA) の合成は以下の手順で行った。30-hydroxytriacontanoic acid (ω -OH C30:0 FA; 1.0 mg, $2.1\ \mu\text{mol}$; Nagara Science, Gifu, Japan) をテトラヒドロフラン (THF) $500\ \mu\text{L}$ 、ヘキサン $500\ \mu\text{L}$ で溶解し、氷上でトリエチルアミン ($1.3\ \mu\text{L}$, $9.2\ \mu\text{mol}$; Nacalai tesque, Kyoto, Japan) と oleoyl chloride ($2.3\ \mu\text{L}$, $6.9\ \mu\text{mol}$; FUJIFILM Wako Pure Chemical) を加えた後、室温で 24 時間攪拌し、4-ジメチ

ルアミノピリジン (1 mg, 8.2 μmol ; FUJIFILM Wako Pure Chemical), トリエチルアミン (1.3 μL , 9.2 μmol), oleoyl chloride (2.3 μL , 6.9 μmol) を加えた後, 室温で 24 時間攪拌し, octadec-10-enoic-30-(octadec-10-enoyloxy)-triacontanoic anhydride を得た。反応液を 15 mm Syringe Filter (Corning, New York, NY) に通して塩を除去した後, 飽和重曹水 20 μL を加え, 室温で 6 時間攪拌し, sodium 30-(octadec-10-enoyloxy)-triacontanoate を作成した。ナトリウム塩に対して 1 M 塩酸を pH < 3 となるまで滴下し, 30-(octadec-10-enoyloxy)-triacontanoic acid を作製した。THF 150 μL , ヘキサン 150 μL を加え, 攪拌した後, 室温, 20,400 \times g で 3 分間遠心し, 有機層の回収と乾固を行い, THF 500 μL で再度溶解して OAHFA 標準品とした。

タイプ 1 ω WdiE (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/C16:1 FAI) は以下の手順で合成した。OAHFA 標準品 50 μL に THF 350 μL を加え, 氷上にて塩化オキサリル (10 μL , 0.12 mmol; Tokyo Chemical Industry), *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.5 μL , 6.5 μmol ; Nacal Tesque) を加えて室温で 10 時間攪拌し, 30-(octadec-10-enoyloxy)-triacontanyl chloride を作製した。反応液に 4-ジメチルアミノピリジン (1 mg, 8.2 μmol), トリエチルアミン (1 μL , 7.3 μmol), palmitoleyl alcohol (20 μL , 70.6 μmol ; Merck, Darmstadt, Germany) を加え室温で一晩攪拌を行いタイプ 1 ω WdiE (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/C16:1 FAI) を合成し, これを標準品とした。

Chl-OAHFA (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/Chl) は以下の手順で合成した。OAHFA 標準品 150 μL を使用して上記と同様の手順で 30-(octadec-10-enoyloxy)triacontanyl chloride を作製した。反応液に 4-ジメチルアミノピリジン (1 mg, 8.2 μmol), トリエチルアミン (1 μL , 7.3 μmol), コレステロール (1.5 mg, 2.59 μmol ; Merck) を加え室温で一晩攪拌を行い Chl-OAHFA (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/Chl) を合成し, これを標準品とした。

5.7. LC-MS/MS による脂質解析

マウスマイボーム腺は実体顕微鏡下でマウス上下眼瞼より摘出した。マイボーム腺 (2.4–15.6 mg) をクロロホルム/メタノール (1:2, v/v) 600 μL に懸濁し, ガラスホモジェナイザーで破碎した。上清を回収し, 再度マイボーム腺の入ったホモジェナイザーにクロロホルム/メタノール (1:2, v/v) 600 μL を入れ, 破碎し, 上清を回収した。回収した上清をあわせ, クロロホルム 400 μL , 水 720 μL を加えて混和し, 遠心 (9000 \times g, 室温, 3 分) により二層分配した。有機層を回収しドライアップした。この脂質サンプルを脂質クラス毎に次のように調製した。〈WE と CE〉脂質サンプルをクロロホルム/メタノール (1:2, v/v) に溶解し, マイボーム腺 1 mg 分の脂質サンプルを high-performance 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート (Glass HPTLC Silica gel 60

plates; Merck) と展開液ヘキサン／トルエン (1:1) を用いて分離した。プレート上の WEs と CEs を含む画分をかきとり、エタノール 300 μL を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。遠心 (20400 \times g, 室温, 3 分) し、上清を回収後、残渣にさらにエタノール 300 μL を加えて混和した。これをまた遠心 (20400 \times g, 室温, 3 分) した上清を先程の上清とあわせ、ドライアップした。ヘキサン 200 μL に溶解後、10%メタノール水溶液 200 μL を加えて混和し、遠心 (20400 \times g, 室温, 3 分) により二層分配した。有機層を回収しドライアップした。〈WdiE と Chl-OAHFA〉脂質サンプルをヘキサンに溶解し、マイボーム腺 0.1 mg 分を新しいチューブへ移し、さらにヘキサンを加えて 200 μL とした。水 200 μL を加えて混和し、遠心 (20400 \times g, 室温, 3 分) により二層分配後、有機層を回収した。水層にヘキサン 200 μL を加えて再度二層分配し、有機層を回収して先程回収したものとあわせ、ドライアップした。〈OAHFA〉上記 WdiE 同様の抽出操作後、AMP⁺ MaxSpec Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いて以下のように AMPP 誘導体化を行った³⁸⁾。抽出後の脂質サンプルにアセトニトリル／ジメチルホルムアミド (4:1, v/v) 5 μL , EDC 5 μL , HOBt 2.5 μL , AMP⁺ 7.5 μL を加え、60°C で 30 分反応させたのち、アセトニトリルを加えて 100 μL とした。

ヒト涙液はフェノールレッド錦糸 (Zone-Quick, AYUMI Pharmaceutical Corporation) を用いて採取した。眼球と眼瞼の間に糸を挿入し、1 分間涙液を染み込ませた。涙液が染み込んで赤く変色した部分を切り取り、クロロホルム／メタノール (1:2, v/v) 600 μL に漬け、37°C で 30 分間インキュベートした。上清を回収し、クロロホルム 400 μL , 水 720 μL を加えて混和し、遠心 (9000 \times g, 室温, 3 分) により二層分配した。有機層を回収しドライアップした。ヘキサンを 200 μL 加え、水 200 μL を加えて混和し、遠心 (20400 \times g, 室温, 3 分) により二層分配後、有機層を回収、ドライアップした。

LC-MS/MS 解析は ultra-performance LC (UPLC) coupled with electrospray ionization tandem triple-quadrupole mass spectrometry (Xevo TQ-S; Waters, Milford MA) を用いて行った。脂質は 55°C にて UPLC により逆相カラム (Acquity UPLC CSH C18 column; length, 100 mm; particle size, 1.7 μm ; inner diameter, 2.1 mm; Waters) を用いて分離した。UPLC に注入したサンプル量はマイボーム腺 5 μg 分, あるいは回収した全涙液の 1/40 である。脂質の分離は、流速 0.3 mL/分にて移動層 A (アセトニトリル／水 [3:2, v/v], 5 mM ギ酸アンモニウム) と移動層 B (アセトニトリル／2-プロパノール [1:9, v/v], 5 mM ギ酸アンモニウム) の混合比を段階的に変化させて行った。グラジエントの条件は以下の通りである: 0 分, 60% B; 0–21 分, gradient to 100% B; 21–25 分, 100% B; 25–30 分, gradient to 60% B。脂質のイオン化は electrospray ionization を用いて行った。定量的解析はポジティブイオンモードにて, MRM を用いて行った。コーンボルテージは 35 V, コリジョンエネルギーは脂質クラス毎に以下のように設定した: WE,

20 eV ; OAHFA-AMPPs, 60 eV ; WdiEs, 20 eV ; Chl-OAHFAs および CEs, 15 eV。分子種毎のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z 値はそれぞれ Q1 および Q3 マスフィルターにより設定した (表 10-15)。WE および CE の定量にはそれぞれ Behenyl oleate (C18:1 FA-C22:0 FA1, Merck) および C22:0 Cholesteryl ester (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) を外部標準品として用いた。化学合成したタイプ 1 ω WdiE (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/C16:1 FA1) , Chl-OAHFA (C18:1 FA/C30:0 ω -OH FA/Chl) および マウスマイバム脂質中 C76:3 タイプ 1 ω WdiE のプロダクトイオンスキャンは以下の設定で行った。合成タイプ 1 ω WdiE のプリカーサーイオンとして $m/z = 955.9$, 合成 Chl-OAHFA のプリカーサーイオンとして $m/z = 1102.1$ および C76:3 タイプ 1 ω WdiE のプリカーサーイオンとして $m/z = 1122.0$ 。すべてコリジョンエネルギーは 15 eV。データ解析は MassLynx software (Waters) を用いて行った。

5.8. サンプリングと統計解析

瞬目数計数, 涙液量測定, 眼表面からの水分蒸散量測定, BUT, 角膜障害評価および角膜不整評価については, 技術的な問題から右目のみを用いて実験を行った。他のアッセイについては両目の区別なく行った。左右の目に測定結果の差はなかった。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。統計解析では, Student's *t*-test については Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) , Tukey's test および Tukey-Kramer test, Dunnett's test については JMP 13 (SAS Institute, Cary, NC, USA) をそれぞれ用いた。p 値が 0.05 より小さいものを有意な差とみなした。

6. 表

表 1. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての WE 分子種の定量値 (図 5 関連)

FA	FAI	WT (pmol/mg)	A1 KO (pmol/mg)	A2 KO (pmol/mg)	DKO (pmol/mg)
C16:1	C16:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C17:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C18:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C19:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C20:1	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.06	0.13 ± 0.10	0.11 ± 0.11
C16:1	C21:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C22:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C23:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C24:1	0.42 ± 0.28	0.52 ± 0.45	0.13 ± 0.12	0.13 ± 0.10
C16:1	C25:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C26:1	6.67 ± 3.94	6.25 ± 6.36	0.10 ± 0.12	0.03 ± 0.02
C16:1	C27:1	0.42 ± 0.17	0.41 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C28:1	8.37 ± 3.74	6.56 ± 6.08	0.04 ± 0.09	0.01 ± 0.02
C16:1	C29:1	0.63 ± 0.27	0.45 ± 0.46	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C30:1	26.71 ± 13.19	19.89 ± 18.23	0.04 ± 0.07	0.00 ± 0.01
C16:1	C31:1	1.82 ± 0.87	0.66 ± 0.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C32:1	54.18 ± 27.87	32.70 ± 33.74	0.20 ± 0.25	0.07 ± 0.08
C16:1	C33:1	2.70 ± 1.63	1.84 ± 2.14	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C16:1	C34:1	7.63 ± 5.05	4.34 ± 5.58	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.03
C16:1	C35:1	0.28 ± 0.28	0.25 ± 0.29	0.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00
C16:1	C36:1	0.08 ± 0.09	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C16:0	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.12	0.03 ± 0.04
C16:1	C17:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C18:0	0.07 ± 0.07	0.12 ± 0.10	0.16 ± 0.10	0.14 ± 0.12
C16:1	C19:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C20:0	0.17 ± 0.16	0.17 ± 0.16	0.25 ± 0.14	0.16 ± 0.07
C16:1	C21:0	0.18 ± 0.23	0.18 ± 0.19	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.03
C16:1	C22:0	1.51 ± 2.74	0.36 ± 0.35	0.18 ± 0.26	0.06 ± 0.06
C16:1	C23:0	1.42 ± 2.07	0.60 ± 0.55	0.17 ± 0.25	0.06 ± 0.04

C16:1	C24:0	24.01 ± 12.26	21.29 ± 14.47	0.46 ± 0.56	0.30 ± 0.18
C16:1	C25:0	32.58 ± 14.77	34.34 ± 25.50	0.17 ± 0.21	0.07 ± 0.04
C16:1	C26:0	348.86 ± 144.37	261.96 ± 222.25	1.53 ± 1.79	0.31 ± 0.24
C16:1	C27:0	146.57 ± 47.58	100.79 ± 70.35	0.43 ± 0.68	0.14 ± 0.11
C16:1	C28:0	43.95 ± 17.31	26.26 ± 20.48	0.44 ± 0.44	0.18 ± 0.16
C16:1	C29:0	19.89 ± 7.01	11.42 ± 7.95	0.10 ± 0.09	0.02 ± 0.02
C16:1	C30:0	10.73 ± 5.19	6.50 ± 6.44	0.14 ± 0.11	0.06 ± 0.05
C16:1	C31:0	6.85 ± 3.82	3.69 ± 3.58	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04
C16:1	C32:0	1.77 ± 1.43	1.12 ± 1.29	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.04
C16:1	C33:0	0.64 ± 0.39	0.47 ± 0.57	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C16:1	C34:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:0	ND	ND	ND	ND
C16:2	C26:0	0.96 ± 0.49	0.88 ± 0.67	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.04
C18:2	C26:0	7.15 ± 2.75	4.32 ± 4.09	0.09 ± 0.06	0.07 ± 0.03
C16:1	C26:0	330.65 ± 121.26	234.02 ± 212.13	1.70 ± 1.58	0.73 ± 0.47
C17:1	C26:0	7.75 ± 3.29	4.89 ± 4.23	0.07 ± 0.08	0.02 ± 0.00
C18:1	C26:0	149.93 ± 52.51	80.66 ± 64.86	1.89 ± 1.47	1.18 ± 0.80
C19:1	C26:0	0.45 ± 0.17	0.21 ± 0.17	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
C20:1	C26:0	0.63 ± 0.44	0.31 ± 0.26	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.06
C21:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C22:1	C26:0	0.14 ± 0.10	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.03	0.11 ± 0.08
C23:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C24:1	C26:0	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.18 ± 0.10	0.36 ± 0.20
C25:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C26:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C16:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C17:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C18:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C19:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C20:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C21:0	C26:0	0.28 ± 0.03	0.16 ± 0.08	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.04
C22:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C23:0	C26:0	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02

C24:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C25:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C26:0	C26:0	ND	ND	ND	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 5) 。 ND, not detected (検出限界以下) 。

表 2. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての OAHFA 分子種の定量値 (図 6 および図 9B 関連)

FA	ω -OH FA	WT ($\times 10^7$ peak area/mg)	A1 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	A2 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	DKO ($\times 10^7$ peak area/mg)
C16:1	C16:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C17:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C18:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C19:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C20:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C21:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C22:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C23:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C24:1	0.03 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
C16:1	C25:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C26:1	0.12 \pm 0.02	0.17 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C27:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C28:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C29:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C30:1	0.13 \pm 0.04	0.02 \pm 0.02	0.09 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02
C16:1	C31:1	0.08 \pm 0.06	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00
C16:1	C32:1	2.72 \pm 0.44	0.41 \pm 0.08	1.99 \pm 0.42	0.41 \pm 0.11
C16:1	C33:1	1.54 \pm 0.13	0.45 \pm 0.12	0.66 \pm 0.17	0.14 \pm 0.04
C16:1	C34:1	4.85 \pm 0.48	0.99 \pm 0.25	3.85 \pm 0.95	1.15 \pm 0.45
C16:1	C35:1	2.93 \pm 0.28	1.46 \pm 0.38	0.82 \pm 0.16	0.24 \pm 0.05
C16:1	C36:1	0.81 \pm 0.05	0.32 \pm 0.08	0.55 \pm 0.13	0.31 \pm 0.10
C16:1	C16:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C17:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C18:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C19:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C20:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C21:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C22:0	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C23:0	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00

