

平成二十五年度 博士論文

過酸化リン脂質異性体の精密定量による
生体酸化ストレスの評価

東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻

天然物生物機能科学講座 機能分子解析学分野

加藤 俊治

指導教員 仲川 清隆 准教授

目次

序論	4
第一章	
高純度 PC00H 異性体標品調製法の確立	13
第一節 安定・高収率な PC00H 標品調製法の検討	14
第二節 PC00H 構造異性体標品調製法の確立	27
第二章	
LC-MS/MS を用いた生体 PC00H 分析法の確立	46
第一節 PC00H 異性体分析のための LC-MS/MS 条件の検討	48
第二節 血漿からの PC00H 回収試験と MS のイオンサプレッションの評価	57
第三章	
ヒト血漿の PC00H 異性体解析	69
総括	78
引用文献	79
謝辞	89

序論

近年、生体酸化ストレス（内因性および外因性の酸化ストレス、生体抗酸化システムの破綻）が動脈硬化、アルツハイマー病、癌や老化といった様々な疾患に関わることが示唆されているが[1]、実際にはどのようなメカニズムで酸化ストレスが発生するのか、さらにその影響についてはまだ不明な点が多い。そのため、多くの医療・研究機関は生体酸化ストレスマーカーを測定し、疾患との関係性について研究を進めている[2-14]。生体構成成分の酸化のなかでも、脂質の酸化は生体毒性の強い多種類のカルボニル化合物を生じるとされ、疾病防御の点から注目されている（Fig. 1）。脂質酸化ストレスマーカーとして汎用されているチオバルビツール酸反応物質（TBARS）の測定法は、これらカルボニル化合物を非特異的に測定し、マロンジアルデヒド（MDA）量に換算するものである[14]。TBA法以外にも脂質酸化マーカーとしてイソプロスタン[2-5]や4-HNE（ヒドロキシノネナール）などが測定されるが[11, 12]、これらは酸化一次生成物である脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）の分解化合物である[15]。そしてこのLOOHは生体内に発生するラジカルや一重項酸素によって生成する一方で、酸素添加酵素（リポキシゲナーゼ：LOXなど）によっても生成される[16-19]。すなわち、酸化二次生成物であるイソプロスタンの測定やTBARS法はラジカルや一重項酸素、酵素による酸化を区別できていないといえる。

ところで、LOOHはその生成機構（ラジカル酸化、一重項酸素酸化、酵素酸化）によって、生成する異性体の種類および生成量が異なることが知られている

（Fig. 2）[20-22]。ラジカル酸化は、不飽和脂質の二重結合にはさまれたメチレン水素（二重アリル水素）からの水素の引き抜きにより開始する（Fig. 3）。例えば、リノール酸では、11位のメチレン水素の選択的脱離とペンタジエン共鳴により 13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid、
13-hydroperxyoctadeca-9*E*, 11*E*-dienoic acid、
9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid、
9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoic acid の4種類が等量生じる。一重項酸素と脂質の反応では、一重項酸素が二重結合に親電子付加し、アリル水素の転

位と二重結合のトランス移動を伴う (Fig. 4)。つまり、リノール酸との反応では、9-位および 12-位の二重結合を形成する炭素に酸素分子が直接結合するため、13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid、12-hydroperxyoctadeca-13*E*, 9*Z*-dienoic acid、10-hydroperxyoctadeca-8*E*, 12*Z*-dienoic acid、9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid の 4 種の異性体が等しく生じる。代表的な酸素添加酵素である LOX は *cis*, *cis*-1, 4-ペンタジエン構造をもつ多価不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加する酵素であり、酸素挿入部位の違いにより 15-LOX や 5-LOX などが存在する。リノール酸と 15-LOX の反応では 13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid が、5-LOX との反応では 9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid がそれぞれ特異的に生成する。すなわち、どの LOOH がどれくらい生成しているかを精密に解析することで、生体内においてどのようなメカニズムで過酸化脂質が生成しているかを明らかにできると考えた。

ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) は血漿リポタンパク質の主要構成リン脂質であるホスファチジルコリンの一次酸化生成物である。Miyazawa らはこの PCOOH を高選択的に測定できる化学発光検出 (CL) -HPLC 法を開発し [23, 24]、脂質代謝異常症者の血中において PCOOH が有意に高まることを報告した (Fig. 5) [25, 26]。また、PCOOH が単球の血管内皮細胞の接着を促進する生理活性物質であることが示されるなど [27, 28]、PCOOH が生体内において重要な役割を果たしている可能性が見出されつつある [29]。しかし、前述したようにこの PCOOH も生体内ではどのように生成しているかは詳しくわかっていない。

以上の背景から、本研究では血中にもっとも多いリノール酸型 PCOOH (1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 16:0/HpODE PC) の異性体 [1-palmitoyl-2-(13-hydroperoxyoctadeca-9*Z*(*E*), 11*E*-dienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 16:0/13-HpODE PC、

1-palmitoyl-2-(9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*Z*(*E*)-dienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 16:0/9-HpODE PC] (**Fig. 6**) の精密定量に着目し、生体内における過酸化脂質生成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

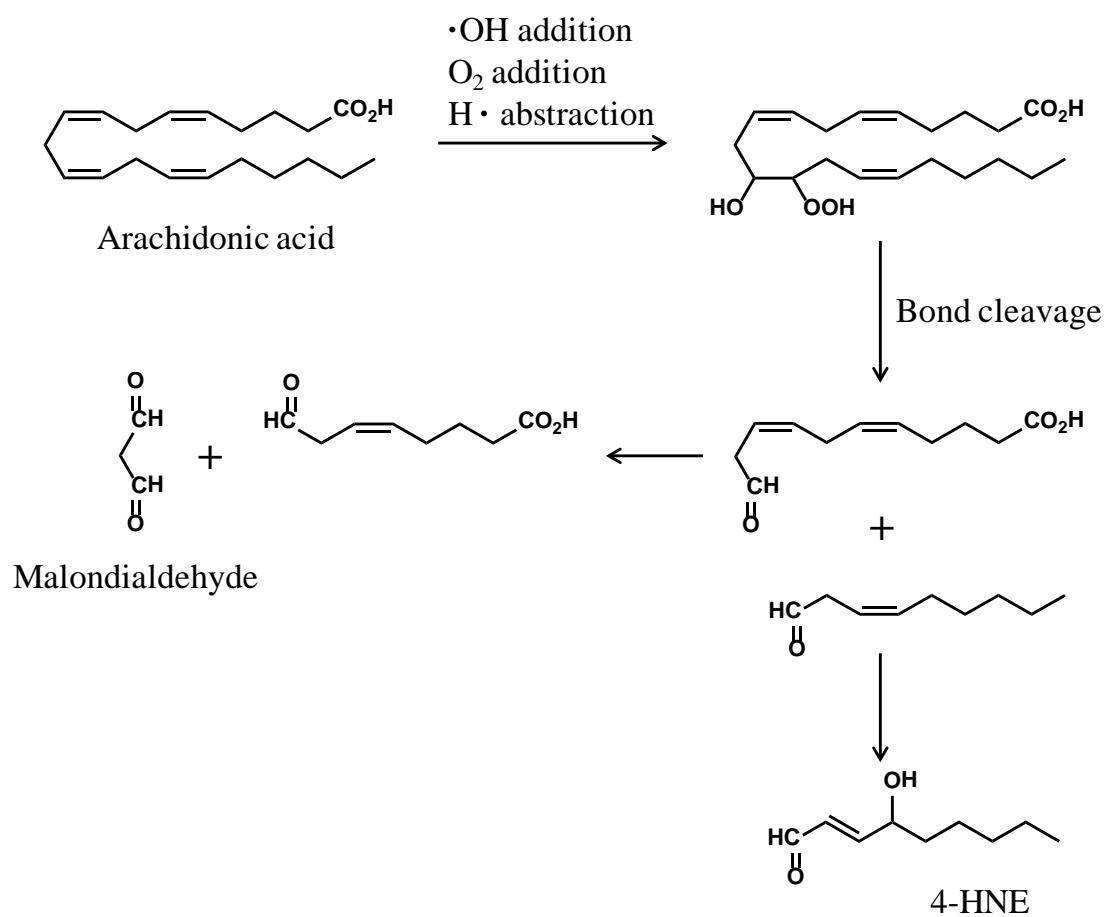


Fig. 1 Fatty acid peroxidation products.

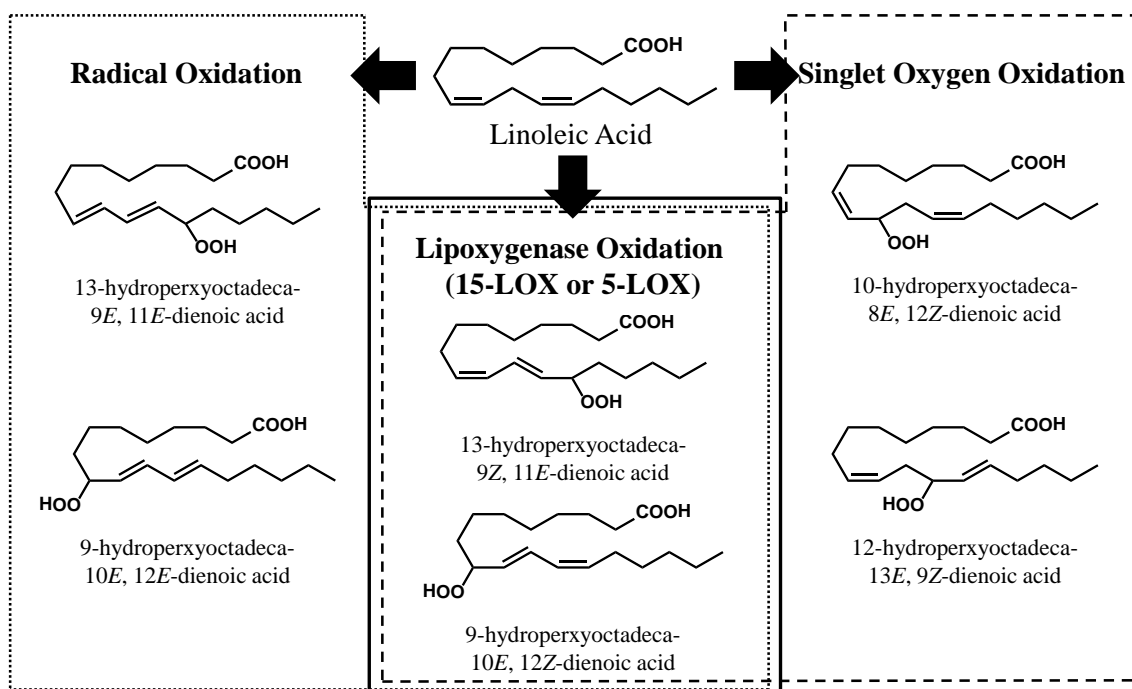


Fig. 2 Hydroperoxide positional isomers of linoleic acid. Peroxidation of fatty acid (linoleic acid) is initiated via radical-, enzymatic- (lipoxygenase), and singlet oxygen-oxidation to generate different isomers.

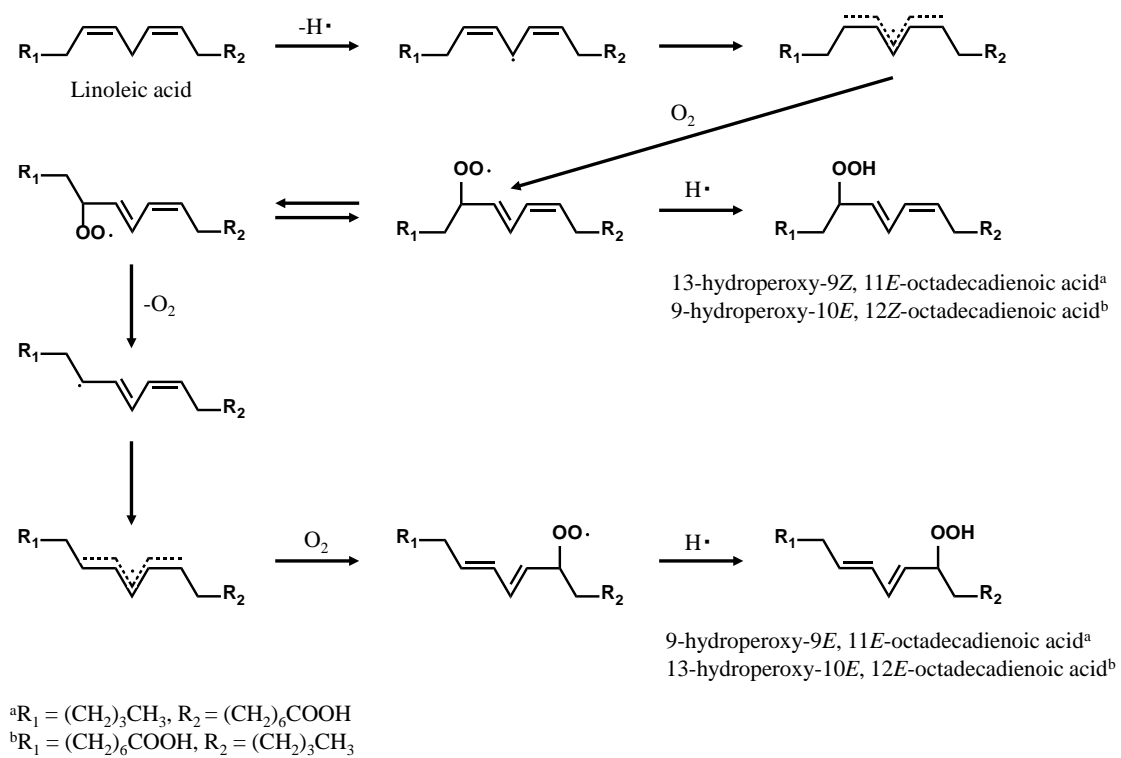


Fig. 3 Autoxidation mechanism for linoleic acid.

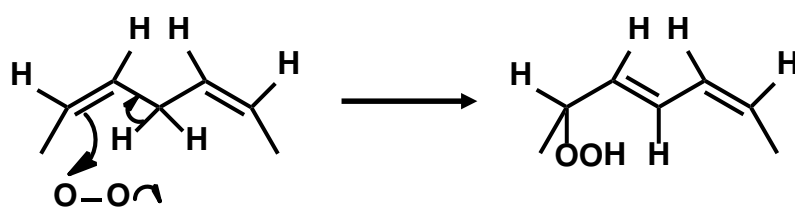


Fig. 4 Ene reaction mechanism for singlet oxygen-oxidation of diene.

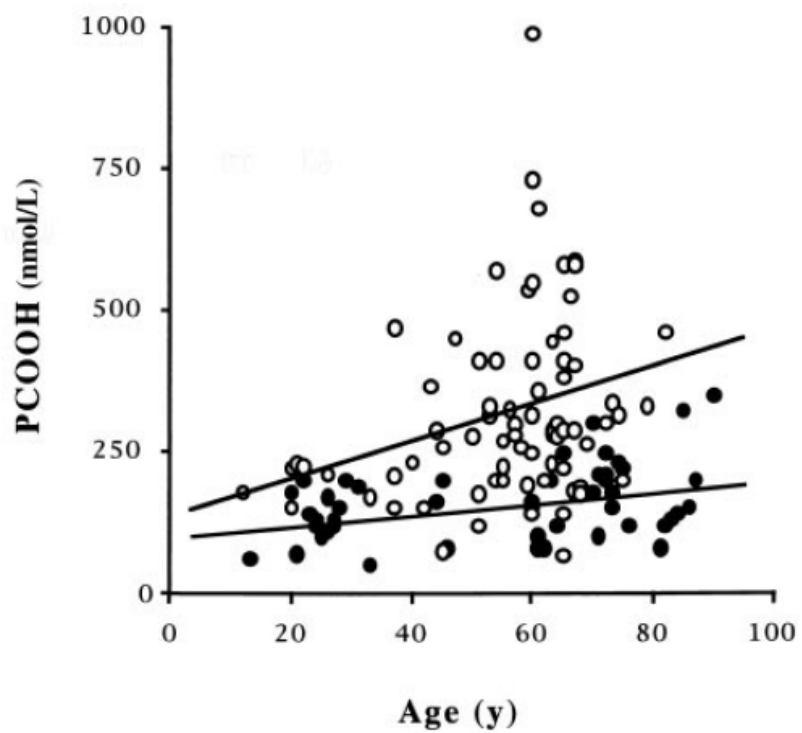


Fig. 5 Correlation between plasma PCOOH and age. ●, control subjects ($r = 0.392$; $P < 0.01$); ○, patients with hyperlipidemia ($r = 0.298$; $P < 0.01$).

