



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of a quantitative analytical method for unsaturated short-chain fatty acid esters of hydroxy fatty acids and their biological applications
Author(s)	Madihalli Gangadhara, Rachana
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(食資源学)
Dissertation Number	甲第17000号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17000
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99844
Type	doctoral thesis
File Information	Rachana_Madihalli_Gangadhara_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（食資源学） 氏名 Madihalli Gangadhara Rachana

審査担当者	主 査	准教授	ボメゴウダ	シッダバサーブゴウダ
	副 査	教 授	松石 隆	
	副 査	准教授	石井 一暢	

学 位 論 文 題 名

Development of a quantitative analytical method for unsaturated short-chain fatty acid esters of hydroxy fatty acids and their biological applications
(ヒドロキシ脂肪酸の不飽和短鎖脂肪酸エステル の定量分析法の開発とその生物学的応用)

脂質は、細胞構造の維持、代謝管理、恒常性維持に不可欠なシグナル伝達経路の促進に必須の、極めて多様な分子である。脂質代謝異常は、肥満、炎症、神経変性疾患などの病態との関連性がますます明らかになっている。分析技術の進歩、特に液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）は、複雑な脂質混合物を高感度で分解できることから、脂質オミックスのゴールドスタンダードとなっている。非標的 LC/MS は脂質オミックス全体の包括的概観を提供し、新規脂質種の発見や広範な代謝知見の獲得を可能とする。しかし、正確な定量、構造確認、信頼性の高いバイオマーカー評価には標的 LC/MS が不可欠である。新規脂質種の中でも、ヒドロキシ脂肪酸の短鎖脂肪酸エステル（SFAHFA）は、炎症抑制や代謝調節の可能性において注目に値する。しかしながら、その低濃度、構造的多様性、および市販標準品の不足が、機序解明や定量的研究における課題となってきた。本論文では、脂質化学と先進的な LC/MS 分析を統合し、SFAHFA 脂質の合成、定量法開発、感度向上、ならびに生物学的応用を検討することで、その生理的役割に関する深い理解を得ることを目的とする。

第 1 章では、脂質とその分類の概要を説明し、生物学的システムにおける構造的・機能的多様性を述べる。脂質代謝が健康と疾患において中心的な役割を果たすことを強調する。本章では、宿主と微生物叢の相互作用を通じて形成される可能性のある新たな腸由来シグナル脂質として、FAHFA ファミリーとそのサブクラスである SFAHFAs を紹介する。さらに、低内因性存在量や参照標準物質の欠如といった絶対定量における課題を論じ、正確な検出と生物学的解釈のための堅牢な LC/MS ベースの分析ワークフロー開発の必要性を正当化する。

第 2 章では、30 種類の不飽和 SFAHFA 標準物質の化学合成と構造解析について記述する。これらの化合物は、市販の不飽和脂肪酸 6 種を原料とし、 α -ヒドロキシル化反応と短鎖脂肪酸アシル化反応という二段階反応により合成された。二重結合の立体配置を保持するため反応条件を慎重に最適化した。生成物は $^1\text{H-NMR}$ 及び高分解能質量分析法（HRMS）により特性評価され、調製した標準物質の構造完全性と高純度が確認された。本章は不飽和 SFAHFA の初の包括的合成ライブラリを確立し、絶対定量及び機能研究のための真正な参照化合物を提供することで、脂質オミックス研究における重要な空白を埋めるものである。

第 3 章では、超高速液体クロマトグラフィー（UFLC）と三重四重極質量分析計（TSQ）を組み合わせたシステムを用いた、不飽和 SFAHFA の LC/MS 法開発に焦点を当てた。方法の最適化には、逆相カラムによるクロマトグラフィー分離と、高感度検出のための負イオン化電

気噴霧イオン化法が含まれた。開発した標的 LC/MS/MS 法は、優れた直線性 ($R^2 > 0.99$)、回収率 (85-110%)、精度 ($< 20\%$) を示し、マトリックス干渉は最小限であった。選択性、正確性、安定性を含む検証パラメータにより、定量分析における本法の信頼性が確認された。この最適化されたワークフローは、複雑な生体マトリックス中の SFAHFA プロファイリングのための確固たる基盤を提供する。

第 4 章では確立された LC/MS 法を用い、異なる代謝状態および認知状態下における SFAHFA の生物学的調節機構を解明する。マウス実験では、肥満誘発食は運動の有無にかかわらず飽和 SFAHFA の減少と不飽和種の増加傾向をもたらした。興味深いことに、運動と標準食の組み合わせでは腸内の有益な SFAHFA レベルが増加した。一方、軽度認知障害患者の糞便サンプルは健常者と有意差を示さず、疾患特異的・マトリックス特異的な SFAHFA 調節の可能性を示唆している。これらの知見は、腸関連脂質メディエーターとしての SFAHFA のトランスレーショナルな可能性を実証するとともに、食事や生理的条件によるその動的調節を強調している。

第 5 章では、LC/MS 分析における SFAHFA の検出感度を高めるフェニルエチルアミン (PEA) ベースの誘導体化戦略を検討する。カルボキシル官能基を標的とする PEA 誘導体化は安定したアミド結合を形成し、エレクトロスプレーモードにおけるイオン化効率を大幅に改善する。誘導体化された SFAHFA は、天然型と比較して約 1000 倍高い感度を示した。糞便サンプルへの応用ではピーク強度が顕著に増加し、検出性と定量信頼性の向上が確認された。この簡便な誘導体化プロトコルは、生物学的システムにおける低存在量脂質代謝物の検出に強力な手法を提供する。

第 6 章では、脂質オミクス解析をより広範な代謝的文脈に拡張し、非標的 LC/MS を用いてマウスモデルにおける慢性肥満誘発食 (OBD) および運動介入によって誘発される脂質変化のプロファイリングを行った。生後 2 ヶ月の雄 C57BL/6J マウスを 10 ヶ月間、対照食 (CON 食) または肥満誘発食 (OBD) で飼育した後、2 週間の運動 (Exe) 群または非運動 (Sed) 群に割り当てた。血漿、組織、糞便サンプルから合計 363 種の脂質が同定された。多変量解析により、Sed 群と Exe 群の双方において、対照群と OBD 群の明確な分離が認められた。リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE 22:5) は、Sed および Exe 群の OBD マウスの肝臓、血漿、左心室で有意に上昇していた。対照的に、DHA 含有ホスファチジルグリセロール (PG (22:6/22:6)) は有意に低下していた。運動は OBD 下で脂質プロファイルを適度に調節し、血漿セラミドを低下させ、糞便中の脂質変化を部分的に逆転させた。

本論文は、合成脂質化学、高度な LC/MS/MS 法開発、誘導体化戦略、および多マトリックス脂質オミクス応用を統合し、SFAHFA 研究のための包括的枠組みを確立した。本研究の知見は、代謝および神経認知状態におけるこれらの新規脂質の調節に関する新たな分析ツールと生物学的知見を提供する。本研究は、SFAHFA 定量における長年の方法論的障壁を克服するだけでなく、健康と疾患における腸由来脂質シグナル伝達の理解に向けた新たな道を開くものである。

よって、審査員一同は、Madihalli Gangadhara Rachana が博士 (食資源) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。