C16:1	C24:0	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
C16:1	C25:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C26:0	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.06
C16:1	C27:0	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C28:0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.04
C16:1	C29:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C30:0	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03
C16:1	C31:0	0.08 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C32:0	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04
C16:1	C33:0	0.27 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.02
C16:1	C34:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:0	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C36:0	ND	ND	ND	ND
C16:2	C34:1	0.12 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.06	0.01 ± 0.01
C18:2	C34:1	1.34 ± 0.72	0.79 ± 0.24	7.08 ± 3.35	7.13 ± 1.22
C16:1	C34:1	3.78 ± 1.16	0.59 ± 0.26	4.12 ± 1.86	1.40 ± 0.42
C17:1	C34:1	0.18 ± 0.16	0.02 ± 0.01	0.25 ± 0.18	0.07 ± 0.04
C18:1	C34:1	2.23 ± 0.57	0.53 ± 0.08	9.56 ± 4.11	5.22 ± 1.33
C19:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C20:1	C34:1	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.25 ± 0.18	0.18 ± 0.08
C21:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C22:1	C34:1	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.06	0.07 ± 0.05
C23:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C24:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C25:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C26:1	C34:1	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.02 ± 0.02
C27:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C28:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C29:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C30:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C31:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C32:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C33:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C34:1	C34:1	ND	ND	ND	ND

C35:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C36:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C16:0	C34:1	0.43 ± 0.19	0.16 ± 0.09	2.39 ± 1.01	1.03 ± 0.25
C17:0	C34:1	0.24 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.02
C18:0	C34:1	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.01	1.18 ± 0.61	0.43 ± 0.26
C19:0	C34:1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05	0.02 ± 0.01
C20:0	C34:1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.04	0.02 ± 0.01
C21:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C22:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C23:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C24:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C25:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C26:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C27:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C28:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C29:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C30:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C31:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C32:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C33:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C34:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C35:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
C36:0	C34:1	ND	ND	ND	ND
<hr/>					
C16:1	C34:1	10.36 ± 2.92	1.76 ± 0.19	11.42 ± 4.27	4.37 ± 0.92
C16:1	C16:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C17:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C18:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C19:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C20:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C21:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C22:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C23:2	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C24:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C25:2	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.05 ± 0.02

C16:1	C26:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C27:2	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01
C16:1	C28:2	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01
C16:1	C29:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C30:2	0.20 ± 0.06	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.01
C16:1	C31:2	0.11 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01
C16:1	C32:2	7.34 ± 2.46	1.58 ± 0.26	1.22 ± 0.40	0.45 ± 0.08
C16:1	C33:2	3.02 ± 0.92	0.61 ± 0.14	0.27 ± 0.09	0.15 ± 0.02
C16:1	C34:2	29.71 ± 8.99	6.60 ± 0.54	6.59 ± 2.50	1.79 ± 0.48
C16:1	C35:2	5.78 ± 1.67	2.03 ± 0.25	0.63 ± 0.23	0.54 ± 0.07
C16:1	C36:2	18.17 ± 5.49	4.35 ± 0.35	4.59 ± 1.61	1.59 ± 0.40

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 4) 。 ND, not detected (検出限界以下) 。

表 3. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 2ω WdiE 分子種の定量値 (図 7A および 7B 関連)

FA	ジオール-FA	WT ($\times 10^7$ peak area/mg)	A1 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	A2 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	DKO ($\times 10^7$ peak area/mg)
	エステル				
C16:1	C32:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:3	0.07 \pm 0.04	0.03 \pm 0.02	0.03 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
C16:1	C35:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:3	0.23 \pm 0.14	0.16 \pm 0.05	0.17 \pm 0.05	0.23 \pm 0.11
C16:1	C37:3	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02
C16:1	C38:3	0.38 \pm 0.12	0.30 \pm 0.07	0.40 \pm 0.08	0.46 \pm 0.11
C16:1	C39:3	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02
C16:1	C40:3	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.03
C16:1	C41:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C42:3	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
C16:1	C43:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C44:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C45:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C46:3	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C47:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C48:3	0.13 \pm 0.09	0.20 \pm 0.08	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
C16:1	C49:3	0.03 \pm 0.02	0.06 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C50:3	0.53 \pm 0.15	0.70 \pm 0.27	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
C16:1	C51:3	0.05 \pm 0.02	0.08 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C52:3	0.28 \pm 0.11	0.40 \pm 0.19	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
C16:1	C53:3	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C16:1	C54:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C32:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:2	ND	ND	ND	ND

C16:1	C36:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C37:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C39:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C40:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C41:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C42:2	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C16:1	C43:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C44:2	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C45:2	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C46:2	0.36 ± 0.15	0.49 ± 0.23	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C47:2	0.16 ± 0.08	0.27 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C48:2	3.17 ± 0.99	4.59 ± 1.86	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.02
C16:1	C49:2	0.47 ± 0.20	0.82 ± 0.57	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
C16:1	C50:2	4.24 ± 1.07	5.28 ± 1.97	0.28 ± 0.13	0.26 ± 0.05
C16:1	C51:2	0.24 ± 0.09	0.47 ± 0.32	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C52:2	1.20 ± 0.42	1.27 ± 0.53	0.18 ± 0.08	0.19 ± 0.05
C16:1	C53:2	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C16:1	C54:2	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C16:1	C32:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C37:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:1	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C39:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C40:1	0.32 ± 0.14	0.35 ± 0.19	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02
C16:1	C41:1	0.08 ± 0.06	0.07 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C16:1	C42:1	0.90 ± 0.34	0.84 ± 0.35	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.01
C16:1	C43:1	0.13 ± 0.07	0.11 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C16:1	C44:1	0.77 ± 0.30	0.64 ± 0.31	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03
C16:1	C45:1	0.21 ± 0.09	0.21 ± 0.12	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C16:1	C46:1	0.87 ± 0.34	0.97 ± 0.40	0.10 ± 0.05	0.09 ± 0.01

C16:1	C47:1	0.50 ± 0.14	0.79 ± 0.32	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01
C16:1	C48:1	1.27 ± 0.38	1.76 ± 0.61	0.23 ± 0.10	0.20 ± 0.02
C16:1	C49:1	0.51 ± 0.20	0.85 ± 0.39	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
C16:1	C50:1	0.84 ± 0.30	0.99 ± 0.37	0.21 ± 0.09	0.27 ± 0.05
C16:1	C51:1	0.26 ± 0.09	0.33 ± 0.13	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01
C16:1	C52:1	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01
C16:1	C53:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C32:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C37:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:0	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C16:1	C39:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C40:0	0.10 ± 0.05	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.02
C16:1	C41:0	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01
C16:1	C42:0	0.21 ± 0.10	0.16 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.17 ± 0.03
C16:1	C43:0	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.00
C16:1	C44:0	0.12 ± 0.05	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.01
C16:1	C45:0	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C46:0	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01
C16:1	C47:0	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:1	C48:0	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02
C16:1	C49:0	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
C16:1	C50:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C51:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C52:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C53:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:0	ND	ND	ND	ND
C16:2	C50:2	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C18:2	C50:2	0.09 ± 0.07	0.09 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:1	C50:2	7.31 ± 3.20	8.06 ± 0.60	0.38 ± 0.12	0.33 ± 0.06

C17:1	C50:2	0.25 ± 0.24	0.20 ± 0.11	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C18:1	C50:2	2.62 ± 1.05	2.33 ± 0.30	0.24 ± 0.08	0.30 ± 0.08
C19:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C20:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C21:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C22:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C23:1	C50:2	0.08 ± 0.06	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C24:1	C50:2	0.03 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C25:1	C50:2	0.36 ± 0.19	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.08	0.00 ± 0.00
C26:1	C50:2	0.07 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.02
C27:1	C50:2	0.11 ± 0.07	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C28:1	C50:2	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01
C29:1	C50:2	0.13 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C30:1	C50:2	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C31:1	C50:2	0.18 ± 0.08	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C32:1	C50:2	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.00 ± 0.00
C33:1	C50:2	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C34:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C35:1	C50:2	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C36:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C16:0	C50:2	1.47 ± 0.40	1.83 ± 0.14	0.23 ± 0.08	0.33 ± 0.08
C17:0	C50:2	0.51 ± 0.15	0.56 ± 0.09	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03
C18:0	C50:2	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C19:0	C50:2	0.07 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01
C20:0	C50:2	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C21:0	C50:2	ND	ND	ND	ND
C22:0	C50:2	ND	ND	ND	ND
C23:0	C50:2	0.24 ± 0.14	0.11 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.00
C24:0	C50:2	0.39 ± 0.25	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.01
C25:0	C50:2	1.30 ± 0.43	0.47 ± 0.10	0.36 ± 0.06	0.02 ± 0.01
C26:0	C50:2	0.57 ± 0.26	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C27:0	C50:2	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.07	0.00 ± 0.00
C28:0	C50:2	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C29:0	C50:2	ND	ND	ND	ND

C30:0	C50:2	ND	ND	ND	ND
C31:0	C50:2	ND	ND	ND	ND
C32:0	C50:2	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.07	0.00 ± 0.00
C33:0	C50:2	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.64 ± 0.41	0.00 ± 0.00
C34:0	C50:2	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.09	0.00 ± 0.00
C35:0	C50:2	0.04 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.20	0.00 ± 0.00
C36:0	C50:2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.05	0.00 ± 0.00

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 4) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 4. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 2 α WdiE 分子種の定量値(図 7C および 7D 関連)

FA	ジオール-FA	WT ($\times 10^6$ peak area/mg)	A1 KO ($\times 10^6$ peak area/mg)	A2 KO ($\times 10^6$ peak area/mg)	DKO ($\times 10^6$ peak area/mg)
	エステル				
C16:1	C32:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C37:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C39:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C40:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C41:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C42:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C43:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C44:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C45:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C46:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C47:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C48:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C49:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C50:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C51:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C52:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C53:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:3	ND	ND	ND	ND
C16:1	C32:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:2	ND	ND	ND	ND

C16:1	C36:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C37:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:2	0.17 ± 0.12	0.16 ± 0.16	0.24 ± 0.15	0.50 ± 0.06
C16:1	C39:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C40:2	0.40 ± 0.18	0.22 ± 0.09	0.58 ± 0.29	0.91 ± 0.23
C16:1	C41:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C42:2	0.56 ± 0.23	0.47 ± 0.16	1.22 ± 0.45	1.40 ± 0.11
C16:1	C43:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C44:2	0.42 ± 0.16	0.37 ± 0.19	0.81 ± 0.33	1.32 ± 0.36
C16:1	C45:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C46:2	0.08 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.27 ± 0.12	0.33 ± 0.04
C16:1	C47:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C48:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C49:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C50:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C51:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C52:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C53:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:2	ND	ND	ND	ND
C16:1	C32:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:1	0.37 ± 0.22	0.29 ± 0.12	0.41 ± 0.19	0.79 ± 0.29
C16:1	C37:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C38:1	1.83 ± 1.12	1.11 ± 0.70	1.94 ± 1.02	3.52 ± 0.83
C16:1	C39:1	0.59 ± 0.21	0.62 ± 0.29	0.73 ± 0.32	1.26 ± 0.44
C16:1	C40:1	4.52 ± 1.98	2.76 ± 1.19	6.36 ± 3.08	10.35 ± 1.11
C16:1	C41:1	1.30 ± 0.53	1.02 ± 0.38	1.95 ± 0.79	2.79 ± 0.49
C16:1	C42:1	4.61 ± 1.57	3.67 ± 1.16	8.66 ± 3.28	13.16 ± 1.16
C16:1	C43:1	1.27 ± 0.55	0.81 ± 0.27	2.13 ± 0.99	3.04 ± 0.38
C16:1	C44:1	1.75 ± 0.69	1.13 ± 0.48	3.34 ± 0.85	5.82 ± 0.46
C16:1	C45:1	0.28 ± 0.14	0.26 ± 0.13	0.57 ± 0.18	0.83 ± 0.15
C16:1	C46:1	0.61 ± 0.29	0.24 ± 0.14	0.96 ± 0.33	1.18 ± 0.25

C16:1	C47:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C48:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C49:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C50:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C51:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C52:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C53:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C32:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C33:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C34:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C35:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C36:0	0.13 ± 0.10	0.12 ± 0.08	0.17 ± 0.07	0.38 ± 0.02
C16:1	C37:0	0.22 ± 0.25	0.12 ± 0.11	0.25 ± 0.06	0.52 ± 0.21
C16:1	C38:0	0.76 ± 0.56	0.69 ± 0.36	0.96 ± 0.49	2.39 ± 0.60
C16:1	C39:0	0.80 ± 0.39	0.43 ± 0.25	0.91 ± 0.54	1.55 ± 0.43
C16:1	C40:0	1.53 ± 0.99	1.03 ± 0.29	2.38 ± 1.01	4.08 ± 1.23
C16:1	C41:0	0.68 ± 0.29	0.48 ± 0.26	1.19 ± 0.63	1.85 ± 0.53
C16:1	C42:0	0.70 ± 0.47	0.43 ± 0.26	1.20 ± 0.61	2.00 ± 0.55
C16:1	C43:0	0.26 ± 0.15	0.13 ± 0.05	0.53 ± 0.36	0.52 ± 0.07
C16:1	C44:0	0.16 ± 0.16	0.08 ± 0.06	0.36 ± 0.29	0.48 ± 0.08
C16:1	C45:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C46:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C47:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C48:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C49:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C50:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C51:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C52:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C53:0	ND	ND	ND	ND
C16:1	C54:0	ND	ND	ND	ND
C16:2	C42:1	ND	ND	ND	ND
C18:2	C42:1	ND	ND	ND	ND
C16:1	C42:1	4.66 ± 0.05	3.50 ± 1.40	8.20 ± 2.69	16.04 ± 1.42

C17:1	C42:1	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.43 ± 0.12
C18:1	C42:1	0.60 ± 0.11	0.42 ± 0.13	1.33 ± 0.49	2.49 ± 0.41
C19:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C20:1	C42:1	0.10 ± 0.08	0.04 ± 0.02	0.31 ± 0.12	0.44 ± 0.07
C21:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C22:1	C42:1	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.67 ± 0.16	1.08 ± 0.12
C23:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C24:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C25:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C26:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C27:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C28:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C29:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C30:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C31:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C32:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C33:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C34:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C35:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C36:1	C42:1	ND	ND	ND	ND
C16:0	C42:1	2.85 ± 0.21	2.11 ± 0.87	7.04 ± 1.35	10.46 ± 4.10
C17:0	C42:1	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.10	0.45 ± 0.13	0.70 ± 0.09
C18:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C19:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C20:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C21:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C22:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C23:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C24:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C25:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C26:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C27:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C28:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C29:0	C42:1	ND	ND	ND	ND

C30:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C31:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C32:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C33:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C34:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C35:0	C42:1	ND	ND	ND	ND
C36:0	C42:1	ND	ND	ND	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 4) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 5. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1 ω WdiE 分子種の定量値 (図 8B および 8C 関連)

