



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development and application of highly sensitive LC/MS analysis of oxylipins and short-chain fatty acids [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	李, 泳翰
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第16333号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94940
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yonghan_Li_review.pdf, 審査の要旨



様式 9

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健学科）

氏名：李 泳翰

審査委員	主査	池田 敦子	教授
	副査	恵 淑萍	教授
	副査	櫻井 俊宏	准教授
	副査		

学位論文題名

Development and application of highly sensitive LC/MS analysis of oxylipins and short-chain fatty acids

（オキシリピンおよび短鎖脂肪酸の高感度 LC/MS 分析法の開発とその応用）

当審査は2025年1月22日実施の公開発表にて行われた。（出席者61名）

オキシリピンは、シクロオキシゲナーゼ（COX）、リポキシゲナーゼ（LOX）、およびシトクロム P450（CYP）といった酵素経路を介して、n-3 および n-6 多価不飽和脂肪酸（PUFAs）から生成される生理活性脂質である。これらは、炎症性疾患、心血管疾患、代謝性疾患に深く関与するとされる。一方、短鎖脂肪酸は腸内細菌による発酵代謝産物であり、腸管バリア機能の維持、炎症の抑制、エネルギー代謝の調節に重要な役割を果たす。これまでの研究では、オキシリピンの検出および定量にはいかに示すようないくつかの技術的課題があった：(1) 体内濃度が極めて低いこと、(2) 構造が類似した異性体が多数存在すること、(3) 酸化ストレスや物理的要因による分解の影響を受けやすいこと。一方の短鎖脂肪酸についても血漿中の濃度は低く、サンプルの保存状態や前処理によって大きな影響を受けるため、正確な測定には最適化された抽出プロセスが必要である。

そこで本論文では、このような現状にあるオキシリピンと短鎖脂肪酸について、まず高感度の LC/MS 分析法を開発し、それを用いて 9～12 歳の北海道在住児童の血漿中オキシリピンと短鎖脂肪酸の濃度、それらと年齢・性別・体格指数（BMI）との関連を検討したものである。

まず、オキシリピンにかかる技術的課題を解決するため、高感度かつ高選択性の LC/MS 法を開発した。本法では、Kinetex カラム（100 × 2.1 mm, 2.6 μm）を用い、負イオンモードでの測定を行った。移動相には、Aとして0.1%酢酸を含む水、Bとして0.1%酢酸を含むメタノール/アセトニトリル（50:50, v/v）を用い、36分間のプログラムにより測定を実施した結果、全ての異性体を良好に分離することが可能となった。この分析法により、64種類のオキシリピンおよび4種類の前駆体 PUFAs の定量が可能となり、特に特異的フラグメントイオンを選択することで、多数の異性体を正確に識別することができた。開発した分析法の信頼性を検証するために主要なパラメータを評価したところ、全体的に良好な結果が得られた（線形性： $R^2 > 0.99$ 、回収率：85-110%、マトリックス

効果：90-110%、正確度：75-110%、精度：<15%）。この結果、本分析法が臨床検査の現場においても応用できることが示された。

次いで、児童の血漿サンプルからオキシリピンを抽出するにあたり、氷浴中でメタノールを用いる簡易なタンパク質沈殿法を採用した。具体的には、50 μ L の血漿サンプルにメタノールを加えて氷上で45分間静置することでオキシリピンの分解を抑制し、従来の固相抽出や液-液抽出に比べて測定時間・労力・コストを大幅に削減し、大規模コホート研究への応用性を高めることができた。一方、血漿から短鎖脂肪酸を抽出する際には、酢酸エチルとギ酸を用いた改良分析法を開発し、従来の方法より抽出効率と安定性を向上させると同時に、干渉やマトリックス効果を大幅に低減することが可能となった。

最後に、本研究で開発した分析法を北海道における9～12歳の健康な児童コホート（男児181名、女児161名）の血漿サンプルに適用し、オキシリピンおよび短鎖脂肪酸の血漿レベルを分析した。この結果、PUFAs 4種、オキシリピン4種、単鎖脂肪酸8種が検出下限値以上で定量できた。定量した濃度と年齢、性別、BMIとの関連を解析した。この結果、オキシリピンには統計学的な有意差が見られた項目は無かったものの、BMI群別の比較においては、過体重群のeicosapentaenoic acid (EPA)濃度が低体重群と比べて有意に高かった。さらに、短鎖脂肪酸のうちC4、C5、C6の濃度は年齢とともに増加し、HC5は逆に減少する傾向が確認された。

これを要するに、著者は、オキシリピンおよび短鎖脂肪酸を対象とした高感度LC/MS分析法を確立し、この分析法を用いて北海道の児童血漿中に含まれる関連脂質濃度を分析することで、児童の発育過程における脂質代謝に関する新たな知見を得たものであり、今後の児童の代謝や健康関連バイオマーカーの探索、さらに栄養管理などにおいて貢献するところ大なるものがある。

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