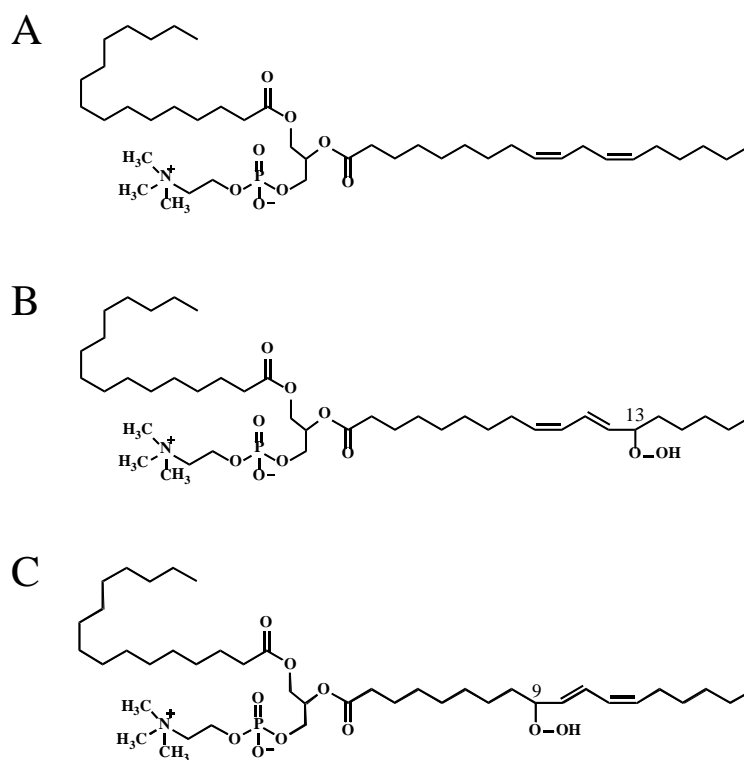


Fig. 6 Chemical structures of PC
 (1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 16:0/18:2 PC) (A),
 (1-palmitoyl-2-(13-hydroperoxyoctadeca-9 $Z(E)$,11 E -dienoyl)-*sn*-glycero-3-
 phosphocholine, 16:0/13-HpODE PC) (B), and
 (1-palmitoyl-2-(9-hydroperoxyoctadeca-10 E ,12 $Z(E)$ -dienoyl)-*sn*-glycero-3-
 phosphocholine, 16:0/9-HpODE PC) (C).

第1章 高純度 PCOOH 異性体標品調製法の確立

緒言

従来、血中過酸化リン脂質の分析は困難であるとされてきたが、その原因の一つとして、高純度 PCOOH 標品が市販していないことが挙げられる。そのため、過酸化脂質研究者は PCOOH 標品を各自調製する必要がある、調製ごとに純度や組成が一定しないことが懸念された。当研究室の Ibusuki らはビニルエーテル型分子 (2-Methoxypropene: MxP) が酸性条件下でヒドロペルオキシド基に付加する反応を応用し、高純度な PCOOH 標品 (95%) を調製する方法を開発した [30]。しかし、この方法は MxP 誘導化の際、まれに茶褐色の副産物が生成することが確認されており、PCOOH の収量を著しく低下させてしまうことが課題であった。そして、この副産物の生成には反応条件のなんらかのパラメーターが関与していると考えられたがその原因は不明であった。

また、過酸化脂質の標品の調製は目的の脂質を適当な方法 (酵素、ラジカル、一重項酸素) で酸化させた後に、HPLC を用いて分取するというのが専ら用いられる方法である [31]。この方法では主に逆相 HPLC が用いられるが、その目的は過酸化脂質と未酸化脂質などの分離であり、過酸化脂質の構造異性体はほとんど分離されていない。構造異性体の分離には一般的に吸着クロマトグラフィーであるシリカゲルなどが充填剤として用いられる。しかし、PCOOH はヒドロペルオキシドよりも極性の高いリン酸基を有するため、PCOOH をシリカゲルクロマトグラフィーに供しても、分離にはリン酸基の構造しかほとんど反映されない [32, 33]。すなわち、リン脂質の状態では PCOOH 異性体分離はほぼ不可能である。

これらのことから、本章では先ず、ヒドロペルオキシドと MxP の反応条件 (反応溶媒、触媒濃度、基質濃度) を再検討し、安定な PCOOH 調製方法の確立を目指した。また、構造に極性が大きい官能基を持たず、比較的異性体分離が容易な脂肪酸メチルエステルヒドロペルオキシド異性体を用いて PCOOH 異性体標品を合成しようとした。

第1節 安定・高収率な PCOOH 標品調製法の検討

1-1-1 目的

脂質ヒドロペルオキシド標品の調製法は目的となる脂質を適当な酸化方法（ラジカル、一重項酸素、酵素）で酸化した後、分取 HPLC など精製する方法がほとんどである[31]。そのため、ヒドロペルオキシドに極性の近い化合物（アルデヒド体やヒドロキシ体）が夾雑していることが懸念される。約 50 年前、Rigaudy らにより、ビニルエーテル型分子が酸性条件下でヒドロペルオキシド基に付加する反応が報告された[34]。その後、Porter らはこの反応を脂質に応用し、*trans*-2-phenylcyclohexyl 2-propen-2-yl ether を合成したことを報告している[35, 36]。当研究室の Ibusuki らは、ビニルエーテルとして 2-Methoxypropene (MxP)、触媒として pyridinium-*p*-toluenesulfonate (PPTS) を用いて、種々の高純度脂質ヒドロペルオキシド標品を調製した (Fig. 1-1A) [30]。このとき、MxP のヒドロキシ体やアルデヒド体との反応物は検出されず、MxP との反応物はヒドロペルオキシド由来のもの（パーケタール）のみが安定的に得られることを示唆した（ヒドロキシ体とも反応するが反応物は不安定）。また、MxP の反応により得られる付加体の極性が低下すること、それにより、パーケタールのみが選択的に得られることを利用し、PCOOH をはじめとする種々の脂質ヒドロペルオキシドの精製に応用できることを示した。しかし、本法はまれに、ヒドロペルオキシドと MxP の反応時に褐色の副産物が生成し (Fig. 1-1B)、収量が著しく低下 (0%~) することが確認されている。そして、この副産物の生成には反応条件のなんらかのパラメーターが関与していると考えられたがその原因は不明であった。

そこで、本節ではヒドロペルオキシドと MxP の反応条件（反応溶媒、触媒濃度、基質濃度）の再検討を行い、副産物生成の原因を明らかにするとともに、安定な PCOOH 調製方法の確立を目的とした。

1-1-2 方法

1-1-2-1 試薬成分

16:0/18:2 PCはAvanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) 製を用いた。ダイズリポキシゲナーゼ (15-LOX) はSERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)から購入した。また、2-methoxypropene (MxP) と pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) はそれぞれ和光純薬(Osaka, Japan)とSigma (St. Louis, MO, USA)から購入した。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

1-1-2-2 酸化PCの調製

PCOOH 標品調製には、生体膜構成リン脂質の中で最も多いとされる、1-Palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0/18:2-PC) を用いた。酸化PCの調製法はIbusukiらの方法を一部改良して用いた[30]。ホウ砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 19.068 gを1 Lの精製水に溶解した後、1 NのHClでpH 9.0に調整し、ホウ酸バッファーとした。そこに0.05%になるようにデオキシコール酸ナトリウム一水和物を溶解したものをデオキシコール酸バッファーとした。

三角フラスコに100 mgの16:0/18:2-PCをとり、そこにホウ酸バッファー95 mL、デオキシコール酸バッファー75 mLを加えた。スターラーでよく攪拌した後、 1.25×10^6 unitsの15-LOXを加えた。フラスコを25°C下、30 min攪拌しながら反応させた。反応後、0.1-1.0 N塩酸を溶液がうっすらと白濁するまで加えて(pH 6.0)、反応を停止させた。反応液を遠沈管に25 mLずつ分注したのち、それぞれにジエチルエーテル25 mLを加えて攪拌した。遠心分離(1,000 g、4°C、10 min)し、上層(ジエチルエーテル層)を回収した。この操作を2回繰り返して、得られたジエチルエーテルを4°C下で乾固させた。残渣をクロロホルムで回収した後、析出したデオキシコール酸を除くため、ブフナー漏斗で減圧濾過した。濾液を5 mLにメスアップし、得られたCrude PCOOHを以降の条件検討に用いた。

Crude PCOOHの総リン脂質含量を測定するため、溶液の一部をBartlettによ

るリン定量に供した[37]。これは脂質を分解して脂質分子中の有機リンを全て無機リンに誘導し、その無機リンを比色定量する方法である。5-10 μL の Crude PCOOH を試験管に分注し、200°Cのブロックヒーターで完全に乾固させた。続いて試験管に 70%過塩素酸水溶液 0.4 mL を加え、ビー玉で蓋をした後、リン脂質を 200°Cで 1 hr 以上加熱分解させた。室温まで冷却後、水 4.2 mL、5%モリブデン酸アンモニウム水溶液 0.2 mL、アミドール溶液 (20% 亜硫酸ナトリウム、1% 2,4-ジアミンフェノール塩酸塩) 0.2 mL を加え攪拌し、110°Cにて 7 min 加熱した。加熱後直ちに流水下で冷却し、吸光光度計 (UV-2400PC, 島津製作所社製) を用い 830 nm にて比色定量を行った。リン標品 (KH_2PO_4) についても同様の操作を行い、検量線を作成し、Crude PCOOH の総リン脂質含量を算出した。Crude PCOOH 中には PCOOH やその他の二次生成物、未酸化 PC が含まれているため、総リン脂質含量の算出には平均分子量として 780 を用いた。

続いて Crude PCOOH に含まれる PCOOH 含量を測定するため、Crude PCOOH の一部を LC-MS 分析に供した。LC-MS 構成および分析条件は以下のとおりである。

・ LC 構成

ポンプ : LC-20AD (島津製作所社製)

オートサンプラー : SIL-20AC (島津製作所社製)

カラムオープン : CT0-20A (島津製作所社製)

システムコントローラー : SCL-10AVP (島津製作所社製)

・ LC 条件

カラム : Atlantis T3 2.1 \times 100 mm, 3 μm (Waters 社製)

移動相 :

A : 水 (5 mM 酢酸アンモニウム)

B : メタノール (5 mM 酢酸アンモニウム)

グラジエント条件 :

min	0	4	10	17	30	30.1	35
B%	70	90	90	100	100	70	70

流速 : 0.2 mL/min

カラムオーブン : 40°C

• MS 条件

MS : 4000QTRAP (AB-SCIEX 社製)

Curtain gas (CUR) : 20

Ion spray (IS) : 5500

Temperature (TEM) : 600

Ion source gas (GAS1) : 40

Ion source gas (GAS2) : 40

Declustering Potential (DP) : 68

Collision Cell Exit Potential (CXP) : 10.8

1-1-2-3 酸化 PC と 2-Methoxypropene (MxP) の反応条件の検討

様々な条件下 (溶媒、PPTS 濃度、リン脂質濃度、MxP 濃度) で、Crude PCOOH と MxP の反応を行った。反応には 1-1-2-2 で得られた Crude PCOOH を用いた。0.01-5.0 mg の Crude PCOOH (0.006-3.2 mg PCOOH を含む) を 0.01-10 μ mol PPTS を含む 100 μ L の溶媒中で 150-500 μ mol の MxP と反応させた。反応はクロロホルム、ジクロロメタン、メタノール、アセトニトリル中で行った。溶液を 4°C で反応させ、0、1、3、6、12、24 hr 後に溶液の一部を UV-HPLC に供し、PCOOMxP の生成量を算出した。UV-HPLC 条件は以下のとおりである。

• LC 構成

ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco 社製)

カラムオーブン : CO-2065 Plus (Jasco 社製)

検出器 : UV-2075 Plus (Jasco 社製)

インテグレータ : SmartChrom (KYA TECH Corporation 社製)

• LC 条件

カラム : Chromolith Fast Gradient RP-18e, 2.0 \times 50 mm (Merck 社製)

移動相：メタノール/水=100/15 (5 mM 酢酸アンモニウム)

流速：2.0 mL/min

カラムオーブン：40°C

波長：234 nm

検討結果から MxP 付加反応条件を最適化し、最適条件下で Crude PCOOH (93 mg の総リン脂質を含む) の MxP 付加反応を行った。反応後、溶媒置換を行うため、得られた反応物を固相抽出に供した。12 mL のクロロホルムで平衡化させた Sep-Pak Vac 6 cc (1 g) NH₂ cartridge (Waters 社製) にサンプルをそのままロードし、12 mL のクロロホルムで洗浄した。洗浄した後 24 mL のメタノールで PCOOMxP を含む全てのリン脂質を溶出させた。溶出物をエバポレーターで乾固し、乾固物を 5 mL のメタノールに再溶解した。サンプルを分取 HPLC に供し、PCOOMxP のピークを分取した。分取 HPLC 条件は以下のとおりである。

・ LC 構成

ポンプ：LC-6AD (島津製作所社製)

カラムオーブン：CTO-10A (島津製作所社製)

システムコントローラー：SCL-10A vp (島津製作所社製)

検出器：SPD-20A (島津製作所社製)

スイッチングバルブ：FCV-20AH₂ (島津製作所社製)

インテグレーター：IATRORECORDER TC-21 (システムインスツルメンツ社製)

・ LC 条件

カラム：Wakosil-II 5C18 RS-Prep, 5 μm, 20 × 250 mm; (和光純薬社製)

移動相：メタノール/水=100/5 (5 mM 酢酸アンモニウム)

流速：10.0 mL/min

カラムオーブン：40°C

波長：234 nm

集められた分取液から移動相の塩を取り除くため、分取液を Sep-Pak Vac 12 cc (2 g) C18 cartridge (Waters 社製) を用いて精製した。カラムを 12 mL の 75% メタノールで平衡化し、75% メタノールになるように調製したサンプルをロードした。カラムを 75% メタノールで洗浄した後、メタノール 24 mL で溶出した。溶出液を濃縮・乾固した後、1 mL のクロロホルムに溶解し、リン定量(1-1-2-2 参照、MW=862)により、PCOOMxP 濃度を決定した。

1-1-2-4 PCOOMxP からの PCOOH 再生条件の検討

様々な条件下(溶媒、PPTS 濃度、リン脂質濃度)で、PCOOMxP の再生反応を行った。反応には 1-1-2-3 で得られた PCOOMxP を用いた。0.01-5.0 mg PCOOMxP を 0.01-10 μmol PPTS を含む 100 μL の溶媒中で反応させた。反応はクロロホルム、ジクロロメタン、メタノール、アセトニトリル中で行った。溶液を 4°C で反応させ、0、1、3、6、12、24 hr 後に溶液の一部を UV-HPLC に供し、PCOOH の再生量を算出した。UV-HPLC 条件は 1-1-2-3 と同じものを用いた。

検討結果から PCOOH 再生条件を最適化し、最適条件下で 50 mg PCOOMxP の PCOOH 再生反応を行った。再生反応後、1-1-2-3 と同様に Sep-Pak Vac 12 cc (2 g) C18 cartridge を用いて、サンプルの濃縮を行った。濃縮した溶出液を分取 HPLC に供し PCOOH のピークを回収した。分取 HPLC 条件は 1-1-2-3 と同じものを用いた。