OAHFA	FAI	WT ($\times 10^7$ peak area/mg)	A1 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	A2 KO ($\times 10^7$ peak area/mg)	DKO ($\times 10^7$ peak area/mg)
C32:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C33:3	C26:0	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.06 \pm 0.06	0.01 \pm 0.01
C34:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C35:3	C26:0	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.12 \pm 0.12	0.02 \pm 0.02
C36:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C37:3	C26:0	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.08	0.01 \pm 0.01
C38:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C39:3	C26:0	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00
C40:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C41:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C42:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C43:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C44:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C45:3	C26:0	ND	ND	ND	ND
C46:3	C26:0	0.13 \pm 0.03	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
C47:3	C26:0	0.10 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
C48:3	C26:0	2.33 \pm 0.73	0.43 \pm 0.20	0.20 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00
C49:3	C26:0	0.61 \pm 0.13	0.14 \pm 0.10	0.03 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
C50:3	C26:0	3.86 \pm 0.94	1.40 \pm 0.51	0.64 \pm 0.16	0.01 \pm 0.01
C51:3	C26:0	0.76 \pm 0.15	0.25 \pm 0.11	0.04 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
C52:3	C26:0	1.93 \pm 0.58	0.81 \pm 0.30	0.36 \pm 0.12	0.01 \pm 0.00
C53:3	C26:0	0.32 \pm 0.06	0.14 \pm 0.05	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
C54:3	C26:0	0.43 \pm 0.14	0.17 \pm 0.05	0.09 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00
C32:2	C26:0	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05	0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
C33:2	C26:0	0.13 \pm 0.04	0.11 \pm 0.07	1.45 \pm 0.51	0.02 \pm 0.01
C34:2	C26:0	0.08 \pm 0.04	0.11 \pm 0.07	0.06 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01
C35:2	C26:0	0.04 \pm 0.02	0.07 \pm 0.04	0.81 \pm 0.30	0.03 \pm 0.01
C36:2	C26:0	0.03 \pm 0.02	0.05 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01
C37:2	C26:0	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.34 \pm 0.12	0.02 \pm 0.01

C38:2	C26:0	ND	ND	ND	ND
C39:2	C26:0	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C40:2	C26:0	ND	ND	ND	ND
C41:2	C26:0	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C42:2	C26:0	ND	ND	ND	ND
C43:2	C26:0	ND	ND	ND	ND
C44:2	C26:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.00 ± 0.00
C45:2	C26:0	ND	ND	ND	ND
C46:2	C26:0	0.18 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.00 ± 0.00
C47:2	C26:0	0.23 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.01 ± 0.01
C48:2	C26:0	1.04 ± 0.33	0.28 ± 0.15	1.45 ± 0.17	0.03 ± 0.01
C49:2	C26:0	0.51 ± 0.09	0.22 ± 0.14	0.21 ± 0.04	0.01 ± 0.01
C50:2	C26:0	1.01 ± 0.29	0.51 ± 0.24	1.38 ± 0.11	0.05 ± 0.02
C51:2	C26:0	0.31 ± 0.08	0.17 ± 0.08	0.10 ± 0.02	0.01 ± 0.00
C52:2	C26:0	0.26 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.02 ± 0.01
C53:2	C26:0	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C54:2	C26:0	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C32:1	C26:0	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.57 ± 0.18	0.02 ± 0.00
C33:1	C26:0	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.04	6.90 ± 1.77	0.10 ± 0.22
C34:1	C26:0	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.22 ± 0.07	0.02 ± 0.01
C35:1	C26:0	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.47 ± 0.10	0.03 ± 0.01
C36:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C37:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C38:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C39:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C40:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C41:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C42:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C43:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C44:1	C26:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.00 ± 0.00
C45:1	C26:0	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C46:1	C26:0	0.06 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C47:1	C26:0	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C48:1	C26:0	0.22 ± 0.06	0.07 ± 0.03	0.64 ± 0.08	0.02 ± 0.00

C49:1	C26:0	0.13 ± 0.05	0.06 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C50:1	C26:0	0.12 ± 0.07	0.07 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.02 ± 0.01
C51:1	C26:0	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C52:1	C26:0	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C53:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C54:1	C26:0	ND	ND	ND	ND
C32:0	C26:0	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C33:0	C26:0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.68 ± 0.18	0.04 ± 0.02
C34:0	C26:0	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C35:0	C26:0	0.17 ± 0.09	0.15 ± 0.05	0.53 ± 0.12	0.69 ± 0.18
C36:0	C26:0	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.06	0.23 ± 0.05
C37:0	C26:0	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.26 ± 0.08	0.50 ± 0.09
C38:0	C26:0	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.05
C39:0	C26:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02
C40:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C41:0	C26:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01
C42:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C43:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C44:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C45:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C46:0	C26:0	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C47:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C48:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C49:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C50:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C51:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C52:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C53:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C54:0	C26:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C16:1	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C17:1	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C18:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C19:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C20:1	ND	ND	ND	ND

C50:3	C21:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C22:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C23:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C24:1	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C25:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C26:1	0.65 ± 0.10	0.29 ± 0.09	0.09 ± 0.04	0.00 ± 0.00
C50:3	C27:1	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C50:3	C28:1	0.23 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.00 ± 0.00
C50:3	C29:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C30:1	0.22 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C50:3	C31:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C32:1	0.23 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C50:3	C33:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C34:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C35:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C36:1	ND	ND	ND	ND
C50:3	C16:0	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C50:3	C17:0	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C18:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C19:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C20:0	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C21:0	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C22:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C23:0	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C24:0	0.52 ± 0.08	0.27 ± 0.09	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C50:3	C25:0	0.74 ± 0.15	0.34 ± 0.11	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C50:3	C26:0	2.90 ± 0.65	1.18 ± 0.22	0.38 ± 0.08	0.00 ± 0.00
C50:3	C27:0	1.01 ± 0.22	0.34 ± 0.08	0.15 ± 0.04	0.00 ± 0.00
C50:3	C28:0	0.14 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C50:3	C29:0	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C50:3	C30:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C31:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C32:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C33:0	ND	ND	ND	ND

C50:3	C34:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C35:0	ND	ND	ND	ND
C50:3	C36:0	ND	ND	ND	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 4) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 6. コントロールおよび *Tg(IVL-Cyp4f39)* *Cyp4f39* KO マウスマイボーム腺において測定したすべてのタイプ 1ω WdiE 分子種の定量値 (図 8D 関連)

OAHFA	FAI	Control ($\times 10^7$ peak area/mg)	<i>Cyp4f39</i> KO ($\times 10^7$ peak area/mg)
C32:3	C26:0	ND	ND
C33:3	C26:0	ND	ND
C34:3	C26:0	ND	ND
C35:3	C26:0	ND	ND
C36:3	C26:0	ND	ND
C37:3	C26:0	ND	ND
C38:3	C26:0	ND	ND
C39:3	C26:0	ND	ND
C40:3	C26:0	ND	ND
C41:3	C26:0	ND	ND
C42:3	C26:0	ND	ND
C43:3	C26:0	ND	ND
C44:3	C26:0	ND	ND
C45:3	C26:0	ND	ND
C46:3	C26:0	0.25 \pm 0.13	0.00 \pm 0.00
C47:3	C26:0	0.18 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00
C48:3	C26:0	5.14 \pm 2.05	0.07 \pm 0.06
C49:3	C26:0	0.99 \pm 0.36	0.04 \pm 0.03
C50:3	C26:0	8.92 \pm 3.02	0.63 \pm 0.51
C51:3	C26:0	1.23 \pm 0.35	0.10 \pm 0.08
C52:3	C26:0	4.54 \pm 1.56	0.66 \pm 0.48
C53:3	C26:0	0.58 \pm 0.17	0.06 \pm 0.05
C54:3	C26:0	1.19 \pm 0.51	0.19 \pm 0.16
C32:2	C26:0	0.12 \pm 0.06	0.06 \pm 0.03
C33:2	C26:0	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.05
C34:2	C26:0	0.13 \pm 0.06	0.05 \pm 0.03
C35:2	C26:0	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03
C36:2	C26:0	0.06 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01
C37:2	C26:0	0.02 \pm 0.01	0.06 \pm 0.03

C38:2	C26:0	ND	ND
C39:2	C26:0	ND	ND
C40:2	C26:0	ND	ND
C41:2	C26:0	ND	ND
C42:2	C26:0	ND	ND
C43:2	C26:0	ND	ND
C44:2	C26:0	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C45:2	C26:0	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C46:2	C26:0	0.41 ± 0.19	0.00 ± 0.00
C47:2	C26:0	0.36 ± 0.15	0.00 ± 0.00
C48:2	C26:0	2.26 ± 0.81	0.05 ± 0.05
C49:2	C26:0	0.79 ± 0.25	0.04 ± 0.03
C50:2	C26:0	2.28 ± 0.57	0.11 ± 0.10
C51:2	C26:0	0.61 ± 0.20	0.04 ± 0.04
C52:2	C26:0	0.61 ± 0.15	0.04 ± 0.05
C53:2	C26:0	0.16 ± 0.10	0.01 ± 0.01
C54:2	C26:0	0.11 ± 0.03	0.01 ± 0.01
C32:1	C26:0	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.04
C33:1	C26:0	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.06
C34:1	C26:0	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.01
C35:1	C26:0	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.04
C36:1	C26:0	ND	ND
C37:1	C26:0	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.02
C38:1	C26:0	ND	ND
C39:1	C26:0	ND	ND
C40:1	C26:0	ND	ND
C41:1	C26:0	ND	ND
C42:1	C26:0	ND	ND
C43:1	C26:0	ND	ND
C44:1	C26:0	ND	ND
C45:1	C26:0	ND	ND
C46:1	C26:0	0.14 ± 0.06	0.00 ± 0.00
C47:1	C26:0	0.13 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C48:1	C26:0	0.45 ± 0.15	0.00 ± 0.00

C49:1	C26:0	0.27 ± 0.07	0.00 ± 0.00
C50:1	C26:0	0.25 ± 0.05	0.00 ± 0.00
C51:1	C26:0	0.11 ± 0.03	0.00 ± 0.00
C52:1	C26:0	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00
C53:1	C26:0	ND	ND
C54:1	C26:0	ND	ND
C32:0	C26:0	ND	ND
C33:0	C26:0	ND	ND
C34:0	C26:0	ND	ND
C35:0	C26:0	ND	ND
C36:0	C26:0	ND	ND
C37:0	C26:0	ND	ND
C38:0	C26:0	ND	ND
C39:0	C26:0	ND	ND
C40:0	C26:0	ND	ND
C41:0	C26:0	ND	ND
C42:0	C26:0	ND	ND
C43:0	C26:0	ND	ND
C44:0	C26:0	ND	ND
C45:0	C26:0	ND	ND
C46:0	C26:0	ND	ND
C47:0	C26:0	ND	ND
C48:0	C26:0	ND	ND
C49:0	C26:0	ND	ND
C50:0	C26:0	ND	ND
C51:0	C26:0	ND	ND
C52:0	C26:0	ND	ND
C53:0	C26:0	ND	ND
C54:0	C26:0	ND	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 3) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 7. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイボーム腺において測定したすべての ChI-OAHFA 分子種の定量値(図 10B 関連)

OAHFA	WT ($\times 10^6$ peak area/mg)	A1 KO ($\times 10^6$ peak area/mg)	A2 KO ($\times 10^6$ peak area/mg)	DKO ($\times 10^6$ peak area/mg)
C32:3	ND	ND	ND	ND
C33:3	ND	ND	ND	ND
C34:3	ND	ND	ND	ND
C35:3	ND	ND	ND	ND
C36:3	ND	ND	ND	ND
C37:3	ND	ND	ND	ND
C38:3	ND	ND	ND	ND
C39:3	ND	ND	ND	ND
C40:3	ND	ND	ND	ND
C41:3	ND	ND	ND	ND
C42:3	ND	ND	ND	ND
C43:3	ND	ND	ND	ND
C44:3	ND	ND	ND	ND
C45:3	ND	ND	ND	ND
C46:3	ND	ND	ND	ND
C47:3	ND	ND	ND	ND
C48:3	1.84 \pm 0.65	0.21 \pm 0.24	0.09 \pm 0.12	0.11 \pm 0.14
C49:3	0.50 \pm 0.13	0.14 \pm 0.13	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.03
C50:3	4.20 \pm 1.11	2.01 \pm 0.22	1.29 \pm 0.95	0.66 \pm 0.76
C51:3	0.43 \pm 0.17	0.23 \pm 0.09	0.06 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02
C52:3	2.85 \pm 0.57	1.83 \pm 0.27	1.50 \pm 0.61	1.02 \pm 0.26
C53:3	ND	ND	ND	ND
C54:3	1.09 \pm 0.27	0.66 \pm 0.44	0.97 \pm 0.29	0.78 \pm 0.12
C32:2	ND	ND	ND	ND
C33:2	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.10 \pm 0.09	0.51 \pm 0.16
C34:2	ND	ND	ND	ND
C35:2	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.16 \pm 0.18	0.49 \pm 0.33
C36:2	ND	ND	ND	ND
C37:2	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.16 \pm 0.14	0.34 \pm 0.12

C38:2	ND	ND	ND	ND
C39:2	ND	ND	ND	ND
C40:2	ND	ND	ND	ND
C41:2	ND	ND	ND	ND
C42:2	ND	ND	ND	ND
C43:2	ND	ND	ND	ND
C44:2	ND	ND	ND	ND
C45:2	ND	ND	ND	ND
C46:2	1.08 ± 0.37	0.49 ± 0.17	0.27 ± 0.33	0.87 ± 0.37
C47:2	0.69 ± 0.38	0.08 ± 0.10	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.09
C48:2	11.08 ± 3.17	5.38 ± 0.51	3.71 ± 1.13	5.22 ± 0.44
C49:2	2.42 ± 0.80	1.18 ± 0.48	0.44 ± 0.08	1.20 ± 0.25
C50:2	21.06 ± 5.39	16.10 ± 0.81	10.89 ± 2.53	14.69 ± 2.43
C51:2	1.89 ± 0.66	1.68 ± 0.49	0.97 ± 0.33	1.67 ± 0.19
C52:2	12.27 ± 2.68	10.49 ± 3.06	7.09 ± 1.91	10.47 ± 1.66
C53:2	0.71 ± 0.27	0.57 ± 0.11	0.27 ± 0.08	0.58 ± 0.26
C54:2	6.49 ± 2.29	3.79 ± 1.76	3.97 ± 1.04	8.34 ± 0.89

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 4) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 8. 野生型, *Awat1* KO, *Awat2* KO および *Awat1 Awat2* DKO マウスマイ
ボーム腺において測定したすべての CE 分子種の定量値 (図 10C 関連)

FA	WT (nmol/mg)	A1 KO (nmol/mg)	A2 KO (nmol/mg)	DKO (nmol/mg)
C16:1	0.22 ± 0.33	0.22 ± 0.34	0.04 ± 0.06	0.01 ± 0.03
C17:1	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.01
C18:1	0.23 ± 0.18	0.17 ± 0.22	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03
C19:1	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C20:1	0.22 ± 0.15	0.08 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04
C21:1	0.04 ± 0.05	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C22:1	0.65 ± 0.23	0.55 ± 0.75	0.14 ± 0.14	0.07 ± 0.10
C23:1	ND	ND	ND	ND
C24:1	0.69 ± 0.25	0.67 ± 0.91	0.36 ± 0.22	0.40 ± 0.22
C25:1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.02
C26:1	0.29 ± 0.20	0.25 ± 0.42	0.20 ± 0.17	0.48 ± 0.49
C27:1	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.05 ± 0.09
C28:1	0.26 ± 0.28	0.27 ± 0.41	0.44 ± 0.22	0.49 ± 0.40
C29:1	0.01 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.03
C30:1	0.46 ± 0.41	0.24 ± 0.30	0.41 ± 0.17	0.88 ± 0.77
C31:1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.04	0.05 ± 0.10
C32:1	0.35 ± 0.51	0.20 ± 0.32	0.37 ± 0.28	0.78 ± 0.52
C33:1	0.06 ± 0.10	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.05	0.07 ± 0.07
C34:1	0.12 ± 0.15	0.01 ± 0.02	0.11 ± 0.08	0.15 ± 0.15
C35:1	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
C36:1	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:0	1.28 ± 0.40	0.57 ± 0.72	0.75 ± 0.32	0.39 ± 0.33
C17:0	0.98 ± 0.24	0.49 ± 0.35	0.29 ± 0.28	0.22 ± 0.08
C18:0	0.60 ± 0.36	0.19 ± 0.39	0.13 ± 0.07	0.36 ± 0.25
C19:0	1.06 ± 0.21	0.54 ± 0.46	0.51 ± 0.23	0.36 ± 0.35
C20:0	4.56 ± 1.78	2.34 ± 1.52	2.97 ± 1.20	2.51 ± 0.90
C21:0	4.00 ± 2.35	2.13 ± 1.32	2.64 ± 1.48	2.09 ± 0.72
C22:0	2.91 ± 2.58	1.42 ± 1.12	1.71 ± 1.13	1.15 ± 0.69
C23:0	2.08 ± 1.22	1.03 ± 1.10	1.40 ± 0.88	0.94 ± 0.27
C24:0	3.10 ± 1.76	1.67 ± 1.77	1.94 ± 0.62	1.71 ± 0.82
C25:0	4.66 ± 2.31	3.44 ± 3.75	2.75 ± 0.89	2.62 ± 1.17

