The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	超臨界流体技術を基盤とした酸化リン脂質分析技術の開発
Author(s)	内方, 崇人
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27593
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【84】

氏　　名	内方崇人（うちかた たかと）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学 位 記 番 号	第　２６１５０　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	**超臨界流体技術を基盤とした酸化リン脂質分析技術の開発**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　福崎　英一郎 （副査） 教 授　渡邉　肇　教 授　村中　俊哉　教 授　大竹　久夫 教 授　原島　俊　教 授　福井　希一　教 授　紀ノ岡　正博 教 授　仁平　卓也　教 授　藤山　和仁　教 授　金谷　茂則

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では超臨界流体技術として超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析（SFC/MS）やオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析（SFE-SFC/MS）を用いて，従来法による分析が困難であった酸化リン脂質の異性体分析や暗黒無酸素条件で抽出分析可能な分析系の構築を行い，その有用性を検証した．

第一章では,緒論として超臨界流体技術および分析対象である酸化リン脂質研究の近年の動向をまとめ,現在,当該研究分野が直面している問題点を提示した．

第二章では，リン脂質である多価不飽和脂肪酸を有するホスファチジルコリンを用いてラジカル酸化により酸化リン脂質標準品を調製し,各種分析条件を検討することでSFC/MSを用いた酸化リン脂質分析系の構築を行った．種々の分析条件を検討したところ，2Ethylpyridineカラムを用いることで酸化修飾基ごとに分離することが確認でき，既存の分析系では分離できなかった異性体の分離結果も得られた．また，それぞれの酸化リン脂質のMS/MS分析を行い，得られたプロダクトイオンの情報からポジティブモードを用いてヒドロキシド，ネガティブモードを用いてエポキシドの同定を行った．さらに本分析系を生体サンプルであるマウス肝臓中の酸化リン脂質に適用したところ，それぞれの修飾基を有する酸化リン脂質を検出することができた．また，これまで分析できなかったエポキシドの位置異性体も検出可能であった．この結果により分離能の高いSFCと質量分析を組み合わせたSFC/MS/MSが，酸化リン脂質の分析に有用であることを示した．

第三章では，暗黒無酸素状態で抽出分析可能なオンラインSFE-SFC/MS/MSシステムを構築し，血漿中酸化リン脂質の分析への適用に取り組んだ．まず，抽出，分離工程を分ける分析システムの検討を行い，次に，抽出条件，分析条件の検討を行うことで，オンラインSFE-SFC/MS/MSシステムを構築した．本分析システムを用いることで血漿3 μLからリン脂質134種の分子種を検出することが可能となった．また，酸化リン脂質分析に適用したところ血漿10 μLから酸化リン脂質を検出することができた．さらに，従来の液液抽出法と比較検討したところ，抽出効率，安定性がSFEの方が高いことがわかった．以上より，リン脂質，酸化リン脂質分析のためのオンラインSFE-SFC/MS/MSシステムを構築することができ，その有用性を示した．

第四章では，以上の研究成果と意義をまとめ，今後の課題と展望について記述した．

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では超臨界流体技術として超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析（SFC/MS）やオンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析（SFE-SFC/MS）を用いて，従来法による分析が困難であった酸化リン脂質の異性体分析や暗黒無酸素条件で抽出分析可能な分析系の構築を行い，その有用性を検証したものである．

第一章では，緒論として本論文における中心技術である SFC および分析対象である酸化リン脂質研究の近年の動向をまとめ，現在，当該研究分野が直面している問題点を提示している．

第二章では，リン脂質である多価不飽和脂肪酸を有するホスファチジルコリンを用いてラジカル酸化により酸化リン脂質標準品を調製し,各種分析条件を検討することで SFC/MS を用いた酸化リン脂質分析系の構築を行っている.種々の分析条件を検討したところ，2Ethylpyridine カラムで酸化修飾基ごとに分離することが確認でき，既存の分析系では分離できなかった異性体の分離結果も得られている．また，それぞれの酸化リン脂質の MS/MS 分析を行い，得られるプロダクトイオンの情報からポジティブモードを用いてヒドロキシド，ネガティブモードを用いてエポキシドの同定を行っている．さらに本分析系を生体サンプルであるマウス肝臓中から酸化リン脂質の本分析に適用したところ，酸化リン脂質を検出することが可能であり，これらの結果より，様々な修飾基を有し，生体中に微量にしか存在しない酸化リン脂質の分離分析に，分離能の高い分離が可能な SFC と質量分析を組み合わせた SFC/MS/MS が有用であることを示している．

第三章では，暗黒無酸素状態で抽出分析できるオンライン SFE-SFC/MS/MS の特性を実用的に応用することで，血漿中リン脂質，酸化リン脂質の分析系の構築に取り組んでいる．抽出，分離工程を分ける分析システムの検討を行い，オンライン SFE-SFC/MS/MS システムを適用している．また，抽出条件，分析条件の検討を行うことで，血漿 3 μL からリン脂質 134 種の分子種を検出することが可能となっており，酸化リン脂質ついては血漿 10 μL から抽出分析を行うことで検出すること可能となっている．さらに，従来の液液抽出法と比較検討したところ，抽出効率，安定性が SFE の方が高いことが示されている．以上より，リン脂質，酸化リン脂質分析のための暗黒無酸素条件で，抽出工程の不要なハイスループットなオンライン SFE-SFC/MS/MS システムを構築することができたといえる．

第四章では，以上の研究成果と意義をまとめ，今後の課題と展望について記述した．

以上のように、本論文は従来技術では分離分析できなかった酸化リン脂質分析への超臨界流体技術の有用性を実証している．よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。