回収した溶液から移動相に含まれる酢酸アンモニウムを取り除くため Folch 法[38]を用いて PCOOH を抽出した。クロロホルム/メタノール/水 = 8/4/3 (v/v/v)になるようにクロロホルムと水を加え、よく攪拌した。下層(脂質層)を回収した後、上層に下層と同量の Folch 理論下層(クロロホルム/メタノール = 10/1 (v/v))を加え、再度抽出を行った。遠心分離後の下層を先の下層と合わせ、ロータリーエバポレーターで乾固し、乾固物を 1 mL のクロロホルムに溶解した。溶液の一部を LC-MS およびリン定量(1-1-2-2 参照、MW = 790)に供し、PCOOH の純度と濃度を決定した。

1-1-3 結果と考察

1-1-3-1 酸化 PC の調製

Ibusuki らの報告では酵素酸化条件を 40°C、12 hr に設定し [30]、酵素酸化で生じたヒドロペルオキシドを基質としてラジカル酸化も同時に進め、PCOOH の収率を上げていた。本法ではリポキシゲナーゼの特異性を重視し、反応条件は 25°C、30 min とした。ダイズリポキシゲナーゼ (15-LOX) によって酸化された Crude PCOOH を LC-MS 分析に供したところ (m/z 100-1000)、TIC クロマトグラム上で PCOOH は 17 min に検出された (Fig. 1-2A)。また、そのほかの酸化 PC (6-10 min : truncated PC など) や未酸化 PC (22 min) も同時に検出された。このクロマトグラムおよびリン定量の結果から、総リン脂質量は 93 mg であり、そのうち 59 mg が PCOOH であると概算された。本実験では上述したようにより温和な条件で酸化を進めた。酵素の特異性を重視しないのであれば、さらに高温かつ長時間反応させることで、PCOOH の収率を高められると思われた。

1-1-3-2 酸化 PC と 2-Methoxypropene (MxP) の反応条件の検討

本検討では HPLC 分析の際に PCOOMxP から PCOOH の再生が懸念されたため、モノリス型高速分析カラムを用いた。モノリスカラムとは三次元ネットワーク状の骨格とその空隙が一体となった構造を持っており、低背圧・高流速で分析できるカラムである [39-41]。このカラムを用いた UV-LC 分析 (234 nm) により、PCOOH は 0.9-1.0 min に検出された (Fig. 1-2B: Peak A)。一方で PCOOMxP は 2.1-2.6 min にかけて数本のピークとして検出された (Peak B)。本節では酵素酸化反応条件を 25°C、30 min と設定したが、それでも少なからずラジカル酸化も同時に進んでいたと考えられる。そのため、この PCOOMxP のピークには 4 つの異性体、すなわち 16:0/13-hydroperxyoctadeca-9Z, 11E-dienoyl PC, 16:0/13-hydroperxyoctadeca-9E, 11E-dienoyl PC, 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10E, 12Z-dienoyl PC, 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10E, 12E-dienoyl PC のそれぞれ MxP 付加体が含まれていると予想される。本検討ではこれら 4 種類の異性体の総量を PCOOMxP として計算に用い、付加反応効率 (Derivatization efficiency) = Peak B area

/ (Peak A area + Peak B area) × 100 (%)と定義した。

溶媒の MxP 付加反応への影響を **Fig. 1-2C** に示した。PCOOH と MxP の付加反応効率はジクロロメタンとクロロホルムでほぼ同程度、メタノールでもっとも低かった。一方で、アセトニトリル中では過剰なリン脂質が析出してしまい、PCOOH の大量合成には向かないと考えられた。そして、いずれの溶媒においても、反応時間を延長させても付加反応効率はほとんど変わらなかったため、反応時間は 1 hr とした。また、溶媒の毒性・環境負荷などを考慮して、反応にはクロロホルムを用いることにした。

続いて、触媒 (PPTS) 濃度と総リン脂質濃度の検討を行ったところ (**Fig. 1-2D**)、これらの要素が反応効率に大きく影響を及ぼすことがわかった。すなわち、PPTS 濃度の増加に伴い反応効率は大きく上昇する一方で、総リン脂質濃度の増加は反応を抑制させた。これらの組み合わせの中に良好な反応効率が得られる組み合わせがあったが、そのうちのいくつかでは褐色物質の生成も確認できた。褐色物質を生成した組み合わせは、反応効率こそ良好であったものの、生成した PCOOMxP 絶対量は減少していた (Data not shown)。さらに、1.0-5.0 mg 総リン脂質、1-10 μmol PPTS の組み合わせでは褐色物質は生成しなかったが、反応効率も 40% と低かった。これらの結果から、褐色物質の生成は反応が進みすぎた結果生じたものであり、反応を抑えるためには PPTS 濃度を下げるか、リン脂質濃度を上げればよいことがわかった。

次に 1.0-5.0 mg 総リン脂質の系でも反応効率を上げるため、もう一つの基質である MxP の濃度を検討した (**Fig. 1-2E**)。その結果、300-500 μmol の MxP 添加により反応効率をほぼ 100% にすることができた。また、MxP 濃度は褐色物質の生成には影響を与えないことがわかった。

これらの結果をもとに最適な MxP 付加条件を決定した。93 mg の Crude PCOOH を 9.3 mmol MxP と 186 μmol PPTS を含む 1.86 mL のクロロホルム中で反応させた (4°C、1 hr)。

クロロホルムは逆相分取 HPLC に流せなかったため、固相抽出による溶媒置換を行った後、メタノールに溶かした PCOOMxP 付加体を分取 HPLC にて精製した。

固相抽出によりサンプル溶媒を少なくすることができたため、分取 HPLC における分離が向上し、また短時間で大量に分取することが可能となった。得られた高純度 PCOOMxP 付加体を以降の PCOOH 再生反応条件の検討に用いた。

1-1-3-3 PCOOMxP からの PCOOH 再生条件の検討

再生条件の検討にも 1-1-3-2 同様にモノリス型カラムを用いた。MxP 付加体は酸性条件でヒドロペルオキシドを再生するが、ヒドロペルオキシドは酸性条件下では時間経過で徐々に分解されるため[42]、本検討では特に反応時間に焦点をあてた。1-1-3-2 と同じく 4 種の異性体の総量を PCOOMxP および PCOOH として計算した。再生反応効率を (Regeneration efficiency) = Peak A area / (Peak A area + Peak B area) × 100 (%) と定義した。

再生反応効率はメタノール、クロロホルムの順に高く、ジクロロメタンはクロロホルムとほぼ同程度であった (Fig. 1-3A)。PCOOH の再生反応効率は反応時間とともに増加したが、24 hr では PCOOH 絶対量は減少していた (Data not shown)。これは上記のように酸で PCOOH が分解したためと考えられる。また、MxP 付加反応時と同様にアセトニトリルはリン脂質溶解度の低さから使用できなかった。以上の結果から再生反応溶媒はメタノールとし、反応時間は 12 hr とした。

再生反応効率は PPTS 量に比例したが (Data not shown)、再生した PCOOH の分解も進みやすかった。一方で PCOOMxP 濃度は再生反応効率に影響を与えなかった (Fig. 1-3B)。

これらの結果をもとに再生反応条件を最適化した。50 mg PCOOMxP を 50 mL メタノール中で 500 μmol の PPTS と反応させた (4°C、12 hr)。反応物を分取 HPLC と Folch 抽出を用いて精製した。Sep-Pak による精製はどうしても精製に水を用いるため、濃縮に温度をあげる必要があり、PCOOH の分解が懸念された。また、Sep-Pak の Lot No. によって白色の粉末も溶出してくることも確認されており

(原因不明、メタノールに易溶、クロロホルムに難溶)、これらが PCOOH の純度に影響を与えるのを避けるため、最後の精製には Folch 法を採用した。精製されたサンプルを LC-MS 分析に供したところ、17 min に単一のピークが検出され、

マススペクトルからも高純度ヒドロペルオキシドであることが確認できた (Fig. 1-3C)。本節では 15-LOX を用いて主に (70% >)

16:0/13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoyl PC を含む PCOOH 標品調製した。

しかし、上述したようにこの PCOOH には他の 3 種類の異性体

(16:0/13-hydroperxyoctadeca-9*E*, 11*E*-dienoyl PC,

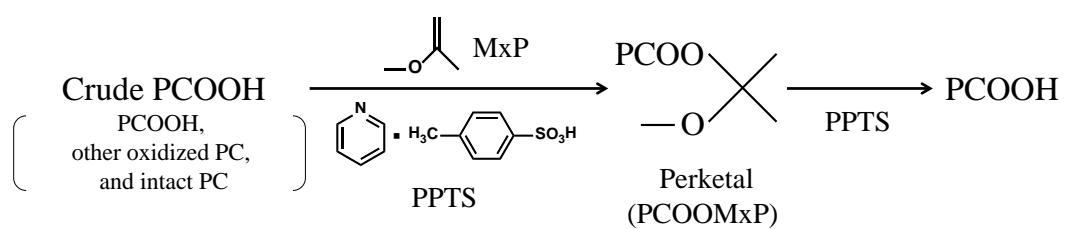
16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoyl PC,

16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoyl PC) もわずかに含まれていると予想される。また、リン定量の結果、本法の収率はおよそ 30% であった。

1-1-4 結論

MxP を用いたヒドロペルオキシドの誘導化の際にはリン脂質濃度と PPTS 濃度の組み合わせが重要であることがわかった。すなわちリン脂質濃度が高いと反応は進まず、一方で PPTS 濃度が高いと褐色物質が生成することがわかった。また、これらの褐色物質は MS 解析から重合化合物であると予想された。そして、PCOOH の再生反応は PPTS による分解も同時にすすむため、反応時間に注意する必要があった。最適化された条件では従来の方法 (~10%) に比べ、より高収率 (30~40%) で PCOOH を得ることができた。今回、リン脂質溶解度が低いアセトニトリルは採用しなかったが、PPTS 濃度を調整すれば低リン脂質濃度でも反応が進むことを確認している。しかし、アセトニトリルは反応溶媒を低温に置いた際に脂質が析出し、脂質濃度が下がり褐色物質が生成することも確認されているため、十分に注意が必要である。また、今回の結果はリン脂質だけでなく、遊離脂肪酸、脂肪酸メチルエステルヒドロペルオキシド調製にも応用が可能であることを確認した。本法により、脂質ヒドロペルオキシドをより安定・高収率かつ短時間で調製することが可能となった。

A



B



Fig. 1-1 Scheme for the preparation of PCOOH using MxP. Procedure for the preparation of PCOOH (A). The procedure includes protecting the hydroperoxide group as a perketal (PCOOMxP) using MxP, followed by subsequent regeneration of PCOOH from PCOOMxP. The reaction has unexpectedly provided unknown brown byproducts at times (B).

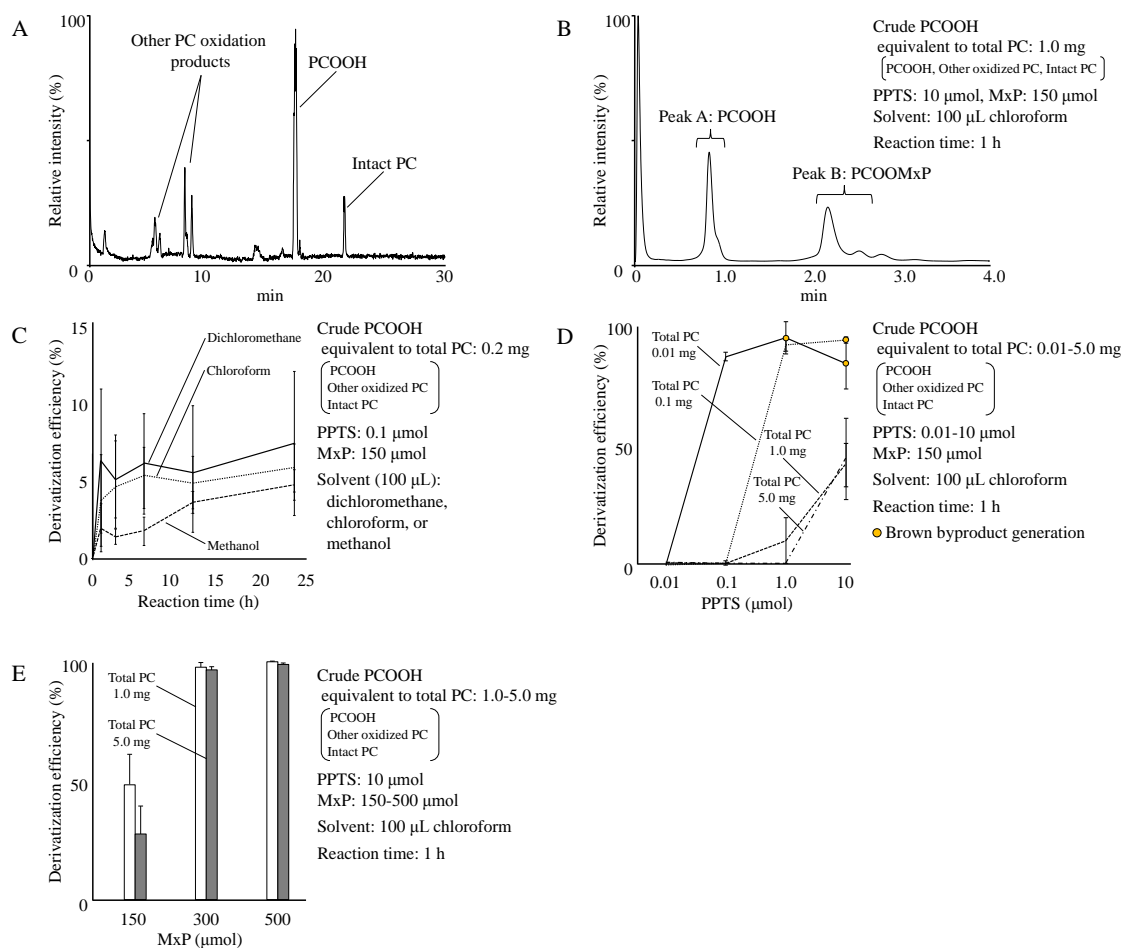


Fig. 1-2 Reaction between crude PCOOH and MxP in the presence of PPTS, and the effect of the reaction conditions on PCOOMxP formation. First, 16:0/18:2 PC (100 mg) was oxidized by LOX-1 at 25°C for 30 min to prepare crude PCOOH, and the resultant crude PCOOH was analyzed by LC-MS (A). Then, crude PCOOH (equivalent to 0.01-5.0 mg of total PC) was reacted with 150-500 μmol MxP in 100 μL of chloroform, dichloromethane, methanol or acetonitrile containing 0.01-10 μmol catalytic PPTS. Reaction products were analyzed by LC-UV at 234 nm, and a typical chromatogram was shown (B). Figures representing the effect of different reaction solvents (C) and total PC, PPTS, and MxP concentrations (D, E) on PCOOMxP formation. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$).