C26:0	4.47 ± 2.90	2.62 ± 2.19	2.85 ± 1.02	2.95 ± 1.25
C27:0	2.52 ± 1.39	1.66 ± 1.54	1.64 ± 0.62	1.63 ± 0.87
C28:0	0.48 ± 0.53	0.31 ± 0.40	0.35 ± 0.42	0.40 ± 0.28
C29:0	0.42 ± 0.39	0.25 ± 0.26	0.20 ± 0.11	0.23 ± 0.27
C30:0	0.05 ± 0.07	0.05 ± 0.10	0.06 ± 0.08	0.02 ± 0.04
C31:0	0.05 ± 0.05	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.03
C32:0	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C33:0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00
C34:0	ND	ND	ND	ND
C35:0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.05
C36:0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 5) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 9. ヒト涙液において測定したすべての WE 分子種の定量値 (図 11 関連)

FA	FAI	(fmol/mm)	FA	FAI	(fmol/mm)
C16:1	C16:1	ND	C18:1	C16:1	ND
C16:1	C17:1	ND	C18:1	C17:1	ND
C16:1	C18:1	ND	C18:1	C18:1	ND
C16:1	C19:1	ND	C18:1	C19:1	ND
C16:1	C20:1	0.04 ± 0.04	C18:1	C20:1	ND
C16:1	C21:1	0.03 ± 0.05	C18:1	C21:1	ND
C16:1	C22:1	0.04 ± 0.03	C18:1	C22:1	0.05 ± 0.00
C16:1	C23:1	0.21 ± 0.17	C18:1	C23:1	0.58 ± 0.12
C16:1	C24:1	0.17 ± 0.06	C18:1	C24:1	0.76 ± 0.11
C16:1	C25:1	ND	C18:1	C25:1	0.08 ± 0.02
C16:1	C26:1	0.32 ± 0.07	C18:1	C26:1	1.37 ± 0.43
C16:1	C27:1	ND	C18:1	C27:1	0.05 ± 0.03
C16:1	C28:1	0.34 ± 0.12	C18:1	C28:1	1.33 ± 0.41
C16:1	C29:1	ND	C18:1	C29:1	ND
C16:1	C30:1	0.51 ± 0.19	C18:1	C30:1	1.98 ± 0.88
C16:1	C31:1	ND	C18:1	C31:1	0.04 ± 0.02
C16:1	C32:1	0.28 ± 0.08	C18:1	C32:1	0.72 ± 0.33
C16:1	C33:1	ND	C18:1	C33:1	ND
C16:1	C34:1	0.05 ± 0.05	C18:1	C34:1	0.09 ± 0.10
C16:1	C35:1	ND	C18:1	C35:1	ND
C16:1	C36:1	ND	C18:1	C36:1	ND
C16:1	C16:0	ND	C18:1	C16:0	ND
C16:1	C17:0	0.03 ± 0.06	C18:1	C17:0	ND
C16:1	C18:0	0.07 ± 0.06	C18:1	C18:0	0.04 ± 0.05
C16:1	C19:0	0.15 ± 0.11	C18:1	C19:0	0.23 ± 0.16
C16:1	C20:0	0.17 ± 0.20	C18:1	C20:0	0.41 ± 0.20
C16:1	C21:0	0.32 ± 0.19	C18:1	C21:0	0.63 ± 0.25
C16:1	C22:0	0.24 ± 0.13	C18:1	C22:0	0.53 ± 0.08
C16:1	C23:0	0.18 ± 0.08	C18:1	C23:0	0.64 ± 0.12
C16:1	C24:0	0.83 ± 0.04	C18:1	C24:0	4.85 ± 1.51
C16:1	C25:0	0.81 ± 0.12	C18:1	C25:0	4.74 ± 1.37
C16:1	C26:0	1.56 ± 0.42	C18:1	C26:0	10.41 ± 3.70

C16:1	C27:0	0.58 ± 0.13	C18:1	C27:0	2.90 ± 1.34
C16:1	C28:0	0.31 ± 0.14	C18:1	C28:0	1.29 ± 0.59
C16:1	C29:0	0.12 ± 0.00	C18:1	C29:0	0.51 ± 0.17
C16:1	C30:0	0.10 ± 0.03	C18:1	C30:0	0.45 ± 0.18
C16:1	C31:0	ND	C18:1	C31:0	0.20 ± 0.07
C16:1	C32:0	ND	C18:1	C32:0	0.07 ± 0.04
C16:1	C33:0	ND	C18:1	C33:0	ND
C16:1	C34:0	ND	C18:1	C34:0	ND
C16:1	C35:0	ND	C18:1	C35:0	ND
C16:1	C36:0	ND	C18:1	C36:0	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 3) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 10. ヒト涙液において測定したすべての OAHFA 分子種の定量値(図 12 関連)

FA	ω -OH FA	($\times 10^5$ peak area/mm)	FA	ω -OH FA	($\times 10^5$ peak area/mm)
C16:1	C16:2	ND	C18:1	C16:2	ND
C16:1	C17:2	ND	C18:1	C17:2	ND
C16:1	C18:2	ND	C18:1	C18:2	ND
C16:1	C19:2	ND	C18:1	C19:2	ND
C16:1	C20:2	ND	C18:1	C20:2	ND
C16:1	C21:2	ND	C18:1	C21:2	ND
C16:1	C22:2	ND	C18:1	C22:2	ND
C16:1	C23:2	ND	C18:1	C23:2	ND
C16:1	C24:2	ND	C18:1	C24:2	0.16 \pm 0.04
C16:1	C25:2	ND	C18:1	C25:2	ND
C16:1	C26:2	0.04 \pm 0.01	C18:1	C26:2	0.48 \pm 0.15
C16:1	C27:2	ND	C18:1	C27:2	ND
C16:1	C28:2	0.05 \pm 0.02	C18:1	C28:2	0.44 \pm 0.18
C16:1	C29:2	ND	C18:1	C29:2	0.04 \pm 0.02
C16:1	C30:2	0.29 \pm 0.05	C18:1	C30:2	2.14 \pm 0.46
C16:1	C31:2	0.12 \pm 0.04	C18:1	C31:2	0.84 \pm 0.21
C16:1	C32:2	2.46 \pm 0.85	C18:1	C32:2	14.08 \pm 6.08
C16:1	C33:2	0.10 \pm 0.03	C18:1	C33:2	0.60 \pm 0.19
C16:1	C34:2	1.23 \pm 0.54	C18:1	C34:2	6.17 \pm 2.92
C16:1	C35:2	ND	C18:1	C35:2	0.03 \pm 0.01
C16:1	C36:2	0.05 \pm 0.04	C18:1	C36:2	0.05 \pm 0.04
C16:1	C16:1	0.18 \pm 0.14	C18:1	C16:1	0.05 \pm 0.03
C16:1	C17:1	0.03 \pm 0.03	C18:1	C17:1	ND
C16:1	C18:1	0.16 \pm 0.10	C18:1	C18:1	0.51 \pm 0.11
C16:1	C19:1	ND	C18:1	C19:1	ND
C16:1	C20:1	0.02 \pm 0.01	C18:1	C20:1	0.10 \pm 0.03
C16:1	C21:1	ND	C18:1	C21:1	ND
C16:1	C22:1	0.03 \pm 0.02	C18:1	C22:1	0.68 \pm 0.24
C16:1	C23:1	ND	C18:1	C23:1	0.07 \pm 0.01
C16:1	C24:1	0.89 \pm 0.19	C18:1	C24:1	10.33 \pm 3.42
C16:1	C25:1	0.05 \pm 0.02	C18:1	C25:1	0.60 \pm 0.09

C16:1	C26:1	1.90 ± 0.56	C18:1	C26:1	14.09 ± 4.79
C16:1	C27:1	ND	C18:1	C27:1	0.50 ± 0.07
C16:1	C28:1	2.48 ± 0.81	C18:1	C28:1	14.19 ± 4.46
C16:1	C29:1	0.17 ± 0.05	C18:1	C29:1	1.02 ± 0.06
C16:1	C30:1	12.59 ± 1.45	C18:1	C30:1	61.56 ± 8.55
C16:1	C31:1	1.15 ± 0.22	C18:1	C31:1	5.90 ± 0.81
C16:1	C32:1	25.36 ± 5.07	C18:1	C32:1	110.92 ± 22.36
C16:1	C33:1	0.41 ± 0.04	C18:1	C33:1	1.90 ± 0.10
C16:1	C34:1	5.41 ± 1.85	C18:1	C34:1	21.38 ± 7.37
C16:1	C35:1	0.02 ± 0.01	C18:1	C35:1	0.08 ± 0.01
C16:1	C36:1	0.18 ± 0.09	C18:1	C36:1	0.70 ± 0.30

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 3) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 11. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 2ω WdiE 分子種の定量値
(図 13 関連)

ジオール			ジオール		
FA	-FA エ ステル	($\times 10^4$ peak area/mm)	FA	-FA エ ステル	($\times 10^4$ peak area/mm)
C16:1	C32:3	ND	C18:1	C32:3	ND
C16:1	C33:3	1.88 ± 0.78	C18:1	C33:3	ND
C16:1	C34:3	ND	C18:1	C34:3	ND
C16:1	C35:3	ND	C18:1	C35:3	ND
C16:1	C36:3	ND	C18:1	C36:3	ND
C16:1	C37:3	ND	C18:1	C37:3	ND
C16:1	C38:3	ND	C18:1	C38:3	ND
C16:1	C39:3	ND	C18:1	C39:3	ND
C16:1	C40:3	ND	C18:1	C40:3	ND
C16:1	C41:3	ND	C18:1	C41:3	ND
C16:1	C42:3	ND	C18:1	C42:3	ND
C16:1	C43:3	ND	C18:1	C43:3	ND
C16:1	C44:3	ND	C18:1	C44:3	ND
C16:1	C45:3	ND	C18:1	C45:3	ND
C16:1	C46:3	ND	C18:1	C46:3	0.57 ± 0.21
C16:1	C47:3	ND	C18:1	C47:3	ND
C16:1	C48:3	1.08 ± 0.44	C18:1	C48:3	4.34 ± 1.66
C16:1	C49:3	ND	C18:1	C49:3	0.58 ± 0.14
C16:1	C50:3	1.75 ± 0.59	C18:1	C50:3	7.54 ± 2.77
C16:1	C51:3	ND	C18:1	C51:3	0.20 ± 0.06
C16:1	C52:3	0.46 ± 0.26	C18:1	C52:3	1.53 ± 0.82
C16:1	C53:3	ND	C18:1	C53:3	ND
C16:1	C54:3	ND	C18:1	C54:3	ND
C16:1	C32:2	ND	C18:1	C32:2	ND
C16:1	C33:2	ND	C18:1	C33:2	ND
C16:1	C34:2	ND	C18:1	C34:2	ND
C16:1	C35:2	ND	C18:1	C35:2	ND
C16:1	C36:2	ND	C18:1	C36:2	ND
C16:1	C37:2	ND	C18:1	C37:2	ND

C16:1	C38:2	ND	C18:1	C38:2	ND
C16:1	C39:2	ND	C18:1	C39:2	ND
C16:1	C40:2	ND	C18:1	C40:2	ND
C16:1	C41:2	ND	C18:1	C41:2	ND
C16:1	C42:2	ND	C18:1	C42:2	0.45 ± 0.22
C16:1	C43:2	ND	C18:1	C43:2	ND
C16:1	C44:2	ND	C18:1	C44:2	0.53 ± 0.18
C16:1	C45:2	ND	C18:1	C45:2	ND
C16:1	C46:2	1.46 ± 0.48	C18:1	C46:2	4.77 ± 1.95
C16:1	C47:2	0.31 ± 0.09	C18:1	C47:2	1.52 ± 0.26
C16:1	C48:2	6.19 ± 2.54	C18:1	C48:2	23.17 ± 7.68
C16:1	C49:2	0.72 ± 0.15	C18:1	C49:2	2.97 ± 0.51
C16:1	C50:2	8.17 ± 3.47	C18:1	C50:2	23.32 ± 9.43
C16:1	C51:2	0.27 ± 0.13	C18:1	C51:2	0.76 ± 0.13
C16:1	C52:2	0.77 ± 0.38	C18:1	C52:2	3.21 ± 1.80
C16:1	C53:2	ND	C18:1	C53:2	ND
C16:1	C54:2	ND	C18:1	C54:2	ND
C16:1	C32:1	ND	C18:1	C32:1	ND
C16:1	C33:1	ND	C18:1	C33:1	ND
C16:1	C34:1	ND	C18:1	C34:1	0.26 ± 0.12
C16:1	C35:1	ND	C18:1	C35:1	ND
C16:1	C36:1	0.16 ± 0.12	C18:1	C36:1	0.46 ± 0.12
C16:1	C37:1	ND	C18:1	C37:1	ND
C16:1	C38:1	ND	C18:1	C38:1	0.37 ± 0.14
C16:1	C39:1	ND	C18:1	C39:1	ND
C16:1	C40:1	0.18 ± 0.08	C18:1	C40:1	1.11 ± 0.55
C16:1	C41:1	ND	C18:1	C41:1	0.49 ± 0.11
C16:1	C42:1	0.42 ± 0.20	C18:1	C42:1	2.95 ± 1.08
C16:1	C43:1	ND	C18:1	C43:1	0.63 ± 0.21
C16:1	C44:1	0.67 ± 0.20	C18:1	C44:1	3.86 ± 1.71
C16:1	C45:1	0.24 ± 0.05	C18:1	C45:1	1.24 ± 0.48
C16:1	C46:1	1.54 ± 0.66	C18:1	C46:1	6.94 ± 2.40
C16:1	C47:1	1.30 ± 0.56	C18:1	C47:1	3.98 ± 1.03
C16:1	C48:1	2.81 ± 1.18	C18:1	C48:1	11.27 ± 4.44

C16:1	C49:1	1.16 ± 0.40	C18:1	C49:1	4.67 ± 1.38
C16:1	C50:1	0.57 ± 0.26	C18:1	C50:1	2.46 ± 1.28
C16:1	C51:1	0.13 ± 0.08	C18:1	C51:1	0.55 ± 0.25
C16:1	C52:1	ND	C18:1	C52:1	0.21 ± 0.07
C16:1	C53:1	ND	C18:1	C53:1	ND
C16:1	C54:1	ND	C18:1	C54:1	0.10 ± 0.08
C16:1	C32:0	ND	C18:1	C32:0	ND
C16:1	C33:0	ND	C18:1	C33:0	ND
C16:1	C34:0	ND	C18:1	C34:0	ND
C16:1	C35:0	ND	C18:1	C35:0	ND
C16:1	C36:0	ND	C18:1	C36:0	ND
C16:1	C37:0	ND	C18:1	C37:0	ND
C16:1	C38:0	ND	C18:1	C38:0	ND
C16:1	C39:0	ND	C18:1	C39:0	0.19 ± 0.05
C16:1	C40:0	ND	C18:1	C40:0	0.58 ± 0.21
C16:1	C41:0	ND	C18:1	C41:0	0.44 ± 0.10
C16:1	C42:0	ND	C18:1	C42:0	0.76 ± 0.26
C16:1	C43:0	ND	C18:1	C43:0	0.36 ± 0.11
C16:1	C44:0	ND	C18:1	C44:0	0.50 ± 0.21
C16:1	C45:0	ND	C18:1	C45:0	0.34 ± 0.09
C16:1	C46:0	ND	C18:1	C46:0	1.08 ± 0.55
C16:1	C47:0	ND	C18:1	C47:0	0.86 ± 0.37
C16:1	C48:0	ND	C18:1	C48:0	0.59 ± 0.26
C16:1	C49:0	ND	C18:1	C49:0	0.18 ± 0.12
C16:1	C50:0	ND	C18:1	C50:0	ND
C16:1	C51:0	ND	C18:1	C51:0	ND
C16:1	C52:0	ND	C18:1	C52:0	ND
C16:1	C53:0	ND	C18:1	C53:0	ND
C16:1	C54:0	ND	C18:1	C54:0	ND
C16:1	C50:2	10.22 ± 4.63	C16:0	C50:2	2.80 ± 0.93
C17:1	C50:2	1.78 ± 0.74	C17:0	C50:2	4.43 ± 1.45
C18:1	C50:2	28.46 ± 12.54	C18:0	C50:2	0.60 ± 0.26
C19:1	C50:2	0.18 ± 0.07	C19:0	C50:2	0.23 ± 0.05
C20:1	C50:2	0.30 ± 0.12	C20:0	C50:2	ND

C21:1	C50:2	ND	C21:0	C50:2	ND
C22:1	C50:2	ND	C22:0	C50:2	ND
C23:1	C50:2	0.22 ± 0.05	C23:0	C50:2	0.33 ± 0.05
C24:1	C50:2	ND	C24:0	C50:2	0.29 ± 0.14
C25:1	C50:2	0.13 ± 0.07	C25:0	C50:2	0.52 ± 0.33
C26:1	C50:2	ND	C26:0	C50:2	0.29 ± 0.14
C27:1	C50:2	ND	C27:0	C50:2	ND
C28:1	C50:2	ND	C28:0	C50:2	ND
C29:1	C50:2	ND	C29:0	C50:2	ND
C30:1	C50:2	ND	C30:0	C50:2	ND
C31:1	C50:2	ND	C31:0	C50:2	ND
C32:1	C50:2	ND	C32:0	C50:2	ND
C33:1	C50:2	ND	C33:0	C50:2	ND
C34:1	C50:2	ND	C34:0	C50:2	ND
C35:1	C50:2	ND	C35:0	C50:2	ND
C36:1	C50:2	ND	C36:0	C50:2	ND

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 3) 。ND, not detected (検出限界以下) 。

表 12. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 2α WdiE 分子種の定量値

ジオール			ジオール		
FA	-FA エ ステル	($\times 10^4$ peak area/mm)	FA	-FA エ ステル	($\times 10^4$ peak area/mm)
C16:1	C32:3	ND	C18:1	C32:3	ND
C16:1	C33:3	ND	C18:1	C33:3	ND
C16:1	C34:3	ND	C18:1	C34:3	ND
C16:1	C35:3	ND	C18:1	C35:3	ND
C16:1	C36:3	ND	C18:1	C36:3	ND
C16:1	C37:3	ND	C18:1	C37:3	ND
C16:1	C38:3	ND	C18:1	C38:3	ND
C16:1	C39:3	ND	C18:1	C39:3	ND
C16:1	C40:3	ND	C18:1	C40:3	ND
C16:1	C41:3	ND	C18:1	C41:3	ND
C16:1	C42:3	ND	C18:1	C42:3	ND
C16:1	C43:3	ND	C18:1	C43:3	ND
C16:1	C44:3	ND	C18:1	C44:3	ND
C16:1	C45:3	ND	C18:1	C45:3	ND
C16:1	C46:3	ND	C18:1	C46:3	ND
C16:1	C47:3	ND	C18:1	C47:3	ND
C16:1	C48:3	ND	C18:1	C48:3	ND
C16:1	C49:3	ND	C18:1	C49:3	ND
C16:1	C50:3	ND	C18:1	C50:3	ND
C16:1	C51:3	ND	C18:1	C51:3	ND
C16:1	C52:3	ND	C18:1	C52:3	ND
C16:1	C53:3	ND	C18:1	C53:3	ND
C16:1	C54:3	ND	C18:1	C54:3	ND
C16:1	C32:2	ND	C18:1	C32:2	ND
C16:1	C33:2	ND	C18:1	C33:2	ND
C16:1	C34:2	ND	C18:1	C34:2	ND
C16:1	C35:2	ND	C18:1	C35:2	ND
C16:1	C36:2	ND	C18:1	C36:2	ND
C16:1	C37:2	ND	C18:1	C37:2	ND
C16:1	C38:2	ND	C18:1	C38:2	ND

C16:1	C39:2	ND	C18:1	C39:2	ND
C16:1	C40:2	ND	C18:1	C40:2	ND
C16:1	C41:2	ND	C18:1	C41:2	ND
C16:1	C42:2	ND	C18:1	C42:2	ND
C16:1	C43:2	ND	C18:1	C43:2	ND
C16:1	C44:2	ND	C18:1	C44:2	ND
C16:1	C45:2	ND	C18:1	C45:2	ND
C16:1	C46:2	ND	C18:1	C46:2	ND
C16:1	C47:2	ND	C18:1	C47:2	ND
C16:1	C48:2	ND	C18:1	C48:2	ND
C16:1	C49:2	ND	C18:1	C49:2	ND
C16:1	C50:2	ND	C18:1	C50:2	ND
C16:1	C51:2	ND	C18:1	C51:2	ND
C16:1	C52:2	ND	C18:1	C52:2	ND
C16:1	C53:2	ND	C18:1	C53:2	ND
C16:1	C54:2	ND	C18:1	C54:2	ND
C16:1	C32:1	ND	C18:1	C32:1	ND
C16:1	C33:1	ND	C18:1	C33:1	ND
C16:1	C34:1	ND	C18:1	C34:1	ND
C16:1	C35:1	ND	C18:1	C35:1	ND
C16:1	C36:1	ND	C18:1	C36:1	ND
C16:1	C37:1	ND	C18:1	C37:1	ND
C16:1	C38:1	ND	C18:1	C38:1	ND
C16:1	C39:1	ND	C18:1	C39:1	ND
C16:1	C40:1	ND	C18:1	C40:1	ND
C16:1	C41:1	ND	C18:1	C41:1	ND
C16:1	C42:1	ND	C18:1	C42:1	ND
C16:1	C43:1	ND	C18:1	C43:1	ND
C16:1	C44:1	ND	C18:1	C44:1	ND
C16:1	C45:1	ND	C18:1	C45:1	ND
C16:1	C46:1	ND	C18:1	C46:1	ND
C16:1	C47:1	ND	C18:1	C47:1	ND
C16:1	C48:1	ND	C18:1	C48:1	ND
C16:1	C49:1	ND	C18:1	C49:1	ND

C16:1	C50:1	ND	C18:1	C50:1	ND
C16:1	C51:1	ND	C18:1	C51:1	ND
C16:1	C52:1	ND	C18:1	C52:1	ND
C16:1	C53:1	ND	C18:1	C53:1	ND
C16:1	C54:1	ND	C18:1	C54:1	ND
C16:1	C32:0	ND	C18:1	C32:0	ND
C16:1	C33:0	ND	C18:1	C33:0	ND
C16:1	C34:0	ND	C18:1	C34:0	ND
C16:1	C35:0	ND	C18:1	C35:0	ND
C16:1	C36:0	ND	C18:1	C36:0	ND
C16:1	C37:0	ND	C18:1	C37:0	ND
C16:1	C38:0	ND	C18:1	C38:0	ND
C16:1	C39:0	ND	C18:1	C39:0	ND
C16:1	C40:0	ND	C18:1	C40:0	ND
C16:1	C41:0	ND	C18:1	C41:0	ND
C16:1	C42:0	ND	C18:1	C42:0	ND
C16:1	C43:0	ND	C18:1	C43:0	ND
C16:1	C44:0	ND	C18:1	C44:0	ND
C16:1	C45:0	ND	C18:1	C45:0	ND
C16:1	C46:0	ND	C18:1	C46:0	ND
C16:1	C47:0	ND	C18:1	C47:0	ND
C16:1	C48:0	ND	C18:1	C48:0	ND
C16:1	C49:0	ND	C18:1	C49:0	ND
C16:1	C50:0	ND	C18:1	C50:0	ND
C16:1	C51:0	ND	C18:1	C51:0	ND
C16:1	C52:0	ND	C18:1	C52:0	ND
C16:1	C53:0	ND	C18:1	C53:0	ND
C16:1	C54:0	ND	C18:1	C54:0	ND
C16:1	C50:2	ND	C16:0	C50:2	ND
C17:1	C50:2	ND	C17:0	C50:2	ND
C18:1	C50:2	ND	C18:0	C50:2	ND
C19:1	C50:2	ND	C19:0	C50:2	ND
C20:1	C50:2	ND	C20:0	C50:2	ND
C21:1	C50:2	ND	C21:0	C50:2	ND

C22:1	C50:2	ND	C22:0	C50:2	ND
C23:1	C50:2	ND	C23:0	C50:2	ND
C24:1	C50:2	ND	C24:0	C50:2	ND
C25:1	C50:2	ND	C25:0	C50:2	ND
C26:1	C50:2	ND	C26:0	C50:2	ND
C27:1	C50:2	ND	C27:0	C50:2	ND
C28:1	C50:2	ND	C28:0	C50:2	ND
C29:1	C50:2	ND	C29:0	C50:2	ND
C30:1	C50:2	ND	C30:0	C50:2	ND
C31:1	C50:2	ND	C31:0	C50:2	ND
C32:1	C50:2	ND	C32:0	C50:2	ND
C33:1	C50:2	ND	C33:0	C50:2	ND
C34:1	C50:2	ND	C34:0	C50:2	ND
C35:1	C50:2	ND	C35:0	C50:2	ND
C36:1	C50:2	ND	C36:0	C50:2	ND

(n = 3) 。 ND, not detected (検出限界以下) 。

表 13. ヒト涙液において測定したすべてのタイプ 1ω WdiE 分子種の定量値
(図 14 関連)

OAHFA	FAI	($\times 10^3$ peak area/mm)	OAHFA	FAI	($\times 10^3$ peak area/mm)
C32:3	C26:0	ND	C32:1	C26:0	3.51 ± 2.15
C33:3	C26:0	ND	C33:1	C26:0	2.90 ± 1.69
C34:3	C26:0	ND	C34:1	C26:0	6.07 ± 2.34
C35:3	C26:0	ND	C35:1	C26:0	ND
C36:3	C26:0	ND	C36:1	C26:0	ND
C37:3	C26:0	ND	C37:1	C26:0	ND
C38:3	C26:0	ND	C38:1	C26:0	ND
C39:3	C26:0	ND	C39:1	C26:0	ND
C40:3	C26:0	ND	C40:1	C26:0	ND
C41:3	C26:0	ND	C41:1	C26:0	1.35 ± 0.96
C42:3	C26:0	ND	C42:1	C26:0	ND
C43:3	C26:0	ND	C43:1	C26:0	1.51 ± 1.23
C44:3	C26:0	ND	C44:1	C26:0	ND
C45:3	C26:0	ND	C45:1	C26:0	1.62 ± 0.86
C46:3	C26:0	ND	C46:1	C26:0	2.43 ± 0.66
C47:3	C26:0	ND	C47:1	C26:0	6.85 ± 2.36
C48:3	C26:0	1.89 ± 0.84	C48:1	C26:0	7.03 ± 3.02
C49:3	C26:0	ND	C49:1	C26:0	7.13 ± 3.32
C50:3	C26:0	5.13 ± 1.63	C50:1	C26:0	2.14 ± 0.94
C51:3	C26:0	ND	C51:1	C26:0	1.06 ± 0.91
C52:3	C26:0	ND	C52:1	C26:0	ND
C53:3	C26:0	ND	C53:1	C26:0	ND
C54:3	C26:0	ND	C54:1	C26:0	ND
C32:2	C26:0	2.75 ± 1.53	C32:0	C26:0	ND
C33:2	C26:0	ND	C33:0	C26:0	ND
C34:2	C26:0	ND	C34:0	C26:0	ND
C35:2	C26:0	6.14 ± 2.82	C35:0	C26:0	ND
C36:2	C26:0	ND	C36:0	C26:0	ND
C37:2	C26:0	1.69 ± 1.10	C37:0	C26:0	ND
C38:2	C26:0	ND	C38:0	C26:0	ND
C39:2	C26:0	ND	C39:0	C26:0	ND

C40:2	C26:0	ND	C40:0	C26:0	ND
C41:2	C26:0	ND	C41:0	C26:0	ND
C42:2	C26:0	ND	C42:0	C26:0	ND
C43:2	C26:0	ND	C43:0	C26:0	ND
C44:2	C26:0	ND	C44:0	C26:0	ND
C45:2	C26:0	ND	C45:0	C26:0	ND
C46:2	C26:0	3.11 ± 1.91	C46:0	C26:0	ND
C47:2	C26:0	ND	C47:0	C26:0	ND
C48:2	C26:0	17.38 ± 6.91	C48:0	C26:0	ND
C49:2	C26:0	4.14 ± 0.61	C49:0	C26:0	ND
C50:2	C26:0	26.13 ± 9.06	C50:0	C26:0	ND
C51:2	C26:0	ND	C51:0	C26:0	ND
C52:2	C26:0	4.69 ± 2.03	C52:0	C26:0	ND
C53:2	C26:0	ND	C53:0	C26:0	ND
C54:2	C26:0	ND	C54:0	C26:0	ND
C50:2	C16:1	2.31 ± 1.24	C50:2	C16:0	28.78 ± 3.90
C50:2	C17:1	2.66 ± 0.82	C50:2	C17:0	18.42 ± 0.95
C50:2	C18:1	7.03 ± 1.60	C50:2	C18:0	7.54 ± 0.96
C50:2	C19:1	7.29 ± 3.06	C50:2	C19:0	3.87 ± 0.13
C50:2	C20:1	2.29 ± 0.26	C50:2	C20:0	6.93 ± 2.60
C50:2	C21:1	ND	C50:2	C21:0	2.56 ± 0.72
C50:2	C22:1	1.83 ± 0.80	C50:2	C22:0	3.69 ± 1.74
C50:2	C23:1	ND	C50:2	C23:0	2.78 ± 1.66
C50:2	C24:1	18.15 ± 6.24	C50:2	C24:0	21.63 ± 7.87
C50:2	C25:1	ND	C50:2	C25:0	17.53 ± 8.09
C50:2	C26:1	13.56 ± 7.79	C50:2	C26:0	28.81 ± 13.07
C50:2	C27:1	ND	C50:2	C27:0	5.68 ± 3.31
C50:2	C28:1	4.62 ± 3.10	C50:2	C28:0	2.20 ± 1.88
C50:2	C29:1	ND	C50:2	C29:0	ND
C50:2	C30:1	4.16 ± 2.91	C50:2	C30:0	ND
C50:2	C31:1	ND	C50:2	C31:0	ND
C50:2	C32:1	ND	C50:2	C32:0	ND
C50:2	C33:1	ND	C50:2	C33:0	ND
C50:2	C34:1	ND	C50:2	C34:0	ND