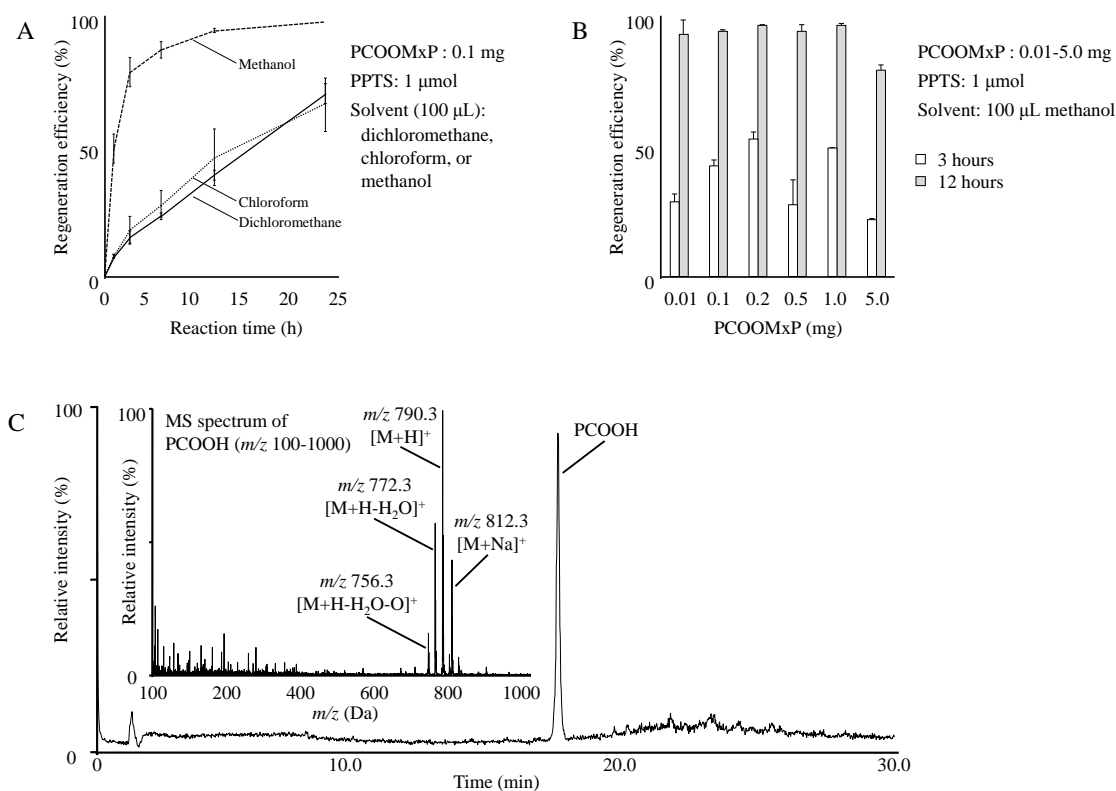


Fig. 1-3 Reaction between PCOOMxP and PPTS, and the effect of the reaction conditions on PCOOH release. PCOOMxP (0.01-5.0 mg) was treated with 1 μ mol PPTS in 100 μ L of chloroform, dichloromethane, methanol or acetonitrile at 4°C for 0-24 hr. Reaction products were analyzed by LC-UV at 234 nm. Figures representing the effect of different reaction solvents (A) and PCOOMxP concentrations (B) on PCOOH release. The obtained PCOOH was analyzed by LC-MS (C). Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

第 2 節 PCOOH 構造異性体標品調製法の確立

1-2-1 目的

一般的に PCOOH 標品の調製には 3 種類の酸化方法が用いられる。すなわち、酵素酸化法、ラジカル酸化法および一重項酸素酸化法であり、これらの方法により酸化された PCOOH はヒドロペルオキシドの結合位置が異なるヒドロペルオキシド位置異性体を含むことが知られている [20-22]。酵素酸化法は酵素が存在しない位置異性体は調製できないという欠点はあるが [43]、脂肪酸の酸素添加部位に非常に高い特異性を持つという特徴がある。一方でラジカル酸化法や一重項酸素酸化法は、酸素添加部位にほとんど特異性を持たないため、酵素で調製できない位置異性体の調製も可能である。

しかし、ラジカル酸化法や一重項酸素酸化法では複数のヒドロペルオキシド位置異性体の混合物を生成するため分離精製が課題となる。一般的に異性体の分離には吸着クロマトグラフィーであるシリカゲルなどが充填剤に用いられる。しかし、PCOOH はヒドロペルオキシドよりも極性の高いリン酸基を有するため、シリカゲルクロマトグラフィーでは PCOOH のヒドロペルオキシドの位置が全く反映されず [32, 33]、位置異性体の分離はほぼ不可能である。1993 年 Kondo らはリン脂質ではなく、脂肪酸メチルエステルのヒドロペルオキシド位置異性体をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離したことを報告している [44]。また、Baba らは 15-LOX で調製した 13-HpODE と LysoPC から PCOOH を合成する方法を報告している [45]。これらのことから、適切な酸化方法の選択および位置異性体を確りと分離し LysoPC へ合成することで、いずれの PCOOH 位置異性体標品も高純度に調製できると考えられた。

生体内にはリノール酸型 PCOOH のなかでも、酵素酸化、ラジカル酸化、一重項酸素酸化のいずれにおいても生成する 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC がもっとも多く存在すると考えられるため、この 2 つの異性体の調製が重要と考えられる。16:0/13-HpODE PC 標品は第 1 節に示したように 15-LOX を用いて優先的に調製することができる。一方でもう一つの異性体である 16:0/9-HpODE PC は 5-LOX を用いて調製しなければならないが、リン脂質状態でのリノール酸の 9

位酸化は困難であることがわかった。おそらくリノール酸の 9 位はリン脂質の奥まった部位にあるため、5-LOX がリノール酸の 9 位に配位しにくいとためと考えらる。第 1 節では MxP を用いることで、安定して脂質ヒドロペルオキシドを調製する方法を確立した。本節ではそれを用いて、酵素 (5-LOX) が作用しやすいリノール酸から高純度な 9-HpODE を調製し[46, 47]、LysoPC に合成する方法を確立しようと試みた[45]。さらに、今後酵素が存在しない位置異性体も必要になることが予想されたため、リノール酸メチルエステルのラジカル酸化により種々の脂肪酸ヒドロペルオキシド位置異性体を調製し、分離精製した後に LysoPC へ合成してみることにした。

1-2-2 方法

1-2-2-1 試薬成分

ジャガイモは市販のものを用いた。リノール酸メチルエステルは Sigma-Aldrich 社製、LysoPC (16:0) は Avanti Polar Lipids, Inc. 社製を用いた。リノール酸、*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide、dimethylaminopyridine は和光純薬から購入した。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

1-2-2-2 ジャガイモリポキシゲナーゼ (5-LOX) の調製

ジャガイモの 5-LOX 抽出は Sekiya らの方法を応用した [48]。市販のジャガイモ 300 g の皮を剥き、表面をよく洗った後、2 mM アスコルビン酸と 2 mM のピロ亜硫酸ナトリウムを含む 180 mL のリン酸緩衝液 (pH 4.5) 中でホモジナイズした。ホモジネートを 4 層ガーゼを用いて減圧濾過した後、濾液を遠心分離に供し (10,000 × g、4°C、20 min)、上澄みを回収した。上澄みを氷上で冷やしながらよくすり潰した硫酸 26 g を少しずつ加えた。しばらく静置した後、遠心分離 (10,000 × g、4°C、20 min) により沈殿物を取り除いた。上清には再び 28 g の硫酸をゆっくりと加え、遠心 (10,000 × g、4°C、20 min) により得られた沈殿物 (硫酸沈殿 25~50% 画分) を回収した。沈殿物を少量のリン酸バッファー (pH 6.3) に溶解させ、酵素液とした。

1-2-2-3 5-LOX による 9-hydroperoxy-octadecadienoic acid (9-HpODE) の調製

あらかじめ 27°C に温めた 80 mL のリン酸バッファー (pH 6.3) にリノール酸 80 μL を加え、溶液が白く濁るまで超音波処理と攪拌を繰り返した。その後溶液に 1-2-2-2 で得られた酵素液を加え 27°C で 30 min 反応させた。

反応終了後、反応溶液を分液漏斗に移し、80 mL のジエチルエーテルを加えよく攪拌した。4°C でしばらく静置・分離させた後、下層を三角フラスコに移し、上層を遠沈管に移した。遠沈管を遠心分離に供し (1,000 × g、4°C、10 min)、ジエチルエーテル層を回収した。この操作を 2 回繰り返し、得られたジエチル

エーテル層を 4°C 下でロータリーエバポレーターを用いて乾固させた。得られた乾固物を 500 µL のクロロホルムに溶解し、Crude 9-HpODE とした。得られた Crude 9-HpODE 溶液の一部を LC-TOF-MS/MS に供し、その生成を確認した。LC-TOF-MS/MS 条件は以下の通りである。

・ LC 構成

ポンプ : LC-30AD (島津製作所社製)
オートサンプラー : SIL-30AC (島津製作所社製)
カラムオーブン : CT0-20AC (島津製作所社製)
システムコントローラー : CBM-20A (島津製作所社製)
スイッチングバルブ : FCV-20AH₂ (島津製作所社製)
インテグレーター : micrOTOF Control (Bruker Daltonics 社製)

・ LC 条件

カラム : Atlantis T3 2.1×100 mm, 3 µm (Waters 社製)

移動相 :

A : 水 (5 mM 酢酸アンモニウム)

B : メタノール (5 mM 酢酸アンモニウム)

グラジエント条件 :

min	0	10	15	15.1	20
B%	70	100	100	70	70

流速 : 0.2 mL/min

カラムオーブン : 40°C

・ MS 条件

MS : micrOTOFQ II-TAG (Bruker Daltonics 社製)

Capillary : 5500 V

Nebulizer : 1.6 bar

Dry Gas : 8.0 L/min
Dry Temp : 200°C
Collision Energy : 20.0 eV
Collision RF : 230.0 Vpp
Transfer Time : 50.0 μs
Pre Plus Storage : 8.0 μs

Precursor ion : m/z 335 [M+Na]⁺

1-2-2-4 5-LOX による 9-HpODE MxP 付加体の調製

第1節で確立した方法を応用して、9-HpODE MxP 付加体の精製を行った。1-2-2-3 で得られた Crude 9-HpODE 47 mg を 31 mL のアセトニトリルに溶解させた (1.5 mg/mL)。31 μmol の PPTS および 3 mL の MxP を加え、氷上で 1 hr 反応させた。反応後 30 mL の水を加え反応を停止させた。反応溶液を 30%メタノールで平衡化された Sep-Pak Vac 12 cc (2 g) C18 cartridge に供した。カラムを 30%メタノールで洗浄後、メタノールで 9-HpODE MxP 付加体を含む脂肪酸画分を溶出させた。溶出液を濃縮・乾固したのち、25 mL の 70%メタノールに溶解した。分取 HPLC を用いて、9-HpODE MxP 付加体のピークを回収した。分取 HPLC 条件は以下の通りである。

・ LC 構成

ポンプ : LC-6AD (島津製作所社製)
カラムオーブン : CTO-10A (島津製作所社製)
システムコントローラー : SCL-10A vp (島津製作所社製)
検出器 : SPD-20A (島津製作所社製)
インテグレータ : IATRORECORDER TC-21 (システムインスツルメンツ社製)

・ LC 条件

カラム : Wakosil-II 5C18 RS-Prep, 5 μm, 20 × 250 mm; (和光純薬社製)

移動相：メタノール/水=100/40 (5 mM 酢酸アンモニウム)

流速：10.0 mL/min

カラムオーブン：40°C

波長：234 nm

回収した溶液を上記同様に Sep-Pak Vac 12 cc (2 g) C18 cartridge で精製を行い、得られた高純度 9-HpODE MxP 付加体を 1 mL のクロロホルムに溶解させた。

1-2-2-5 ラジカル酸化による 13-HpODE MxP 付加体と 9-HpODE MxP 付加体の調製

1 g のリノール酸メチルエステルを三角フラスコ内で薄膜状にし、40°C で 24 h ラジカル酸化させ、13-HpODE メチルエステル (13-HpODE Me) および 9-HpODE メチルエステル (9-HpODE Me) を含む酸化物を得た。得られた酸化物を 10 mL のヘキサンに溶解し、分取 HPLC に供した。LC 構成は 1-2-2-4 と同じものを用いた。分取 HPLC 条件は以下の通りである [44]。

・LC 条件

カラム：SILICA、10 mm I.D. × 250 mm、5 μm (SHISEIDO 社製)

移動相：ヘキサン/イソプロパノール=100/0.3

流速：10 mL/min

カラムオーブン：40°C

波長：234 nm

13-HpODE Me と 9-HpODE Me に相当するピークを別々に分取し、分取液をロータリーエバポレーターで乾固させた (4°C)。得られた 13-HpODE Me と 9-HpODE Me のヒドロペルオキシド基を 1-2-2-4 と同様に MxP で保護し、Sep-Pak を用いて精製し、Crude な 13-HpODE Me MxP 付加体および 9-HpODE Me MxP 付加体を得た。

続いてアルカリ条件下で 13-HpODE Me MxP 付加体と 9-HpODE Me MxP 付加体の

鹼化を行った[49]。13-HpODE Me MxP 付加体と 9-HpODE Me MxP 付加体を 0.8 mg/mL になるようにメタノールに溶解し、そこに 0.04 倍量の 33% KOH 水溶液を加えた。混合液を 40°C の恒温槽に入れ 1.5 hr 反応させた。反応前および反応後の溶液の一部を UV-HPLC 解析に供し、反応の進み具合を確認した。UV-HPLC 条件は以下の通りである。

・LC 構成

ポンプ : LC-30AD (島津製作所社製)
オートサンプラー : SIL-30AC (島津製作所社製)
カラムオーブン : CT0-20AC (島津製作所社製)
システムコントローラー : CBM-20A (島津製作所社製)
検出器 : SPD-20A (島津製作所社製)
インテグレータ : micrOTOF Control (Bruker Daltonics 社製)

・LC 条件

カラム : Chromolith Fast Gradient RP-18e, 2.0 × 50 mm (Merck 社製)

移動相 :

A : 水 (5 mM 酢酸アンモニウム)

B : メタノール (5 mM 酢酸アンモニウム)

グラジエント条件 :

min	0	3	10	12	12.1	15
B%	50	50	80	100	50	50

流速 : 1.0 mL/min

カラムオーブン : 40°C

波長 : 234 nm

鹼化後、等量の水を加え、Sep-Pak Vac 12 cc (2 g) C18 cartridge を用いて溶媒置換を行った。溶出液を乾固した後、移動相に合わせ 70%メタノールに溶

解した。溶かしたサンプル溶液を分取 HPLC 供し、それぞれ 13-HpODE MxP と 9-HpODE MxP に相当するピークを回収した。分取 HPLC は 1-2-2-4 と同様の条件を用いた。得られた 13-HpODE MxP 付加体、9-HpODE MxP 付加体はそれぞれ 1 mL のクロロホルムに溶解した。

1-2-2-6 脂肪酸ヒドロペルオキシドと LysoPC の合成

1-2-2-4 と 1-2-2-5 で得られた脂肪酸ヒドロペルオキシド MxP 付加体と LysoPC の合成を行った[45]。酵素酸化もしくはラジカル酸化で得られた 10 mg の 9-HpODE MxP 付加体と 8.42 mg の LysoPC (16 : 0) を、2 つ口フラスコに混ぜ合わせ、ロータリーエバポレーターで乾固した。少量のベンゼンを加え、残った水分を共沸させた。この共沸操作を 3 回繰り返した後、さらにフラスコをアスピレーターで 30 min 吸引し、完全に乾固させた。なお、この操作以降、フラスコ内部を空気中の水分と接触させないように、フラスコ内部を窒素ガスで置換した。窒素気流下で、20.2 mg の *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide と 5.72 mg の dimethylaminopyridine を加え、さらにモレキュラーシーブス 3A で十分脱水したクロロホルム 674 μ L を加えた。窒素充填した風船でフラスコに栓をし、常温で 24 hr 攪拌しながら反応させた。反応終了後、1-1-2-3 と同様に Sep-Pak Vac 6 cc (1 g) NH_2 cartridge を用いて溶媒置換を行い、分取 HPLC・固相抽出 (1-1-2-3 項参照) により PCOOMxP の精製を行った。なお 13-HpODE MxP 付加体についても、これと同様の操作を行った。

1-2-2-7 PCOOH の再生

合成して得られた PCOOMxP は 1-1-3-3 の方法に従って、ヒドロペルオキシドを再生した。分取 HPLC・Folch 抽出 (1-1-2-3 項参照) により得られた PCOOH を MS および LC-MS 解析に供した。また、リン定量 (1-1-2-2 項参照) により濃度決定を行った。