C50:2	C35:1	0.00 ± 0.00	C50:2	C35:0	0.00 ± 0.00
C50:2	C36:1	0.00 ± 0.00	C50:2	C36:0	0.00 ± 0.00

数値は平均値±標準偏差を示す (n = 3)。ND, not detected (検出限界以下)。

表 14. 本研究で使用したプライマー

プライマー名	オリゴヌクレオチド
Awat1-F1	5'-CACCGGTTTCAGACTGGGTACGGAAC-3'
Awat1-R1	5'-AAACGTTCCGTACCCAGTCTGAACC-3'
Awat1-F2	5'-GGGTGAATAAGAGACCTGGGGTGG-3'
Awat1-R2	5'-TCCCTAGTCATTTGATATAATGTCTGC-3'
Awat1-F3	5'-GGGATCCAAACGCTAGACAGCTGAAACCATTC-3'
Awat1-R3	5'-CACATTGTAGCTACTTCTCTGAAGC-3'
Awat1-F4	5'-GGAGAAACAGAGGTATATGACCAGG-3'
Awat1-R4	5'-TCACAAGAATATCAGCTTCTGGGTGTTGG-3'
Awat2-F1	5'-CACCGGAGTGCAGATACAGCACGCC-3'
Awat2-R1	5'-AAACGGCGTGCTGTATCTGCACTCC-3'
Awat2-F2	5'-GGCTTTTTCTGCACACTAGGGTCGTG-3'
Awat2-R2	5'-CCTTACCCATGTTTAAGGGCTGTGC-3'
Awat2-F3	5'-GGGATCCCAAGATTGTCTCAGGTGCTAACCGC-3'
Awat2-R3	5'-AGTAAATACACACACACATGCATGC-3'
Awat2-F4	5'-GGAGAGACAGACCTCTATGACCAGC-3'
Awat2-R4	5'-TCAAACATCACCAGCTCCTGGGTC-3'
Far1-F	5'-GATAATGTCAATATGTTAATGAACC-3'
Far1-R	5'-TCAGTATCTCATAGTGCTGGATGCTCG-3'
Far2-F	5'-TCCATGCTGGAGTATTTTCATCAACC-3'
Far2-R	5'-TTGAACAAGGGACAAATGAAGAACC-3'
Soat1-F	5'-GCCGTCTTCGCCCTGTCCGGCTGTGG-3'
Soat1-R	5'-CTAAAACACGTACCGACAAGTCCAGG-3'
Cyp4f39-F	5'-AGCATCTACGGGACCCACCACAACC-3'
Cyp4f39-R	5'-TGAGGGTAGAGGCTCTACATTGAGC-3'
Hprt-F	5'-GCTGACCTGCTGGATTACATTAAAG-3'
Hprt-R	5'-CTTAACCATTTTGGGGCTGTACTGC-3'

表 15. WE の測定時に選択した m/z 値(図 5 および図 11 関連)

FA	FAI	プリカーサーイオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)
		[M + H] ⁺	[FA-OH] ⁺
C16:1	C16:1	477.5	237.1
C16:1	C17:1	491.5	237.1
C16:1	C18:1	505.5	237.1
C16:1	C19:1	519.5	237.1
C16:1	C20:1	533.5	237.1
C16:1	C21:1	547.5	237.1
C16:1	C22:1	561.6	237.1
C16:1	C23:1	575.6	237.1
C16:1	C24:1	589.6	237.1
C16:1	C25:1	603.6	237.1
C16:1	C26:1	617.6	237.1
C16:1	C27:1	631.6	237.1
C16:1	C28:1	645.6	237.1
C16:1	C29:1	659.7	237.1
C16:1	C30:1	673.7	237.1
C16:1	C31:1	687.7	237.1
C16:1	C32:1	701.7	237.1
C16:1	C33:1	715.7	237.1
C16:1	C34:1	729.7	237.1
C16:1	C35:1	743.8	237.1
C16:1	C36:1	757.8	237.1
C16:1	C16:0	479.5	237.1
C16:1	C17:0	493.5	237.1
C16:1	C18:0	507.5	237.1
C16:1	C19:0	521.5	237.1
C16:1	C20:0	535.5	237.1
C16:1	C21:0	549.6	237.1
C16:1	C22:0	563.6	237.1
C16:1	C23:0	577.6	237.1
C16:1	C24:0	591.6	237.1
C16:1	C25:0	605.6	237.1

C16:1	C26:0	619.6	237.1
C16:1	C27:0	633.6	237.1
C16:1	C28:0	647.7	237.1
C16:1	C29:0	661.7	237.1
C16:1	C30:0	675.7	237.1
C16:1	C31:0	689.7	237.1
C16:1	C32:0	703.7	237.1
C16:1	C33:0	717.7	237.1
C16:1	C34:0	731.8	237.1
C16:1	C35:0	745.8	237.1
C16:1	C36:0	759.8	237.1
C18:1	C16:1	505.5	265.1
C18:1	C17:1	519.5	265.1
C18:1	C18:1	533.5	265.1
C18:1	C19:1	547.5	265.1
C18:1	C20:1	561.6	265.1
C18:1	C21:1	575.6	265.1
C18:1	C22:1	589.6	265.1
C18:1	C23:1	603.6	265.1
C18:1	C24:1	617.6	265.1
C18:1	C25:1	631.6	265.1
C18:1	C26:1	645.6	265.1
C18:1	C27:1	659.7	265.1
C18:1	C28:1	673.7	265.1
C18:1	C29:1	687.7	265.1
C18:1	C30:1	701.7	265.1
C18:1	C31:1	715.7	265.1
C18:1	C32:1	729.7	265.1
C18:1	C33:1	743.8	265.1
C18:1	C34:1	757.8	265.1
C18:1	C35:1	771.8	265.1
C18:1	C36:1	785.8	265.1
C18:1	C16:0	507.5	265.1
C18:1	C17:0	521.5	265.1

C18:1	C18:0	535.5	265.1
C18:1	C19:0	549.6	265.1
C18:1	C20:0	563.6	265.1
C18:1	C21:0	577.6	265.1
C18:1	C22:0	591.6	265.1
C18:1	C23:0	605.6	265.1
C18:1	C24:0	619.6	265.1
C18:1	C25:0	633.6	265.1
C18:1	C26:0	647.7	265.1
C18:1	C27:0	661.7	265.1
C18:1	C28:0	675.7	265.1
C18:1	C29:0	689.7	265.1
C18:1	C30:0	703.7	265.1
C18:1	C31:0	717.7	265.1
C18:1	C32:0	731.8	265.1
C18:1	C33:0	745.8	265.1
C18:1	C34:0	759.8	265.1
C18:1	C35:0	773.8	265.1
C18:1	C36:0	787.8	265.1
C16:2	C26:0	617.6	235.1
C18:2	C26:0	645.6	263.1
C17:1	C26:0	633.6	251.1
C19:1	C26:0	661.7	279.1
C20:1	C26:0	675.7	293.1
C21:1	C26:0	689.7	307.1
C22:1	C26:0	703.7	321.2
C23:1	C26:0	717.7	335.2
C24:1	C26:0	731.8	349.2
C25:1	C26:0	745.8	363.2
C26:1	C26:0	759.8	377.2
C16:0	C26:0	621.6	239.1
C17:0	C26:0	635.7	253.1
C18:0	C26:0	649.7	267.1
C19:0	C26:0	663.7	281.1

C20:0	C26:0	677.7	295.1
C21:0	C26:0	691.7	309.2
C22:0	C26:0	705.7	323.2
C23:0	C26:0	719.8	337.2
C24:0	C26:0	733.8	351.2
C25:0	C26:0	747.8	365.2
C26:0	C26:0	761.8	379.2

表 16. OAHFA の測定時に選択した m/z 値 (図 6, 図 9 および図 12 関連)

FA	ω -OH FA	プリカーサーイオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)
		[M + AMPP] ⁺	[M + AMPP - (FA-OH)] ⁺
C16:1	C16:2	671.5	417.0
C16:1	C17:2	685.5	431.0
C16:1	C18:2	699.5	445.0
C16:1	C19:2	713.5	459.0
C16:1	C20:2	727.5	473.1
C16:1	C21:2	741.5	487.1
C16:1	C22:2	755.6	501.1
C16:1	C23:2	769.6	515.1
C16:1	C24:2	783.6	529.1
C16:1	C25:2	797.6	543.1
C16:1	C26:2	811.6	557.1
C16:1	C27:2	825.6	571.2
C16:1	C28:2	839.6	585.2
C16:1	C29:2	853.7	599.2
C16:1	C30:2	867.7	613.2
C16:1	C31:2	881.7	627.2
C16:1	C32:2	895.7	641.2
C16:1	C33:2	909.7	655.3
C16:1	C34:2	923.7	669.3
C16:1	C35:2	937.8	683.3
C16:1	C36:2	951.8	697.3
C16:1	C16:1	673.5	419.0
C16:1	C17:1	687.5	433.0
C16:1	C18:1	701.5	447.0
C16:1	C19:1	715.5	461.0
C16:1	C20:1	729.5	475.1
C16:1	C21:1	743.5	489.1
C16:1	C22:1	757.6	503.1
C16:1	C23:1	771.6	517.1
C16:1	C24:1	785.6	531.1
C16:1	C25:1	799.6	545.1

C16:1	C26:1	813.6	559.1
C16:1	C27:1	827.6	573.2
C16:1	C28:1	841.6	587.2
C16:1	C29:1	855.7	601.2
C16:1	C30:1	869.7	615.2
C16:1	C31:1	883.7	629.2
C16:1	C32:1	897.7	643.2
C16:1	C33:1	911.7	657.3
C16:1	C34:1	925.7	671.3
C16:1	C35:1	939.8	685.3
C16:1	C36:1	953.8	699.3
C16:1	C16:0	675.5	421.0
C16:1	C17:0	689.5	435.0
C16:1	C18:0	703.5	449.0
C16:1	C19:0	717.5	463.1
C16:1	C20:0	731.5	477.1
C16:1	C21:0	745.6	491.1
C16:1	C22:0	759.6	505.1
C16:1	C23:0	773.6	519.1
C16:1	C24:0	787.6	533.1
C16:1	C25:0	801.6	547.1
C16:1	C26:0	815.6	561.2
C16:1	C27:0	829.6	575.2
C16:1	C28:0	843.7	589.2
C16:1	C29:0	857.7	603.2
C16:1	C30:0	871.7	617.2
C16:1	C31:0	885.7	631.2
C16:1	C32:0	899.7	645.3
C16:1	C33:0	913.7	659.3
C16:1	C34:0	927.8	673.3
C16:1	C35:0	941.8	687.3
C16:1	C36:0	955.8	701.3
C18:1	C16:2	699.5	417.0
C18:1	C17:2	713.5	431.0

C18:1	C18:2	727.5	445.0
C18:1	C19:2	741.5	459.0
C18:1	C20:2	755.5	473.1
C18:1	C21:2	769.5	487.1
C18:1	C22:2	783.6	501.1
C18:1	C23:2	797.6	515.1
C18:1	C24:2	811.6	529.1
C18:1	C25:2	825.6	543.1
C18:1	C26:2	839.6	557.1
C18:1	C27:2	853.6	571.2
C18:1	C28:2	867.6	585.2
C18:1	C29:2	881.7	599.2
C18:1	C30:2	895.7	613.2
C18:1	C31:2	909.7	627.2
C18:1	C32:2	923.7	641.2
C18:1	C33:2	937.7	655.3
C18:1	C34:2	951.7	669.3
C18:1	C35:2	965.8	683.3
C18:1	C36:2	979.8	697.3
C18:1	C16:1	701.5	419.0
C18:1	C17:1	715.5	433.0
C18:1	C18:1	729.5	447.0
C18:1	C19:1	743.5	461.0
C18:1	C20:1	757.5	475.1
C18:1	C21:1	771.5	489.1
C18:1	C22:1	785.6	503.1
C18:1	C23:1	799.6	517.1
C18:1	C24:1	813.6	531.1
C18:1	C25:1	827.6	545.1
C18:1	C26:1	841.6	559.1
C18:1	C27:1	855.6	573.2
C18:1	C28:1	869.6	587.2
C18:1	C29:1	883.7	601.2
C18:1	C30:1	897.7	615.2

C18:1	C31:1	911.7	629.2
C18:1	C32:1	925.7	643.2
C18:1	C33:1	939.7	657.3
C18:1	C34:1	953.7	671.3
C18:1	C35:1	967.8	685.3
C18:1	C36:1	981.8	699.3
C16:2	C34:1	923.7	671.3
C18:2	C34:1	951.7	671.3
C17:1	C34:1	939.7	671.3
C19:1	C34:1	967.7	671.3
C20:1	C34:1	981.8	671.3
C21:1	C34:1	995.8	671.3
C22:1	C34:1	1009.8	671.3
C23:1	C34:1	1023.8	671.3
C24:1	C34:1	1037.8	671.3
C25:1	C34:1	1051.8	671.3
C26:1	C34:1	1065.9	671.3
C27:1	C34:1	1079.9	671.3
C28:1	C34:1	1093.9	671.3
C29:1	C34:1	1107.9	671.3
C30:1	C34:1	1121.9	671.3
C31:1	C34:1	1135.9	671.3
C32:1	C34:1	1150.0	671.3
C33:1	C34:1	1164.0	671.3
C34:1	C34:1	1178.0	671.3
C35:1	C34:1	1192.0	671.3
C36:1	C34:1	1206.0	671.3
C16:0	C34:1	927.7	671.3
C17:0	C34:1	941.7	671.3
C18:0	C34:1	955.7	671.3
C19:0	C34:1	969.8	671.3
C20:0	C34:1	983.8	671.3
C21:0	C34:1	997.8	671.3
C22:0	C34:1	1011.8	671.3

C23:0	C34:1	1025.8	671.3
C24:0	C34:1	1039.8	671.3
C25:0	C34:1	1053.9	671.3
C26:0	C34:1	1067.9	671.3
C27:0	C34:1	1081.9	671.3
C28:0	C34:1	1095.9	671.3
C29:0	C34:1	1109.9	671.3
C30:0	C34:1	1123.9	671.3
C31:0	C34:1	1138.0	671.3
C32:0	C34:1	1152.0	671.3
C33:0	C34:1	1166.0	671.3
C34:0	C34:1	1180.0	671.3
C35:0	C34:1	1194.0	671.3
C36:0	C34:1	1208.0	671.3

表 17. タイプ 2 ω/α WdiE の測定時に選択した m/z 値 (図 7 および図 13 関連)

FA	ジオール-FA エステル	プリカーサーイオン (Q1) [M + H] ⁺	プロダクトイオン (Q3) [M + H - (FA - OH) - H ₂ O] ⁺
C16:1	C32:3	727.6	473.2
C16:1	C33:3	741.6	487.3
C16:1	C34:3	755.6	501.3
C16:1	C35:3	769.7	515.3
C16:1	C36:3	783.7	529.3
C16:1	C37:3	797.7	543.3
C16:1	C38:3	811.7	557.3
C16:1	C39:3	825.7	571.3
C16:1	C40:3	839.7	585.4
C16:1	C41:3	853.7	599.4
C16:1	C42:3	867.8	613.4
C16:1	C43:3	881.8	627.4
C16:1	C44:3	895.8	641.4
C16:1	C45:3	909.8	655.4
C16:1	C46:3	923.8	669.5
C16:1	C47:3	937.8	683.5
C16:1	C48:3	951.9	697.5
C16:1	C49:3	965.9	711.5
C16:1	C50:3	979.9	725.5
C16:1	C51:3	993.9	739.5
C16:1	C52:3	1007.9	753.6
C16:1	C53:3	1021.9	767.6
C16:1	C54:3	1036.0	781.6
C16:1	C32:2	729.6	475.3
C16:1	C33:2	743.6	489.3
C16:1	C34:2	757.7	503.3
C16:1	C35:2	771.7	517.3
C16:1	C36:2	785.7	531.3
C16:1	C37:2	799.7	545.3
C16:1	C38:2	813.7	559.3

C16:1	C39:2	827.7	573.4
C16:1	C40:2	841.7	587.4
C16:1	C41:2	855.8	601.4
C16:1	C42:2	869.8	615.4
C16:1	C43:2	883.8	629.4
C16:1	C44:2	897.8	643.4
C16:1	C45:2	911.8	657.5
C16:1	C46:2	925.8	671.5
C16:1	C47:2	939.9	685.5
C16:1	C48:2	953.9	699.5
C16:1	C49:2	967.9	713.5
C16:1	C50:2	981.9	727.5
C16:1	C51:2	995.9	741.6
C16:1	C52:2	1009.9	755.6
C16:1	C53:2	1024.0	769.6
C16:1	C54:2	1038.0	783.6
C16:1	C32:1	731.6	477.3
C16:1	C33:1	745.7	491.3
C16:1	C34:1	759.7	505.3
C16:1	C35:1	773.7	519.3
C16:1	C36:1	787.7	533.3
C16:1	C37:1	801.7	547.3
C16:1	C38:1	815.7	561.4
C16:1	C39:1	829.7	575.4
C16:1	C40:1	843.8	589.4
C16:1	C41:1	857.8	603.4
C16:1	C42:1	871.8	617.4
C16:1	C43:1	885.8	631.4
C16:1	C44:1	899.8	645.5
C16:1	C45:1	913.8	659.5
C16:1	C46:1	927.9	673.5
C16:1	C47:1	941.9	687.5
C16:1	C48:1	955.9	701.5
C16:1	C49:1	969.9	715.5

C16:1	C50:1	983.9	729.6
C16:1	C51:1	997.9	743.6
C16:1	C52:1	1012.0	757.6
C16:1	C53:1	1026.0	771.6
C16:1	C54:1	1040.0	785.6
C16:1	C32:0	733.7	479.3
C16:1	C33:0	747.7	493.3
C16:1	C34:0	761.7	507.3
C16:1	C35:0	775.7	521.3
C16:1	C36:0	789.7	535.3
C16:1	C37:0	803.7	549.4
C16:1	C38:0	817.7	563.4
C16:1	C39:0	831.8	577.4
C16:1	C40:0	845.8	591.4
C16:1	C41:0	859.8	605.4
C16:1	C42:0	873.8	619.4
C16:1	C43:0	887.8	633.5
C16:1	C44:0	901.8	647.5
C16:1	C45:0	915.9	661.5
C16:1	C46:0	929.9	675.5
C16:1	C47:0	943.9	689.5
C16:1	C48:0	957.9	703.5
C16:1	C49:0	971.9	717.6
C16:1	C50:0	985.9	731.6
C16:1	C51:0	1000.0	745.6
C16:1	C52:0	1014.0	759.6
C16:1	C53:0	1028.0	773.6
C16:1	C54:0	1042.0	787.6
C18:1	C32:3	755.6	473.2
C18:1	C33:3	769.7	487.3
C18:1	C34:3	783.7	501.3
C18:1	C35:3	797.7	515.3
C18:1	C36:3	811.7	529.3
C18:1	C37:3	825.7	543.3

C18:1	C38:3	839.7	557.3
C18:1	C39:3	853.7	571.3
C18:1	C40:3	867.8	585.4
C18:1	C41:3	881.8	599.4
C18:1	C42:3	895.8	613.4
C18:1	C43:3	909.8	627.4
C18:1	C44:3	923.8	641.4
C18:1	C45:3	937.8	655.4
C18:1	C46:3	951.9	669.5
C18:1	C47:3	965.9	683.5
C18:1	C48:3	979.9	697.5
C18:1	C49:3	993.9	711.5
C18:1	C50:3	1007.9	725.5
C18:1	C51:3	1021.9	739.5
C18:1	C52:3	1036.0	753.6
C18:1	C53:3	1050.0	767.6
C18:1	C54:3	1064.0	781.6
C18:1	C32:2	757.7	475.3
C18:1	C33:2	771.7	489.3
C18:1	C34:2	785.7	503.3
C18:1	C35:2	799.7	517.3
C18:1	C36:2	813.7	531.3
C18:1	C37:2	827.7	545.3
C18:1	C38:2	841.7	559.3
C18:1	C39:2	855.8	573.4
C18:1	C40:2	869.8	587.4
C18:1	C41:2	883.8	601.4
C18:1	C42:2	897.8	615.4
C18:1	C43:2	911.8	629.4
C18:1	C44:2	925.8	643.4
C18:1	C45:2	939.9	657.5
C18:1	C46:2	953.9	671.5
C18:1	C47:2	967.9	685.5
C18:1	C48:2	981.9	699.5

C18:1	C49:2	995.9	713.5
C18:1	C50:2	1009.9	727.5
C18:1	C51:2	1024.0	741.6
C18:1	C52:2	1038.0	755.6
C18:1	C53:2	1052.0	769.6
C18:1	C54:2	1066.0	783.6
C18:1	C32:1	759.7	477.3
C18:1	C33:1	773.7	491.3
C18:1	C34:1	787.7	505.3
C18:1	C35:1	801.7	519.3
C18:1	C36:1	815.7	533.3
C18:1	C37:1	829.7	547.3
C18:1	C38:1	843.8	561.4
C18:1	C39:1	857.8	575.4
C18:1	C40:1	871.8	589.4
C18:1	C41:1	885.8	603.4
C18:1	C42:1	899.8	617.4
C18:1	C43:1	913.8	631.4
C18:1	C44:1	927.9	645.5
C18:1	C45:1	941.9	659.5
C18:1	C46:1	955.9	673.5
C18:1	C47:1	969.9	687.5
C18:1	C48:1	983.9	701.5
C18:1	C49:1	997.9	715.5
C18:1	C50:1	1012.0	729.6
C18:1	C51:1	1026.0	743.6
C18:1	C52:1	1040.0	757.6
C18:1	C53:1	1054.0	771.6
C18:1	C54:1	1068.0	785.6
C18:1	C32:0	761.7	479.3
C18:1	C33:0	775.7	493.3
C18:1	C34:0	789.7	507.3
C18:1	C35:0	803.7	521.3
C18:1	C36:0	817.7	535.3

C18:1	C37:0	831.7	549.4
C18:1	C38:0	845.7	563.4
C18:1	C39:0	859.8	577.4
C18:1	C40:0	873.8	591.4
C18:1	C41:0	887.8	605.4
C18:1	C42:0	901.8	619.4
C18:1	C43:0	915.8	633.5
C18:1	C44:0	929.8	647.5
C18:1	C45:0	943.9	661.5
C18:1	C46:0	957.9	675.5
C18:1	C47:0	971.9	689.5
C18:1	C48:0	985.9	703.5
C18:1	C49:0	999.9	717.6
C18:1	C50:0	1013.9	731.6
C18:1	C51:0	1028.0	745.6
C18:1	C52:0	1042.0	759.6
C18:1	C53:0	1056.0	773.6
C18:1	C54:0	1070.0	787.6
C16:2	C50:2	979.9	727.5
C18:2	C50:2	1007.9	727.5
C17:1	C50:2	995.9	727.5
C19:1	C50:2	1024.0	727.5
C20:1	C50:2	1038.0	727.5
C21:1	C50:2	1052.0	727.5
C22:1	C50:2	1066.0	727.5
C23:1	C50:2	1080.0	727.5
C24:1	C50:2	1094.0	727.5
C25:1	C50:2	1108.0	727.5
C26:1	C50:2	1122.1	727.5
C27:1	C50:2	1136.1	727.5
C28:1	C50:2	1150.1	727.5
C29:1	C50:2	1164.1	727.5
C30:1	C50:2	1178.1	727.5
C31:1	C50:2	1192.1	727.5

C32:1	C50:2	1206.2	727.5
C33:1	C50:2	1220.2	727.5
C34:1	C50:2	1234.2	727.5
C35:1	C50:2	1248.2	727.5
C36:1	C50:2	1262.2	727.5
C16:0	C50:2	983.9	727.5
C17:0	C50:2	997.9	727.5
C18:0	C50:2	1012.0	727.5
C19:0	C50:2	1026.0	727.5
C20:0	C50:2	1040.0	727.5
C21:0	C50:2	1054.0	727.5
C22:0	C50:2	1068.0	727.5
C23:0	C50:2	1082.0	727.5
C24:0	C50:2	1096.0	727.5
C25:0	C50:2	1110.1	727.5
C26:0	C50:2	1124.1	727.5
C27:0	C50:2	1138.1	727.5
C28:0	C50:2	1152.1	727.5
C29:0	C50:2	1166.1	727.5
C30:0	C50:2	1180.1	727.5
C31:0	C50:2	1194.2	727.5
C32:0	C50:2	1208.2	727.5
C33:0	C50:2	1222.2	727.5
C34:0	C50:2	1236.2	727.5
C35:0	C50:2	1250.2	727.5
C36:0	C50:2	1264.2	727.5
C16:2	C42:1	869.8	617.4
C18:2	C42:1	897.8	617.4
C17:1	C42:1	885.8	617.4
C19:1	C42:1	913.8	617.4
C20:1	C42:1	927.9	617.4
C21:1	C42:1	941.9	617.4
C22:1	C42:1	955.9	617.4
C23:1	C42:1	969.9	617.4

C24:1	C42:1	983.9	617.4
C25:1	C42:1	997.9	617.4
C26:1	C42:1	1012.0	617.4
C27:1	C42:1	1026.0	617.4
C28:1	C42:1	1040.0	617.4
C29:1	C42:1	1054.0	617.4
C30:1	C42:1	1068.0	617.4
C31:1	C42:1	1082.0	617.4
C32:1	C42:1	1096.0	617.4
C33:1	C42:1	1110.1	617.4
C34:1	C42:1	1124.1	617.4
C35:1	C42:1	1138.1	617.4
C36:1	C42:1	1152.1	617.4
C16:0	C42:1	873.8	617.4
C17:0	C42:1	887.8	617.4
C18:0	C42:1	901.8	617.4
C19:0	C42:1	915.9	617.4
C20:0	C42:1	929.9	617.4
C21:0	C42:1	943.9	617.4
C22:0	C42:1	957.9	617.4
C23:0	C42:1	971.9	617.4
C24:0	C42:1	985.9	617.4
C25:0	C42:1	1000.0	617.4
C26:0	C42:1	1014.0	617.4
C27:0	C42:1	1028.0	617.4
C28:0	C42:1	1042.0	617.4
C29:0	C42:1	1056.0	617.4
C30:0	C42:1	1070.0	617.4
C31:0	C42:1	1084.0	617.4
C32:0	C42:1	1098.1	617.4
C33:0	C42:1	1112.1	617.4
C34:0	C42:1	1126.1	617.4
C35:0	C42:1	1140.1	617.4
C36:0	C42:1	1154.1	617.4

表 18. タイプ 1ω WdiE の測定時に選択した m/z 値 (図 8 および図 14 関連)

OAHFA	FAI	プリカーサーイオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)
		[M + H] ⁺	[M + H - FAI] ⁺
C32:3	C26:0	869.8	487.1
C33:3	C26:0	883.8	501.1
C34:3	C26:0	897.8	515.1
C35:3	C26:0	911.8	529.1
C36:3	C26:0	925.8	543.2
C37:3	C26:0	939.9	557.2
C38:3	C26:0	953.9	571.2
C39:3	C26:0	967.9	585.2
C40:3	C26:0	981.9	599.2
C41:3	C26:0	995.9	613.2
C42:3	C26:0	1009.9	627.3
C43:3	C26:0	1023.9	641.3
C44:3	C26:0	1038.0	655.3
C45:3	C26:0	1052.0	669.3
C46:3	C26:0	1066.0	683.3
C47:3	C26:0	1080.0	697.3
C48:3	C26:0	1094.0	711.4
C49:3	C26:0	1108.0	725.4
C50:3	C26:0	1122.1	739.4
C51:3	C26:0	1136.1	753.4
C52:3	C26:0	1150.1	767.4
C53:3	C26:0	1164.1	781.4
C54:3	C26:0	1178.1	795.4
C32:2	C26:0	871.8	489.1
C33:2	C26:0	885.8	503.1
C34:2	C26:0	899.8	517.1
C35:2	C26:0	913.8	531.2
C36:2	C26:0	927.9	545.2
C37:2	C26:0	941.9	559.2
C38:2	C26:0	955.9	573.2
C39:2	C26:0	969.9	587.2

C40:2	C26:0	983.9	601.2
C41:2	C26:0	997.9	615.3
C42:2	C26:0	1011.9	629.3
C43:2	C26:0	1026.0	643.3
C44:2	C26:0	1040.0	657.3
C45:2	C26:0	1054.0	671.3
C46:2	C26:0	1068.0	685.3
C47:2	C26:0	1082.0	699.4
C48:2	C26:0	1096.0	713.4
C49:2	C26:0	1110.1	727.4
C50:2	C26:0	1124.1	741.4
C51:2	C26:0	1138.1	755.4
C52:2	C26:0	1152.1	769.4
C53:2	C26:0	1166.1	783.4
C54:2	C26:0	1180.1	797.5
C32:1	C26:0	873.8	491.1
C33:1	C26:0	887.8	505.1
C34:1	C26:0	901.8	519.2
C35:1	C26:0	915.9	533.2
C36:1	C26:0	929.9	547.2
C37:1	C26:0	943.9	561.2
C38:1	C26:0	957.9	575.2
C39:1	C26:0	971.9	589.2
C40:1	C26:0	985.9	603.3
C41:1	C26:0	999.9	617.3
C42:1	C26:0	1014.0	631.3
C43:1	C26:0	1028.0	645.3
C44:1	C26:0	1042.0	659.3
C45:1	C26:0	1056.0	673.3
C46:1	C26:0	1070.0	687.4
C47:1	C26:0	1084.0	701.4
C48:1	C26:0	1098.1	715.4
C49:1	C26:0	1112.1	729.4
C50:1	C26:0	1126.1	743.4

C51:1	C26:0	1140.1	757.4
C52:1	C26:0	1154.1	771.4
C53:1	C26:0	1168.1	785.5
C54:1	C26:0	1182.2	799.5
C32:0	C26:0	875.8	493.1
C33:0	C26:0	889.8	507.2
C34:0	C26:0	903.9	521.2
C35:0	C26:0	917.9	535.2
C36:0	C26:0	931.9	549.2
C37:0	C26:0	945.9	563.2
C38:0	C26:0	959.9	577.2
C39:0	C26:0	973.9	591.3
C40:0	C26:0	987.9	605.3
C41:0	C26:0	1002.0	619.3
C42:0	C26:0	1016.0	633.3
C43:0	C26:0	1030.0	647.3
C44:0	C26:0	1044.0	661.3
C45:0	C26:0	1058.0	675.4
C46:0	C26:0	1072.0	689.4
C47:0	C26:0	1086.1	703.4
C48:0	C26:0	1100.1	717.4
C49:0	C26:0	1114.1	731.4
C50:0	C26:0	1128.1	745.4
C51:0	C26:0	1142.1	759.4
C52:0	C26:0	1156.1	773.5
C53:0	C26:0	1170.2	787.5
C54:0	C26:0	1184.2	801.5
C50:3	C16:1	979.9	739.4
C50:3	C17:1	993.9	739.4
C50:3	C18:1	1007.9	739.4
C50:3	C19:1	1021.9	739.4
C50:3	C20:1	1035.9	739.4
C50:3	C21:1	1050.9	739.4
C50:3	C22:1	1064.9	739.4