1-2-3 結果と考察

1-2-3-1 ジャガイモ 5-LOX による 9-HpODE MxP 付加体の調製

5-LOX は活性が低く、高価かつ活性が非常に不安定なため、本研究ではジャガイモから 5-LOX を抽出することにした[48, 50]。5-LOX の最適 pH が酸性であるため、脂肪酸はどうしてもミセル状にして溶かさなければならない。界面活性剤として Tween 20 を使用した報告もあるが[50]、過剰な Tween 20 は酵素を失活させること[51]、除去が難しいことから、本法では採用しなかった。リノール酸のジャガイモ 5-LOX 反応物を LC-MS 分析に供したところ、9-HpODE が特徴的に生成していることが確認できた (Fig. 1-4)。13-HpODE もわずかに検出されていたが、第 1 節でも述べたように、酵素反応はどうしても室温以上で行う必要があるため、本条件下でも酵素酸化産物を基質としてラジカル酸化が進んでしまったと考えられる。

得られた 9-HpODE のヒドロペルオキシド基を保護するため、第 1 節で確立させた方法を応用して MxP と反応させた。しかし、脂肪酸の場合、クロロホルム中で反応を行った後の溶媒置換が非常に困難であったため、反応溶媒にはアセトニトリルを用いた。リン脂質と同じくアセトニトリルの脂肪酸溶解度が低かったため、PPTS 濃度を低くし、また脂肪酸濃度も最適な濃度に調整した。また、反応溶液に水を加え ODS に保持させることで、溶媒置換を行うことができた。溶出液を分取 HPLC を用いて分離・精製を行った。

1-2-3-2 ラジカル酸化による 13-HpODE MxP 付加体と 9-HpODE MxP 付加体の調製

酵素による酸化では生成できる異性体が限られているため[43]、その他の異性体にも応用が可能であるラジカル酸化法を検討した。一方で、ラジカル酸化法は酸素分子挿入部位がもっとも特異性の低い酸化方法であるため、異性体分離が課題であった。リン脂質の状態での異性体分離は非常に困難であったため (Data not shown)、ここでは異性体分離が比較的容易である脂肪酸メチルエステルを用いて調製することとした[44]。移動相に酢酸を加えることで遊離脂肪酸の分離も可能であったが[52]、精製が困難であったことや、ヒドロペルオキ

シド基が酸で分解される可能性があったため[42]、本節では酸を加える必要がない脂肪酸メチルエステルを用いることにした。

ヘキサン/イソプロパノール系を用いることにより、13-HpODE Me と 9-HpODE Me の分離を達成することができた (Fig. 1-5)。また、13-HpODE Me については *cis-trans* 異性体である 13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid (Fig. 1-5: Peak 1) と 13-hydroperxyoctadeca-9*E*, 11*E*-dienoic acid (Fig. 1-5: Peak 2) の分離が確認された。9-HpODE Me のピーク (Fig. 1-5: Peak 3) は *cis-trans* 異性体 (9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid, 9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoic acid) の分離ができなかったが、逆相クロマトグラフィーによって容易に分離できることが確認できたため、ここではまとめて分取することにした。分取 HPLC を用いてそれぞれのピークを回収し、MS/MS 分析に供したところ、それぞれのヒドロペルオキシドの位置に特徴的なフラグメンテーションを確認することができた (Fig. 1-6)。すなわち Peak 1 と Peak 2 からは 88 Da のニュートラルロスに由来する m/z 261 が、Peak 3 からは 140 Da のニュートラルロスに由来する m/z 209 が確認された。得られた 13-HpODE Me (Peak 1, 2) と 9-HpODE Me (Peak 3) は 1-2-3-1 と同じ理由でアセトニトリル中で MxP と反応させ、それぞれの MxP 付加体を調製した。

つづいて、13-HpODE Me MxP 付加体と 9-HpODE Me MxP 付加体の鹼化を行った。アルカリ条件下でのヒドロペルオキシド基の分解は報告されていないが[53]、鹼化の最中は高温にサンプルを置く必要があったため、保護基の脱離および *cis-trans* 異性化が懸念された。そこで本研究では反応条件を比較的室温に近い 40°C で行うこととした。反応 0、1.5 hr 後に溶液の一部を LC-MS で解析を行ったところ、Peak 1-3 のいずれにおいても、メチルエステル体から遊離脂肪酸の生成が確認できた (Fig. 1-7)。わずかに *trans* 化が認められたものの、精製後の遊離脂肪酸の MS/MS 解析からはヒドロペルオキシドの結合位置に変化がないことが確認できた (Fig. 1-8)。

1-2-3-3 13-HpODE MxP、9-HpODE MxP 付加体と LysoPC の合成

徹底した禁水条件下で、13-HpODE MxP、9-HpODE MxP と LysoPC (16:0) の合成を行った。脂肪酸がリン脂質に合成されたのを確認した後、1-1-3-3 の方法で PCOOH の再生および精製を行った。ここで、9-HpODE MxP (Peak 3) から調製された PCOOH は *cis-trans* 異性体 (16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoyl PC、16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoyl PC) が分離されたので、別々に分取を行った。以降は 16:0/13-hydroperxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoyl PC (16:0/13-HpODE PC) と 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoyl PC (16:0/9-HpODE PC) を解析に用いることとした。16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を MS 解析に供したところ、過去の報告通りの PCOOH の典型的なマススペクトルが得られ (Fig. 1-9) [54-56]、PCOOH が合成できていることが確認できた。

1-2-4 結論

本節ではジャガイモ 5-LOX、ラジカル酸化を用いて、高純度な 13-HpODE、9-HpODE 異性体標品を調製した。そして、これらの脂肪酸ヒドロペルオキシドを LysoPC に合成し、それぞれの PCOOH 異性体 (16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC) を調製した。特に、5-LOX をリン脂質に直接作用させても、リン脂質ヒドロペルオキシドの生成が確認できなかったが、本法により、酵素が存在すれば特異的に PCOOH 異性体を調製することが可能となった。また、ラジカル酸化を用いることで酵素が存在しない異性体についても調製できることが示された。

本法を他の分子種にも応用することで、アラキドン酸型 PCOOH や DHA 型 PCOOH の各異性体も調製できると考えられた。

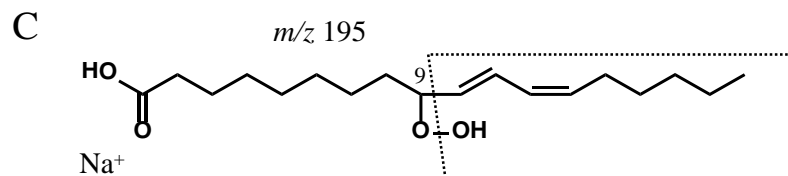
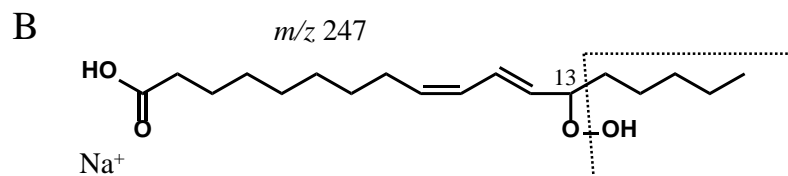
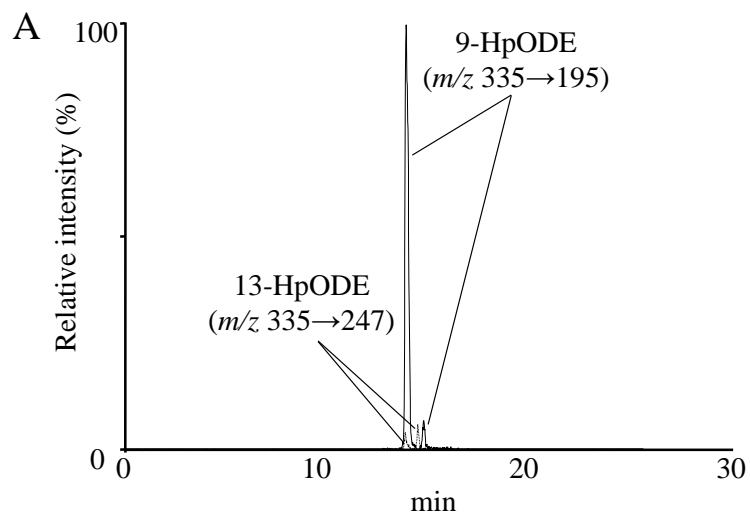


Fig. 1-4 Potato lipoxygenase (5-LOX)-oxidized linoleic acid was analyzed by LC-TOF-MS/MS. Product ion mass chromatogram of sodiated linoleic acid hydroperoxide (m/z 335) (A). Expected fragmentation patterns of 13-HpODE (B) and 9-HpODE (C).

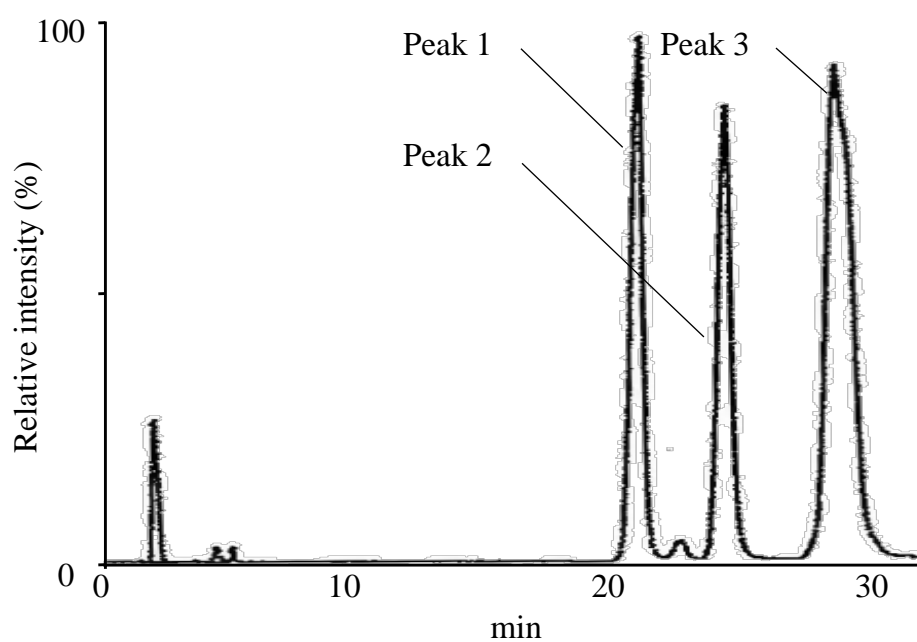


Fig. 1-5 Linoleic acid methyl ester oxidized by radical oxidation, and resulted HpODE methyl ester positional isomers were purified by semi-preparative HPLC (234 nm). Peak 1, 2, and 3 show 13-hydroperoxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid methyl ester, 13-hydroperoxyoctadeca-9*E*, 11*E*-dienoic acid methyl ester, and mixture of 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid methyl ester and 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoic acid methyl ester, respectively.

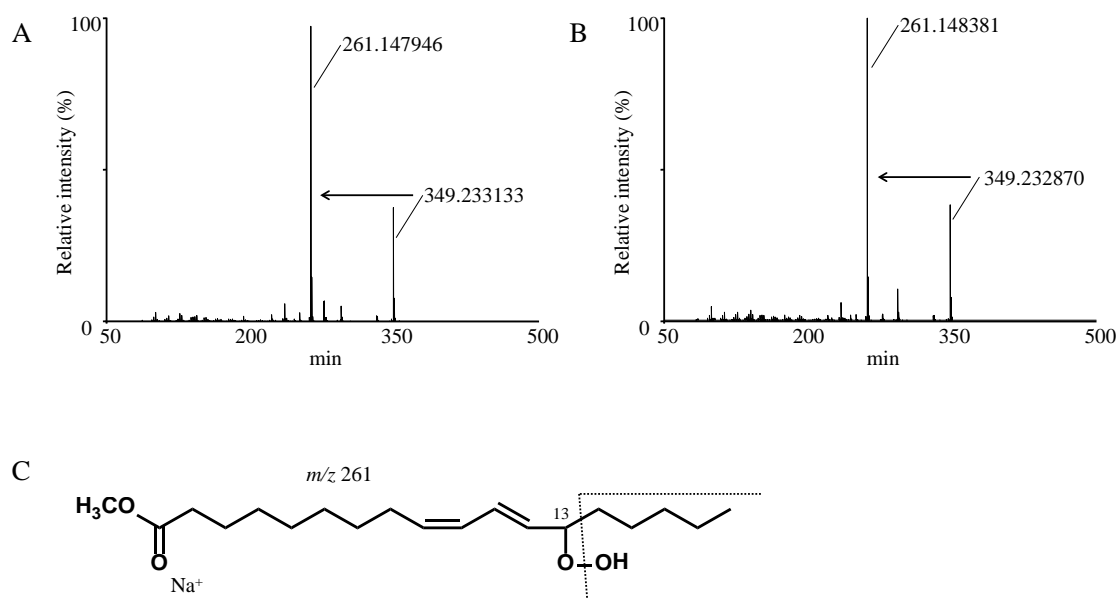


Fig. 1-6 Purified 13-HpODE methyl ester isomers were analyzed by TOF-MS/MS in positive ESI mode. Product ion mass spectra of sodiated 13-HpODE methyl ester (13-hydroperoxyoctadeca-9Z, 11E-dienoic acid methyl ester (A) and 13-hydroperoxyoctadeca-9E, 11E-dienoic acid methyl ester (B)). Expected fragmentation pattern of 13-HpODE methyl ester (C).

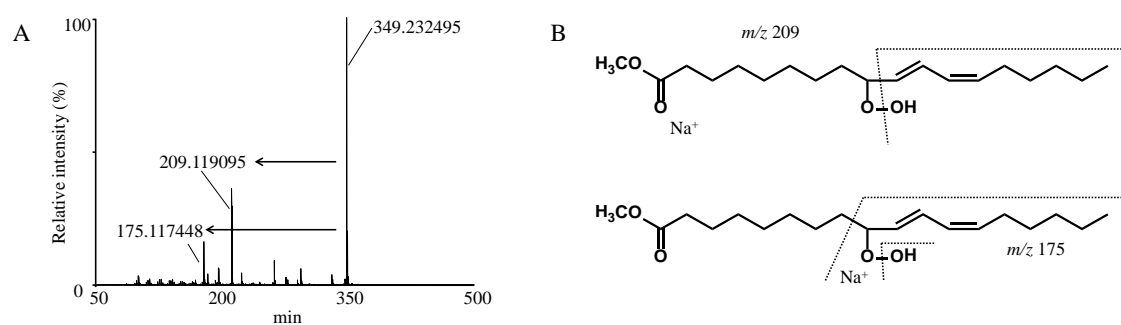


Fig. 1-7 Mixture of 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid methyl ester and 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoic acid methyl ester was analyzed by TOF-MS/MS in positive ESI mode. Product ion mass spectra of sodiated 9-HpODE methyl ester (m/z 349) (A). Expected fragmentation patterns of 13-HpODE methyl ester (B).