C50:3	C23:1	1078.0	739.4
C50:3	C24:1	1092.0	739.4
C50:3	C25:1	1106.0	739.4
C50:3	C26:1	1120.0	739.4
C50:3	C27:1	1134.1	739.4
C50:3	C28:1	1148.1	739.4
C50:3	C29:1	1162.1	739.4
C50:3	C30:1	1176.1	739.4
C50:3	C31:1	1190.1	739.4
C50:3	C32:1	1204.2	739.4
C50:3	C33:1	1218.2	739.4
C50:3	C34:1	1232.2	739.4
C50:3	C35:1	1246.2	739.4
C50:3	C36:1	1260.2	739.4
C50:3	C16:0	981.9	739.4
C50:3	C17:0	995.9	739.4
C50:3	C18:0	1009.9	739.4
C50:3	C19:0	1023.9	739.4
C50:3	C20:0	1038.0	739.4
C50:3	C21:0	1052.0	739.4
C50:3	C22:0	1066.0	739.4
C50:3	C23:0	1080.0	739.4
C50:3	C24:0	1094.0	739.4
C50:3	C25:0	1108.0	739.4
C50:3	C27:0	1136.1	739.4
C50:3	C28:0	1150.1	739.4
C50:3	C29:0	1164.1	739.4
C50:3	C30:0	1178.1	739.4
C50:3	C31:0	1192.2	739.4
C50:3	C32:0	1206.2	739.4
C50:3	C33:0	1220.2	739.4
C50:3	C34:0	1234.2	739.4
C50:3	C35:0	1248.2	739.4
C50:3	C36:0	1262.2	739.4

C50:2	C16:1	981.9	741.0
C50:2	C17:1	995.9	741.0
C50:2	C18:1	1009.9	741.0
C50:2	C19:1	1023.9	741.0
C50:2	C20:1	1038.0	741.0
C50:2	C21:1	1052.0	741.0
C50:2	C22:1	1066.0	741.0
C50:2	C23:1	1080.0	741.0
C50:2	C24:1	1094.0	741.0
C50:2	C25:1	1108.0	741.0
C50:2	C26:1	1122.1	741.0
C50:2	C27:1	1136.1	741.0
C50:2	C28:1	1150.1	741.0
C50:2	C29:1	1164.1	741.0
C50:2	C30:1	1178.1	741.0
C50:2	C31:1	1192.1	741.0
C50:2	C32:1	1206.2	741.0
C50:2	C33:1	1220.2	741.0
C50:2	C34:1	1234.2	741.0
C50:2	C35:1	1248.2	741.0
C50:2	C36:1	1262.2	741.0
C50:2	C16:0	983.9	741.0
C50:2	C17:0	997.9	741.0
C50:2	C18:0	1011.9	741.0
C50:2	C19:0	1026.0	741.0
C50:2	C20:0	1040.0	741.0
C50:2	C21:0	1054.0	741.0
C50:2	C22:0	1068.0	741.0
C50:2	C23:0	1082.0	741.0
C50:2	C24:0	1096.0	741.0
C50:2	C25:0	1110.1	741.0
C50:2	C27:0	1138.1	741.0
C50:2	C28:0	1152.1	741.0
C50:2	C29:0	1166.1	741.0

C50:2	C30:0	1180.1	741.0
C50:2	C31:0	1194.2	741.0
C50:2	C32:0	1208.2	741.0
C50:2	C33:0	1222.2	741.0
C50:2	C34:0	1236.2	741.0
C50:2	C35:0	1250.2	741.0
C50:2	C36:0	1264.2	741.0

表 19. Chl-OAHFA の測定時に選択した m/z 値 (図 10 関連)

OAHFA	プリカーサーイオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)
	[M + H] ⁺	[Chl-H ₂ O] ⁺
C32:3	873.8	369.4
C33:3	887.8	369.4
C34:3	901.9	369.4
C35:3	915.9	369.4
C36:3	929.9	369.4
C37:3	943.9	369.4
C38:3	957.9	369.4
C39:3	971.9	369.4
C40:3	986.0	369.4
C41:3	1000.0	369.4
C42:3	1014.0	369.4
C43:3	1028.0	369.4
C44:3	1042.0	369.4
C45:3	1056.0	369.4
C46:3	1070.1	369.4
C47:3	1084.1	369.4
C48:3	1098.1	369.4
C49:3	1112.1	369.4
C50:3	1126.1	369.4
C51:3	1140.1	369.4
C52:3	1154.1	369.4
C53:3	1168.2	369.4
C54:3	1182.2	369.4
C32:2	875.8	369.4
C33:2	889.9	369.4
C34:2	903.9	369.4
C35:2	917.9	369.4
C36:2	931.9	369.4
C37:2	945.9	369.4
C38:2	959.9	369.4
C39:2	974.0	369.4

C40:2	988.0	369.4
C41:2	1002.0	369.4
C42:2	1016.0	369.4
C43:2	1030.0	369.4
C44:2	1044.0	369.4
C45:2	1058.1	369.4
C46:2	1072.1	369.4
C47:2	1086.1	369.4
C48:2	1100.1	369.4
C49:2	1114.1	369.4
C50:2	1128.1	369.4
C51:2	1142.1	369.4
C52:2	1156.2	369.4
C53:2	1170.2	369.4
C54:2	1184.2	369.4

表 20. CE の測定時に選択した m/z 値 (図 10 関連)

FA	プリカーサーイオン (Q1)	プロダクトイオン (Q3)
	$[M + H]^+$	$[Chl-H_2O]^+$
C16:1	623.6	369.4
C17:1	637.6	369.4
C18:1	651.6	369.4
C19:1	665.6	369.4
C20:1	679.7	369.4
C21:1	693.7	369.4
C22:1	707.7	369.4
C23:1	721.7	369.4
C24:1	735.7	369.4
C25:1	749.7	369.4
C26:1	763.7	369.4
C27:1	777.8	369.4
C28:1	791.8	369.4
C29:1	805.8	369.4
C30:1	819.8	369.4
C31:1	833.8	369.4
C32:1	847.8	369.4
C33:1	861.9	369.4
C34:1	875.9	369.4
C35:1	889.9	369.4
C36:1	903.9	369.4
C16:0	625.6	369.4
C17:0	639.6	369.4
C18:0	653.6	369.4
C19:0	667.7	369.4
C20:0	681.7	369.4
C21:0	695.7	369.4
C22:0	709.7	369.4
C23:0	723.7	369.4
C24:0	737.7	369.4
C25:0	751.7	369.4

C26:0	765.8	369.4
C27:0	779.8	369.4
C28:0	793.8	369.4
C29:0	807.8	369.4
C30:0	821.8	369.4
C31:0	835.8	369.4
C32:0	849.9	369.4
C33:0	863.9	369.4
C34:0	877.9	369.4
C35:0	891.9	369.4
C36:0	905.9	369.4

7. 参考文献

- 1) Bron A. J., Tiffany J. M., Gouveia S. M., Yokoi N., and Voon L. W. (2004) Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res*, **78**, 347–360.
- 2) Craig J. P., Nelson J. D., Azar D. T., Belmonte C., Bron A. J., *et al.* (2017) TFOS DEWS II report executive summary. *Ocul Surf*, **15**, 802–812.
- 3) Green-Church K. B., Butovich I., Willcox M., Borchman D., Paulsen F., *et al.* (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1979–1993.
- 4) Willcox M. D. P., Argüeso P., Georgiev G. A., Holopainen J. M., Laurie G. W., *et al.* (2017) TFOS DEWS II tear film report. *Ocul Surf*, **15**, 366–403.
- 5) Gipson I. K. (2016) Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Prog Retin Eye Res*, **54**, 49–63.
- 6) Garg A. and Zhang X. (2017) Lacrimal gland development: From signaling interactions to regenerative medicine. *Dev Dyn*, **246**, 970–980.
- 7) Cwiklik L. (2016) Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochim Biophys Acta*, **1858**, 2421–2430.
- 8) Georgiev G. A., Yokoi N., Ivanova S., Tonchev V., Nancheva Y., *et al.* (2014) Surface relaxations as a tool to distinguish the dynamic interfacial properties of films formed by normal and diseased meibomian lipids. *Soft Matter*, **10**, 5579–5588.
- 9) Knop E., Knop N., Millar T., Obata H., and Sullivan D. A. (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1938–1978.
- 10) Butovich I. A. (2017) Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res*, **163**, 2–16.
- 11) Craig J. P., Nichols K. K., Akpek E. K., Caffery B., Dua H. S., *et al.* (2017) TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf*, **15**, 276–283.
- 12) Wolffsohn J. S., Arita R., Chalmers R., Djalilian A., Dogru M., *et al.* (2017) TFOS DEWS II diagnostic methodology report. *Ocul Surf*, **15**, 539–574.
- 13) Horwath-Winter J., Berghold A., Schmut O., Floegel I., Solhdju V., *et al.* (2003) Evaluation of the clinical course of dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol*, **121**, 1364–1368.

- 14) Lemp M. A., Crews L. A., Bron A. J., Foulks G. N., and Sullivan B. D. (2012) Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea*, **31**, 472–478.
- 15) Shimazaki J., Sakata M., and Tsubota K. (1995) Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol*, **113**, 1266–1270.
- 16) Tomlinson A., Bron A. J., Korb D. R., Amano S., Paugh J. R., *et al.* (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 2006–2049.
- 17) Miyamoto M., Sassa T., Sawai M., and Kihara A. (2020) Lipid polarity gradient formed by ω -hydroxy lipids in tear film prevents dry eye disease. *eLife*, **9**, e53582.
- 18) Lam S. M., Tong L., Reux B., Lear M. J., Wenk M. R., *et al.* (2013) Rapid and sensitive profiling of tear wax ester species using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1308**, 166–171.
- 19) Nicolaidis N., Kaitaranta J. K., Rawdah T. N., Macy J. I., Boswell F. M., *et al.* (1981) Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **20**, 522–536.
- 20) Tanno H., Sassa T., Sawai M., and Kihara A. (2021) Production of branched-chain very-long-chain fatty acids by fatty acid elongases and their tissue distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1866**, 158842.
- 21) Lam S. M., Tong L., Yong S. S., Li B., Chaurasia S. S., *et al.* (2011) Meibum lipid composition in Asians with dry eye disease. *PLoS One*, **6**, e24339.
- 22) Butovich I. A. and Suzuki T. (2020) Delineating a novel metabolic high triglycerides-low waxes syndrome that affects lipid homeostasis in meibomian and sebaceous glands. *Exp Eye Res*, **199**, 108189.
- 23) Khanal S., Ngo W., Nichols K. K., Wilson L., Barnes S., *et al.* (2021) Human meibum and tear film derived (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids in meibomian gland dysfunction. *Ocul Surf*, **21**, 118–128.
- 24) Yagyu H., Kitamine T., Osuga J., Tozawa R., Chen Z., *et al.* (2000) Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem*, **275**, 21324–21330.
- 25) Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., *et al.* (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18439–18444.

- 26) Sassa T., Tadaki M., Kiyonari H., and Kihara A. (2018) Very long-chain tear film lipids produced by fatty acid elongase ELOVL1 prevent dry eye disease in mice. *FASEB J*, **32**, 2966–2978.
- 27) Butovich I. A., Wilkerson A., Bhat N., McMahon A., and Yuksel S. (2019) On the pivotal role of *Elovl3*/ELOVL3 in meibogenesis and ocular physiology of mice *FASEB J*, **33**, 10034–10048.
- 28) McMahon A., Lu H., and Butovich I. A. (2014) A role for ELOVL4 in the mouse meibomian gland and sebocyte cell biology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **55**, 2832–2840.
- 29) Cheng J. B. and Russell D. W. (2004) Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family. *J Biol Chem*, **279**, 37798–37807.
- 30) Turkish A. R., Henneberry A. L., Cromley D., Padamsee M., Oelkers P., *et al.* (2005) Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases: members of the diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene superfamily. *J Biol Chem*, **280**, 14755–14764.
- 31) Cheng J. B. and Russell D. W. (2004) Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J Biol Chem*, **279**, 37789–37797.
- 32) Iyengar B. T. and Schlenk H. (1969) Melting points of synthetic wax esters. *Lipids*, **4**, 28–30.
- 33) Mahadevan S., Murthy S. K., and Ganguly J. (1962) Enzymic oxidation of vitamin A aldehyde to vitamin A acid by rat liver. *Biochem J*, **85**, 326–331.
- 34) Liu Q., Siloto R. M., Lehner R., Stone S. J., and Weselake R. J. (2012) Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog Lipid Res*, **51**, 350–377.
- 35) Holmes R. S. (2010) Comparative genomics and proteomics of vertebrate diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acyl CoA wax alcohol acyltransferase (AWAT) and monoacylglycerol acyltransferase (MGAT). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, **5**, 45–54.
- 36) Watanabe K., Yoshida M., Okumura T., Sassa T., Kihara A., *et al.* (2021) Improvement of evaporative dry eye with meibomian gland dysfunction in model mice by treatment with ophthalmic solution containing mineral oil. *Transl Vis Sci Technol*, **10**, 21.

- 37) Simsek C., Kojima T., Nagata T., Dogru M., and Tsubota K. (2019) Changes in murine subbasal corneal nerves after scopolamine-induced dry eye stress exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **60**, 615–623.
- 38) Hancock S. E., Ailuri R., Marshall D. L., Brown S. H. J., Saville J. T., *et al.* (2018) Mass spectrometry-directed structure elucidation and total synthesis of ultra-long chain (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids. *J Lipid Res*, **59**, 1510–1518.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院 薬学研究院 生化学研究室 木原章雄教授に厚く御礼申し上げます。木原先生には研究に関してご指導賜っただけでなく、悩んだ時に相談に乗っていただき、精神的にも支えていただきました。未熟者ゆえにたくさんご迷惑をお掛けいたしました。大学院進学前よりは確実に成長したように感じており、大学院を続けることには意味があったと今なら胸を張って言えます。研究室に対してはなかなか貢献できませんでしたが、今後は社会貢献を通じて先生に恩返しをしていけたらと存じます。

また、日頃より有益なご助言を賜りました同研究室 佐々貴之准教授、大野祐介助教に厚く御礼申し上げます。佐々先生には慣れないマウス実験の手解きをご教示いただき、論文化の際にも多くのお力添えを賜りました。大野先生には実験について沢山のご助言をいただきましたし、プライベートな相談にも乗っていただきました。博士課程の学生として先生方の右腕に、とはなれませんでした。慣れない中スタッフの先生方のお仕事についても勉強させていただけたのは大変貴重な経験となりました。

また、本論文を審査していただきました北海道大学大学院 薬学研究院 生体分子機能学研究室 黒木喜美子准教授に厚く御礼申し上げます。先生のことは女性研究者の先輩として尊敬しており、憧れの先生に研究成果を見ていただけたことを嬉しく思っております。

最後に、私をここまで育て上げ、いつでも味方でいてくれる家族に心より感謝いたします。これから離れて暮らすことにはなりますが、家族皆仲良く、支え合っていけたらと思います。