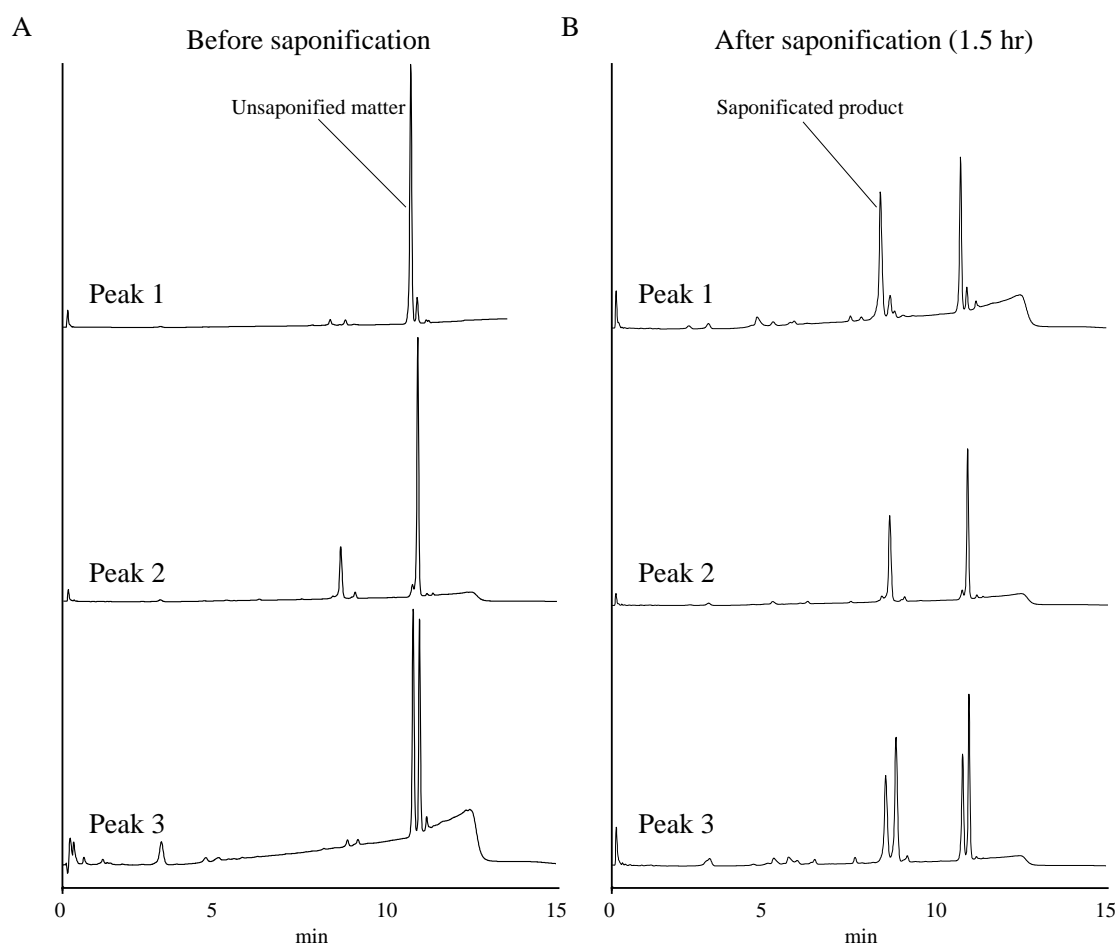


Fig. 1-8 Methyl ester hydroperoxide isomers (Peak 1, 2, and 3) protected by MxP were saponified in base solution, and the portion was analyzed by UV-HPLC (234 nm) before (A) and after (B) saponification.

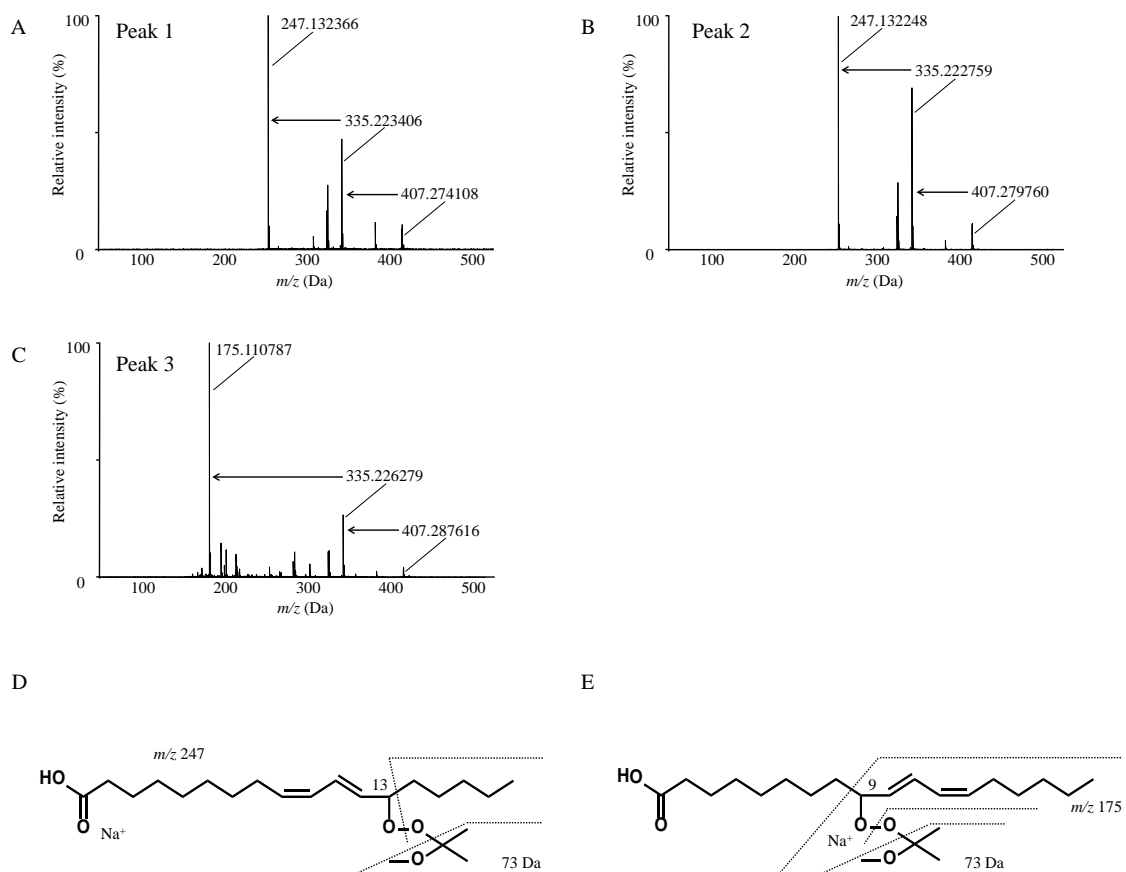


Fig. 1-9 Saponified HpODE methyl ester MxP adducts were purified by preparative HPLC, and the samples were analyzed by TOF-MS/MS in positive ESI mode. Product ion mass spectra of sodiated HpODE MxP adducts (13-hydroperoxyoctadeca-9*Z*, 11*E*-dienoic acid MxP adduct (A) and 13-hydroperoxyoctadeca-9*E*, 11*E*-dienoic acid MxP adduct and mixture of 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoic acid MxP adduct and 9-hydroperoxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoic acid MxP adduct (C)). Expected fragmentation patterns of 13-HpODE MxP adduct (D) and 9-HpODE MxP adduct.

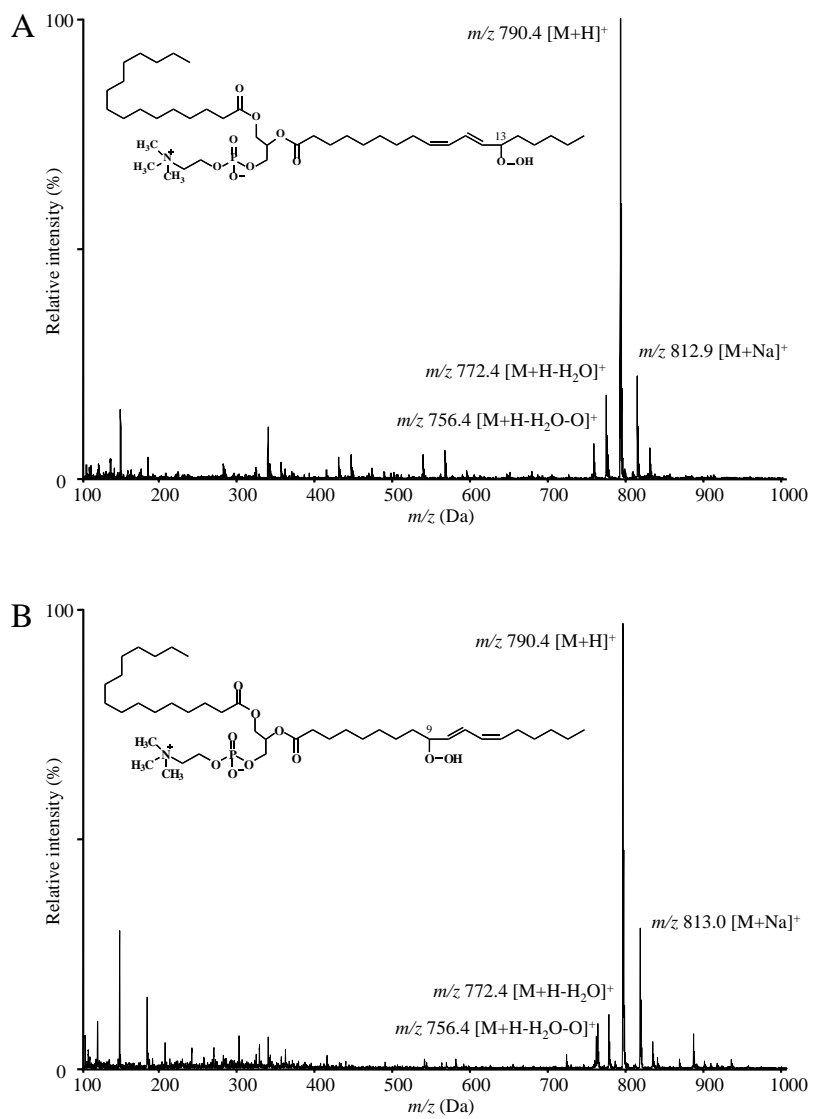


Fig. 1-10 Q1 mass spectra of synthesized PCOOH in positive ESI mode. 16:0/13-HpODE PC (A) and 16:0/9-HpODE PC (B).

第1章 小括

PCOOH と MxP の付加反応の際の副産物生成の原因が反応系の触媒 (PPTS) 濃度とリン脂質濃度の組み合わせであることを明らかにすることができた。またこれらの反応条件を最適化することにより、より高収率に (30~40%)、かつ安定して PCOOH を調製することが可能となった。

ジャガイモから酵素 (5-LOX) を抽出し、これを用いて高純度 9-HpODE MxP 付加体を調製した。またリノール酸メチルエステルのラジカル酸化から 13-HpODE MxP 付加体と 9-HpODE MxP 付加体を調製した。これらの脂肪酸を Lyso リン脂質へ合成することで、酵素が働きにくい PCOOH 異性体も調製可能であることが確認できた。また脂肪酸の酸化方法を応用することで、いずれの異性体も調製できる可能性を見出した。

第 2 章 LC-MS/MS を用いた生体 PCOOH 分析法の確立

緒言

過酸化脂質の分析法として、これまで ELISA 法 [7] や UV-HPLC 法 [57] などが報告されてきた。しかし、ELISA は特異的な抗体を必要とする方法である。すなわち、過酸化脂質は構造が非常に似ており、また未酸化物との区別も必要であるため、これらを十分に識別できる抗体を作成しなければならない。また、UV 検出では通常、共役ジエン (234 nm) を検出するが、細胞や組織などの複雑なマトリックス中にこれらを高感度・高選択的に検出することは非常に困難である。

Miyazawa らはルミノールとシトクロム C を用いた化学発光検出 (CL) -HPLC を開発し、血中 PCOOH を高選択的に検出したことを報告した [23, 24]。この報告では順相 HPLC を用いて PCOOH の側鎖脂肪酸の種類を問わない総 PCOOH の定量を行っている。その後、高脂血症 [25, 26]、アルツハイマー病 [58] といった病態で血中の PCOOH が高値であったことから、生体 PCOOH のより詳細な分析に興味を持たれるようになり、近年では側鎖脂肪酸の情報が得られる質量分析 (LC-MS、LC-MS/MS) を用いた定量値が報告されてきている [55, 56, 59]。

しかし、生体中の PCOOH 検出は失敗も報告されるなど [60, 61]、安定して定量することは非常に困難である。PCOOH は生体内にはごく微量にしか存在しないため、分析法のバリデーションが重要である。LC-MS/MS・MRM モードは微量成分の定量には非常に強力な方法であるが、過酸化脂質のような非常に構造が似通った化合物がサンプル中に共存する場合、使用する MRM の選択が分析の鍵となる。さらに質量分析ではマトリックス効果という定量値を不安定にさせてしまう特有の現象が生じるため、マトリックス効果の評価も精密定量には不可欠である [62-67]。

定量値が不安定になるもう一つの大きな理由として、抽出過程における脂質ヒドロペルオキシドの不安定性が挙げられる [42, 69, 70]。確かにヒドロペルオキシド基の酸素-酸素結合の解離エネルギーは例外的に低く (30~40 kcal/mol)、分解しやすい化合物であるが、常温~生理的温度程度であれば分解しないと考

えてよいため[53]、ヒドロペルオキシドに影響を及ぼす化合物との接触を避けられれば、PCOOHは安定して抽出できると考えた。

そこで、本章ではこれらの課題を解決し、血漿中PCOOH異性体の精密定量法を構築することを目的とした。

第 1 節 PCOOH 異性体分析のための LC-MS/MS 条件の検討

2-1-1 目的

生体サンプル中の微量成分の分析において質量分析 (MS) は強力な手法であり、近年過酸化脂質の分析にも MS が用いられるようになってきている。なかでも Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードは非常に高選択的・高感度な分析法である。MRM モードは、質量分析器内部の Q1 で特定のイオンを選択し、Q2 でそのイオンを開裂させ、Q3 で開裂したプロダクトイオンのなかでも特定イオンのみを選択するため、化合物の構造情報に基づいた定量ができる方法である。これまでも、MRM モードを用いた PCOOH の定量が報告されているが、これらの PCOOH の定量には、専らホスファチジルコリン (m/z 184) や脱水されたイオン (-18 Da) がプロダクトイオンとして用いられている [55, 56]。しかし、生体内にはホスファチジルコリンを有する脂質が豊富に存在するため (未酸化 PC、ヒドロキシ PC、PC 二次酸化生成物など)、 m/z 184 をプロダクトイオンとして用いるのは決して選択性が高いとはいえない。また、脱水 (-18 Da) も同様である。さらに、これらのプロダクトイオンはリン脂質の側鎖脂肪酸の構造情報を全く反映していないため、PCOOH のヒドロペルオキシド位置異性体の識別は不可能であった。

よって本研究では、第 1 章で調製した異性体標品 (16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC) を用いて、各異性体に特徴的な MRM を探索し、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を分析できる LC-MS/MS 条件を構築することを目的とした。

2-1-2 方法

2-1-2-1 試薬成分

PCOOH 標品には第 1 章で調製した 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を用いた。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

2-1-2-2 PCOOH 異性体の MS/MS 条件の最適化

PCOOH 異性体に選択的な MRM を探索するため、第 1 章で調製した 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を MS/MS 解析に供した。1 nmol/L メタノール (5 mM 酢酸アンモニウムもしくは 0.1 mM 酢酸ナトリウムを含む) に調製した 16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC 標品を流速 10 μ L/min で 4000QTRAP (AB-SCIEX 社製) にダイレクトインフュージョンした (スキャンレンジ: m/z 100-1000)。Q1 マススキャンで 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC のプリカーサーイオンを検出した後、ソフトウェア ; Analyst[®] software (Applied biosystems 社製) の最適化設定によりプロダクトイオンのスキャンと検出条件の最適化を行った。また、得られた MRM について、LC を付してイオンソースの最適化を行った。イオンソースの最適化時の LC 条件は以下の通りである。

試料 : 0.1 μ M 16:0/9-HpODE PC もしくは 16:0/9-HpODE PC

移動相 : メタノール/水=9/1*

*5 mM 酢酸アンモニウムもしくは 0.1 mM 酢酸ナトリウムを含む

流速 : 0.2 ml/min

Analyst 最適化設定に従い最適条件を得た。

2-1-2-3 PCOOH 異性体の LC-MS/MS 条件の最適化

2-1-2-2 で構築した MRM を用いて LC-MS/MS 条件を構築した。構築した HPLC 条件は以下の通りである。

• LC 構成

ポンプ ; LC-20AD (島津製作所社製)

オートサンプラー ; SIL-20AC (島津製作所社製)

カラムオープン ; CT0-20A (島津製作所社製)

システムコントローラー ; SCL-10AVP (島津製作所社製)

フロースプリット ; Valco 社製

• LC 条件

カラム : Atlantis T3 2.1×100 mm, 3 μm (Waters)

移動相 :

A : 水*

B : メタノール*

*5 mM 酢酸アンモニウムもしくは 0.1 mM 酢酸ナトリウムを含む

グラジエント条件 :

min	0	4	10	17	30	30.1	35
B%	70	90	90	100	100	70	70

流速 : 0.2 mL/min

カラムオープン : 40°C

• MS/MS イオン化条件

Curtain gas (CUR) 20

Collision gas (CAD) 7

Ion spray (IS) 5000

Temperature (TEM) 500

Ion source gas 1 (GAS1) 40

Ion source gas 2 (GAS2) 40

16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC 検出条件

Isomer	MRM	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
16:0/13-HpODE PC	812/541	126	10	59	30
16:0/9-HpODE PC	812/388	126	10	41	16
16:0/HpODE PC	812/147	126	10	69	6
	790/184	126	10	47	10

DP: Declustering potential

EP: Entrance potential

CE: Collision energy

CXP: Collision cell exit potential

2-1-3 結果と考察

2-1-3-1 PCOOH 異性体検出のための新規 MRM の構築

調製した 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の MS/MS 解析の結果、それぞれのプロトン付加体 $[M+H]^+$ (m/z 790) からは、既報通りのプロダクトイオンが検出された (Fig. 2-1A, B) [55, 56]。すなわち、 $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 772), $[M+H-H_2O-0]^+$ (m/z 756), そしてホスファチジルコリン (m/z 184) であり、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC のフラグメンテーションパターンに全く差異はなかった。ところで、PCOOH を MS 分析に供したとき、プロトン付加体と同様にナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ が比較的強い強度で検出される (Fig. 1-9A, B)。そこで、このナトリウム付加体に着目してみたところ、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC からそれぞれ特徴的なニュートラルロスが生ずることがわかった。すなわち、16:0/13-HpODE PC は 88 Da のニュートラルロスを生じ、 m/z 724, 665, と 541 のプロダクトイオンを生成した (Fig. 2-1C)。特に m/z 541 の感度が最も高かった。一方で 16:0/9-HpODE PC からは 169 Da のニュートラルロスに由来する m/z 388 が検出された (Fig. 2-1D)。16:0/9-HpODE PC のプロダクトイオンの感度は 16:0/13-HpODE PC の感度に比べると非常に低かった。これは 16:0/9-HpODE PC のフラグメンテーションが極性基であるヒドロペルオキシド基をリン脂質骨格から完全に切断してしまうため、電荷のチャージが難しくなったためではない

かと考えられた。また、両異性体においてホスファチジルコリンに由来するプロダクトイオン (m/z 147) [71]が検出された。以上の結果から、16:0/13-HpODE PC の検出には m/z 812 \rightarrow 541、16:0/9-HpODE PC の検出には m/z 812 \rightarrow 388、そして総 16:0/HpODE PC の検出には m/z 812 \rightarrow 147 を採用することとした。

2-1-3-2 PCOOH 異性体検出のための LC-MS/MS 条件の構築

MRM が決定したので、この MRM を用いる HPLC 条件を検討した。PCOOH の LC-MS 分析は流路やイオンソース内部の残存 Na^+ の影響を強く受けることが分かった。すなわち、移動相に酢酸アンモニウムを含む移動相で 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の分析を行ったところ、PCOOH のプレカーサーイオンには H^+ 付加体と Na^+ 付加体が混じり合っており、分析の度にその比が変動することがわかった (Fig. 2-2A, B)。 Na^+ は常にイオンソースや HPLC 流路内に少なからず存在しており、これを完全に排除することは不可能である。よって本研究では、移動相に少量の Na^+ (0.1 mM 酢酸ナトリウム) を添加し、PCOOH のイオンをすべて、 Na^+ 付加体 (m/z 812) に集約させることにした (Fig. 2-2C, D) [72]。一般的に質量分析において不揮発性塩である Na^+ の添加は禁忌である。そこで、添加する Na^+ 量を減らすための検討を行ったところ、必要となる Na^+ 量はクロマトグラム上単位時間あたりに溶出するリン脂質 (マトリックス化合物) 量に比例することがわかった (Data not shown)。すなわち、できる限り PCOOH を他の化合物から分離させれば、添加する Na^+ 量を減らすことができたので (0.1 mM)、PCOOH の保持時間をおよそ 17 min にすることにした。この条件で標準品および血漿抽出物の連続分析を試してみたところ、極端な感度低下などはみられず、数百時間の稼働、約 400 サンプルの連続分析が可能であることが分かった。また、使用後もユーザーレベルのメンテナンスを行えば、支障なく分析できることがわかった。

構築された LC-MS/MS 条件および MRM (16:0/9-HpODE PC; m/z 812 \rightarrow 541、16:0/9-HpODE PC; m/z 812 \rightarrow 388、総 16:0/HpODE PC; m/z 812 \rightarrow 147) を用いて検量線を作成した。いずれの PCOOH 異性体においても 0.01~10 pmol の範

囲で良好な直線性が得られた (Fig. 2-3A, B)。検出感度は m/z 812→541 が最も高く、検出限界は 1 fmol/injection だった。

2-1-4 結論

本研究で構築された新規 MRM (m/z 812/541、812/388) は過去に報告されたことではなく、ヒドロペルオキシドがリノール酸の 13-位、9-位に結合している異性体のみを選択的に検出することができた。また、 m/z 812/147 はヒドロペルオキシドの位置異性体を区別せずに総 16:0/HpODE PC として検出できた。

本条件の検出感度は過去の報告値と同程度かもしくはそれ以上であった [55, 56, 59]。本法は PCOOH を高感度・高選択的に定量でき、かつ PCOOH 異性体の構造情報を得るのに非常に有効なツールであると考えられた。

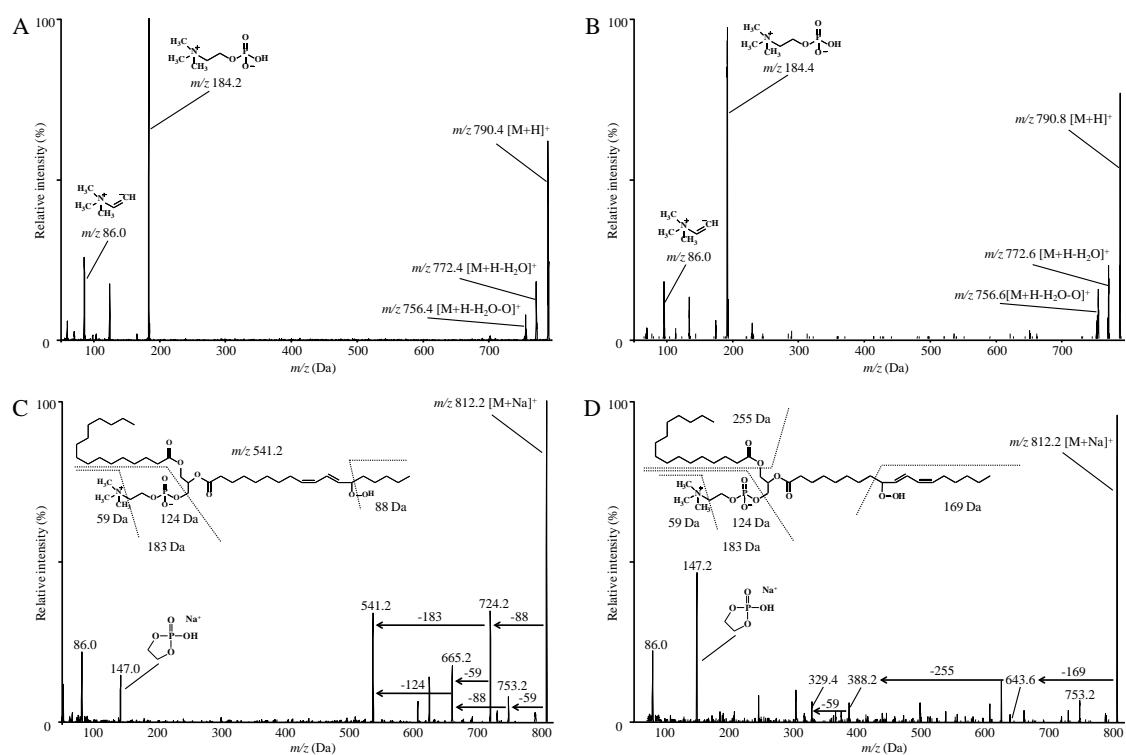


Fig. 2-1 The product ion mass spectra of protonated PCOOH (m/z 790 [M+H]⁺) for 16:0/13-HpODE PC (A) and 16:0/9-HpODE PC (B), and sodiated PCOOH (m/z 812 [M+Na]⁺) for 16:0/13-HpODE PC (C) and 16:0/9-HpODE PC (D). Standard PCOOH (1 nmol 16:0/13-HpODE PC or 16:0/9-HpODE PC/mL methanol) were infused directly into an MS/MS system at a flow rate of 10 μ L/min.

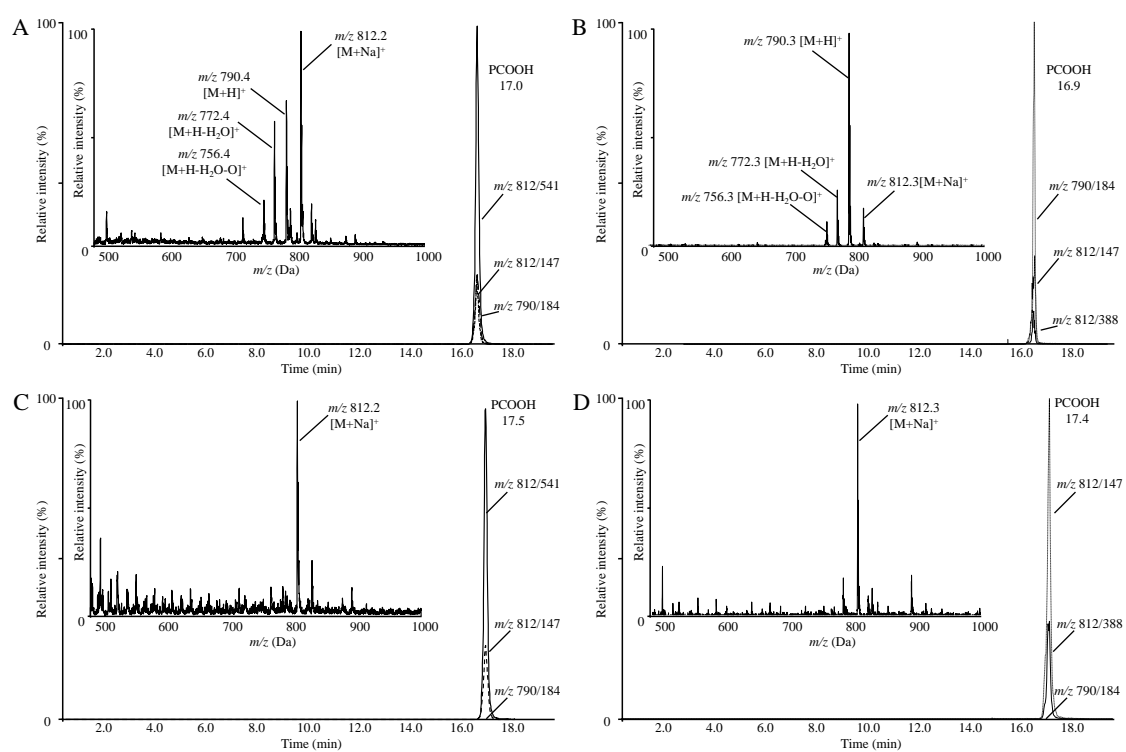


Fig. 2-2 MRM chromatograms of standard PCOOH (16:0/13-HpODE PC or 16:0/9-HpODE PC). 16:0/13-HpODE PC (1 pmol) was analyzed with MRM (m/z 812/541, and 812/147) (A), whereas 16:0/9-HpODE PC (1 pmol) was analyzed with MRM (812/388, and 812/147) (B). Inserted figures show Q1 mass spectra of PCOOH detected at 17.5 (A), 17.4 (B).

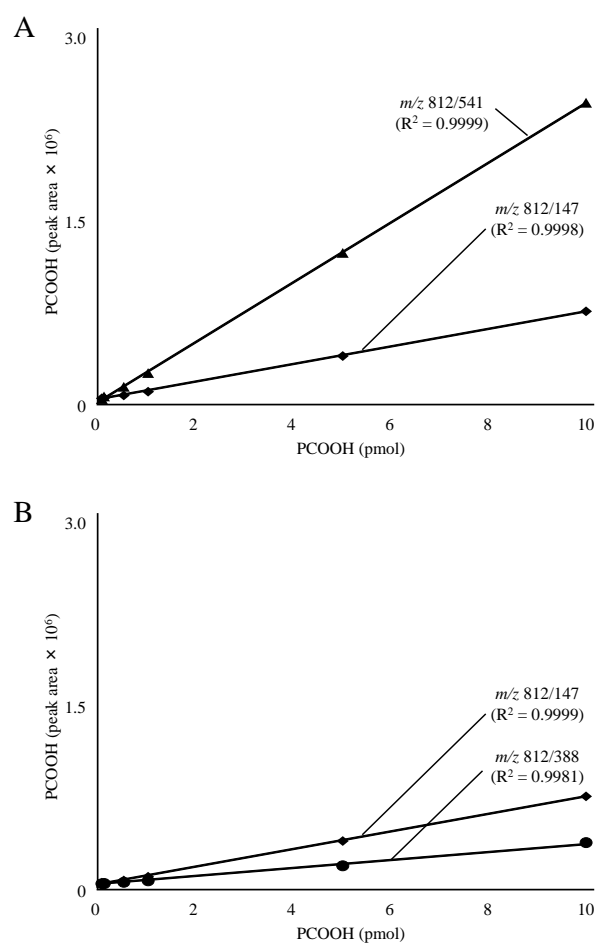


Fig. 2-3 Calibration curves of reference PCOOH (16:0/13-HpODE PC (A) or 16:0/9-HpODE PC (B)). Different amounts of PCOOH (0.01–10 pmol) were analyzed by LC-MS/MS MRM (m/z 812/541 812/388, and 812/147) under optimal conditions.

第 2 節 血漿からの PCOOH 回収試験と MS のイオンサプレッションの評価

2-2-1 目的

古くから脂質ヒドロペルオキシドの安定性については多く議論されてきた。脂質ヒドロペルオキシドは酸[42]や金属[69]、熱[70]などの様々な原因で容易に分解されることが報告されている。そのため生体サンプルからの PCOOH 抽出中においても PCOOH の分解が懸念され、実際に生体 PCOOH の検出失敗も報告されている[60, 61]。しかし、ヒドロペルオキシド基自体は室温程度ではすぐに壊れるものではないため[53]、抽出中に生体中の何らかの化合物の影響によって分解されていると考えられた。そこで本節では、抽出過程における PCOOH 分解の原因を明らかにするとともに、抽出過程の分解を回避できる条件を構築することとした。

また、MS 分析における精密な定量には、分子の均等なイオン化が極めて重要である[62-68]。標品などの純粋なサンプルであれば、イオン源において均等にイオン化される。しかし、生体サンプルは LC 部においてある程度の分離はできたとしても、イオン源には目的化合物とともに多くの夾雑分子が流れてくる。特にその夾雑化合物が目的化合物よりもはるかにイオン化されやすいものである場合、目的化合物のイオン化は大きく阻害されることになる（マトリックス効果：イオンサプレッション）。そもそも、リン脂質はイオンサプレッサ（イオンサプレッションを引き起こす化合物）として代表的な化合物群である。そのため、過酸化リン脂質のような微量成分の分析の際にはその他のリン脂質との分離が不可欠となる。一般的にイオンサプレッションの回避には除タンパク法、希釈法、標準添加法や HPLC 条件の検討が用いられる。除タンパク法は適応できる化合物が限られており、リン脂質には不適である。また希釈法は過酸化脂質のような微量成分の分析には適応できず、また、標準添加法はサンプル量を必要とするため、今回は採用しなかった。第 1 節において移動相に添加する Na⁺量を減らすため、PCOOH とその他のマトリックス化合物は最大限に分離させておいた。よって、本節では第 1 節で確立した HPLC 条件をマトリックス効果も考慮し再検討することとした。

2-2-2 方法

2-2-2-1 試薬成分

PC00H 標品には第 1 章で調製した 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を用いた。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものをを用いた。

2-2-2-2 血漿の回収

血漿は当研究室の学生の血液を用いた。3名の健常学生 (24 ± 2 歳) からへパリン採血 (10 mL) を行い、遠心分離 (1,000 × g、10 min、4°C) により血漿を得た。これらの血漿を集め、以降の添加回収試験に用いた。

2-2-2-3 血漿 PC00H 抽出法の検討

血漿からの PC00H 抽出法を検討するため、血漿に PC00H 標品 (120 pmol 16:0/13-HpODE PC/10 μL メタノール) を添加し、様々な抽出条件下で抽出を行った。抽出条件は以下の通りである (抽出スキーム : Fig. 2-4)。

Step 1: 血漿 (0.3 ml) を 0.3 ml の 0-5.0% KCl 水溶液で希釈した。

Step 2: 希釈した血漿に 2.4 mL クロロホルム/メタノール (1:1 or 2:1, v/v) を加え、5 min 攪拌した後、遠心分離を行った (1,000 × g、20 min、-20~4°C)。脂質層 (下層) を別の試験管に回収し、残った水層と中間層に Folch 理論下層を加え [38]、再度抽出を行った。攪拌 (5 min) ・遠心後 (1,000 × g、20 min、-20~4°C)、この下層を先の下層と合わせた。得られた総脂質画分はそのまま次の操作に用いるか、もしくは Folch 理論上層でリンスを行った後、下層を次の操作に用いた。

また、同様に希釈した血漿に 2.4 ml にクロロホルム/メタノール (1:2, v/v) もしくは 100%メタノールを加え、5 min 攪拌した後、遠心分離を行った (1,000 × g、20 min、4°C)。上清を別の試験管に回収し、残った沈殿にクロロホルム/メタノール/水 (4:8:3 or 0:4:1, v/v) を加え、再度抽出を行った。攪拌 (5 min) ・

遠心後 (1,000 × g、20 min、4°C)、上清を先の上清と合わせた。

Step 3: 得られた総脂質画分を遠心エバポレーターで乾固した。

Step 4: 乾固した脂質抽出物を 0.24 mL のクロロホルム/イソプロパノール (2:1, v/v) に溶解させ、Sep-Pak Vac 1 cc (100 mg) NH₂ cartridge で精製を行った。1.5 mL のクロロホルム/イソプロパノール (2:1, v/v) でコンディショニングを行ったカラムに脂質抽出物 40 µL をロードし、1.5 mL クロロホルム/イソプロパノール (2:1, v/v) で洗浄した。洗浄後、1.5 mL のメタノールでリン脂質画分を溶出させた。溶出物を遠心エバポレーターで乾固した後、0.2 mL のメタノールに溶解した

Step 5: 得られた血漿リン脂質画分のうち、10 µL を LC-MS/MS 分析に供した。LC-MS/MS 条件は第 2 章第 1 節で確立したものをを用いた。

以上により抽出条件を最適化した。最適化された抽出法の正確さを評価するため、PC00H 標品 (120 pmol 16:0/13-HpODE PC/10 µL メタノール) を上記 Step 1 ~5 のいずれかに添加し抽出を行った。抽出物の LC-MS/MS 分析を行い、コントロール (標品未添加) との比較により添加回収率を算出した。

2-2-2-4 イオンサプレッションの検討

ポストカラムインフュージョン法を用いて本分析法のマトリックス効果の有無を評価した。ポストカラムインフュージョン法とは、ポストカラム (イオンソースの直前) から、分析対象化合物の標品を連続的にインジェクトし、ベースラインを上昇かつ一定にさせた状態で HPLC から測定サンプルをインジェクトする方法である (Fig. 2-5) [63-65, 67, 68]。HPLC からマトリックス効果を持つ化合物が流れてきた場合、ベースラインに影響を及ぼすため、その影響の有無でマトリックス効果を評価する。すなわちベースラインが本来の量以上に上昇すればイオンエンハンスメントとなり、減少すればイオンサプレッションとな

る。本節では 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC 標品をポストカラムでインジェクトし(0.1 pmol 16:0/13-HpODE PC or 16:0/9-HpODE PC/ml メタノール)、HPLC 側から血漿抽出物をインジェクトした。LC-MS/MS 条件は第 2 章第 1 節で確立したものをを用いた。

2-2-2-5 統計処理

結果は平均値±標準偏差で示した。2 群間の統計的な差はスチューデントの *t* 検定によって確認した。3 群間以上の比較には一元配置分散分析を行い、有意であった場合に平均値の差を Turkey-Kramer の多重比較検定で解析した。それぞれ $P < 0.05$ を統計的有意とした。

2-2-3 結果と考察

2-2-3-1 血漿からの PCOOH 回収率

第 2 章第 1 節で確立した LC-MS/MS 条件を用いて血漿からの PCOOH 添加回収試験を行った。一般的な脂質の抽出法である Bligh & Dyer [73] や既報の方法 [60, 61] に従って抽出を試みたところ、PCOOH はほとんど回収できなかった。代わりに PCOOH の分解物と思われるものが検出されており、抽出過程にそのほとんどが分解してしまったと考えられた (Data not shown)。本節では PCOOH 分解の原因を明らかにするため、血漿に PCOOH 標品を添加し様々な条件で抽出を試みた。

血漿からの PCOOH 回収率の結果を Fig. 2-6 に示した。PCOOH 回収率はクロロホルム/メタノール=1:1、2:1 (v/v) で良好な値が得られ、一方で、クロロホルム/メタノール (1:2) とメタノール 100%で著しく低下することがわかった (Fig. 2-6A)。クロロホルム/メタノール=1:1、2:1 (v/v) は水層と脂質層が 2 層に分離する抽出系であり、一方でクロロホルム/メタノール (1:2) とメタノール 100%は水層と脂質層が混合してしまう抽出系である。さらに、たとえクロロホルム-メタノール=1:1、2:1 (v/v) の抽出系でも、先にメタノールのみを加え、2 層を混合させた後に、クロロホルムを加えて 2 層分離させても、PCOOH

のほとんどは分解してしまうことが分かった。これらの結果から、PCOOH 回収率の低さは溶媒の極性が原因ではなく、生体サンプルの水溶性画分との接触により PCOOH が分解していることが原因であると考えられた。また、脂質抽出前に 0-1% KCl で血漿を希釈することで、回収率がわずかに増加することがわかった (Fig. 2-6B)。一般的に水層の脂質を脂質層に追い出すために、1%~の KCl が用いられるが [38, 73]、過剰な KCl (5%) は回収率を低下させることがわかった。リポタンパクや細胞膜の状態だとリン脂質は膜の内側を向くため、脂肪酸鎖は水溶性画分と接触しないと考えられる。しかし、有機溶媒を加えたときにこの構造が壊れ、血中のタンパクから溶出した金属イオンや様々な塩と接触することが PCOOH 分解の原因ではないかと考えられた。

脂質層の Folch 理論上層での洗浄は PCOOH 回収率をわずかに低下させた (Fig. 2-6C)。一方で、PCOOH の回収率に温度はほとんど影響を与えなかった (Fig. 2-6D)。ヒドロペルオキシドは室温程度では比較的安定な化合物であり [53]、夾雑物との接触をさければ安定して抽出できることがわかった。

以上の結果より、PCOOH の最適抽出条件を以下のように決定した。

1. 血漿 300 μ L を水 300 μ L で希釈。
2. クロロホルム/メタノール (2:1、v/v) 2.4 mL を加え、5 min よく攪拌した後、遠心分離 (1,000 \times g、4°C、20 min) により、脂質層を回収した。
3. 残った水層に Folch 理論下層クロロホルム/メタノール 1.4 mL を加え、2 min 攪拌。遠心分離 (1,000 \times g、4°C、20 min) した後、脂質層を先の脂質層と合わせた。
4. 脂質層を遠心エバポレーターにより濃縮・乾固した後、クロロホルム/イソプロパノール (2:1) 240 μ L に再溶解させた。
5. クロロホルム/イソプロパノール (2:1) 1.5 mL でコンディショニングした Sep-Pak Vac 1 cc (100 mg) NH₂ cartridge に先ほどのサンプル 40 μ L をロードした。カラムを 1.5 mL クロロホルム/イソプロパノール (2:1) で洗浄した後、PCOOH を含む総リン脂質を 1.5 mL メタノールで溶出させ

た。

6. 溶出物を遠心エバポレーターで乾固した後、メタノール 200 μL に再溶解させた。
7. 溶液の 10 μL を LC-MS/MS に供した。

最後に抽出 Step1~5 のいずれかに PC00H 標品を添加し、上記の PC00H 抽出法の正確さを評価した (Fig. 2-6E)。Step 5 に添加した場合、わずかに回収率が高い傾向にあったが、いずれの Step に添加しても良好な回収率が得られた。Step1~4 でほとんど変化がなかったことから、精製後の乾固の際に PC00H がわずかに分解していると考えられた。また、同様に 16:0/9-HpODE PC を添加した場合でも良好な回収率が得られた (Data not shown)。

2-2-3-2 マトリックス効果の評価

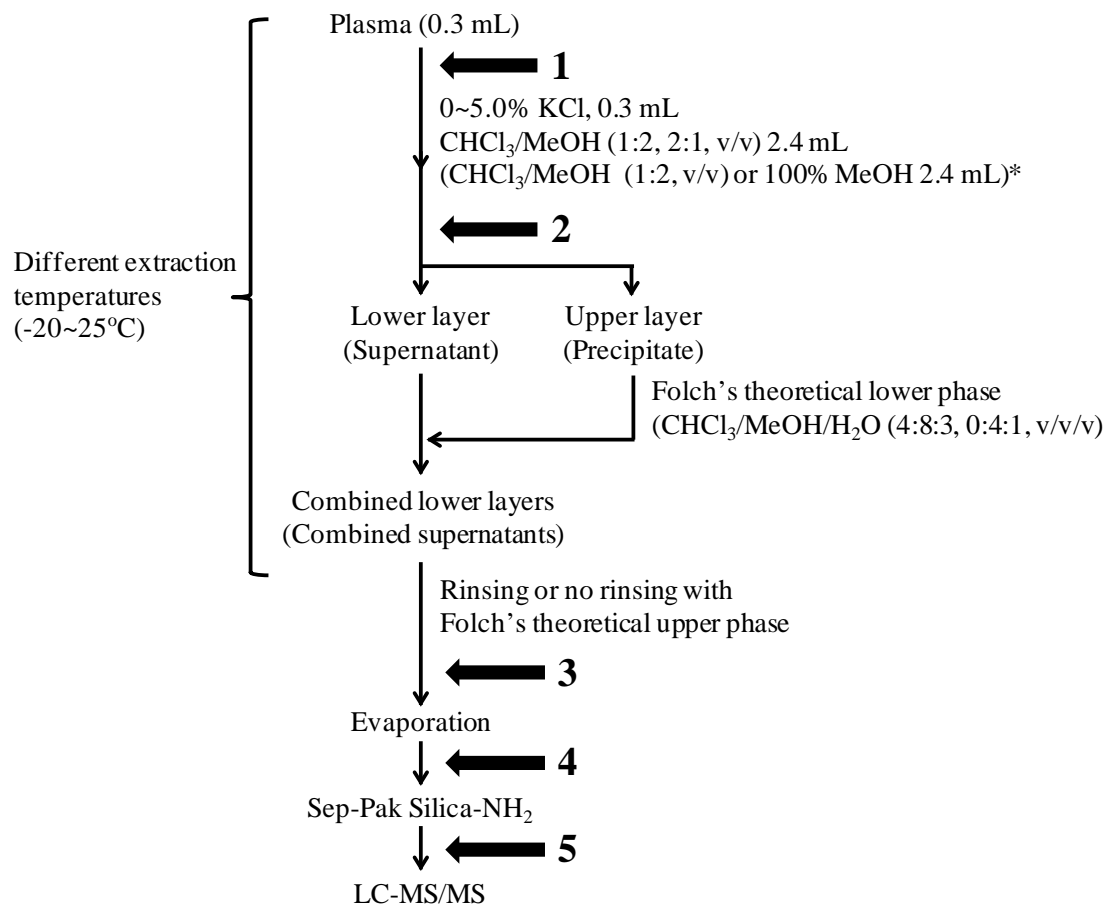
ポストカラムインフュージョン法を用いて、本分析法および抽出法のマトリックス効果の評価を行ったところ、いずれの MRM (m/z 812 \rightarrow 147、812 \rightarrow 541、812 \rightarrow 388) においてもイオンサプレッション・エンハンスメントは認められなかった (Fig. 2-7)。8~12 min 付近にベースラインの減衰が認められたが、おそらく Lyso リン脂質によるイオンサプレッションと考えられた。また、抽出後標品添加サンプルの分析結果 (2-2-3-1 項: Fig. 2-6E Step 5 の標品添加) から、定量的にもイオンサプレッションは生じていないと判断できた。

2-2-4 結論

本研究により PC00H の抽出には脂質画分と水溶性画分の接触の回避が重要であることがわかった。また、過去の報告 [60, 61, 69] や今回の結果から、水溶性フラクションのなかでも塩やタンパク中の金属イオンなどが分解に関与していると考えられた。本研究で最適化された条件では良好な回収率 (85.4 \pm 10.4%) で安定して血漿 PC00H を抽出できており、この結果を裏付けるように本分析法においてイオンサプレッションは認められなかった。

他にも PC00H は多くの要因で分解することが確認された。PC00H を HPLC で分析する際、バイアルやセプタム、インサートなどを用いるが、これらに使われる可塑剤によっても分解された。特にシリコンに接触した溶媒とインサートを併用した場合に PC00H は顕著に分解された。

また、添加回収試験において、PC00H 標品を水に加えて回収しようとした場合、PC00H はほとんど回収できないことが分かった。しかし、溶媒の乾固の直前に血漿抽出物やその他の脂質成分を加えた場合に良好な回収率が得られたことから、PC00H と空気の接触が原因と考えられた。総脂質画分の乾固のときよりも固相抽出で精製されたサンプルを乾固させた時の方が分解の程度が大きかったのもそのためと考えられる。そのため、サンプルの乾固は極力避け、またリン脂質含量が少ないサンプルから PC00H を抽出する場合、乾固の直前に何らかの脂質を加えることが望ましいと思われる。



*Contents in parentheses () represents the case of extraction with CHCl₃/MeOH (1:2, v/v) or 100% MeOH

Fig. 2-4 Procedures for the extraction of PCOOH from plasma. Reference PCOOH (120 pmol 16:0/13-HpODE PC/10 μL methanol) was spiked into the plasma (Step 1), lipid fraction (Step 2), total lipids (Step 3), dried extract (Step 4), or final aliquot (Step 5), and PCOOH recovery rates were calculated and evaluated in order to develop efficient and quantitative extraction procedures.

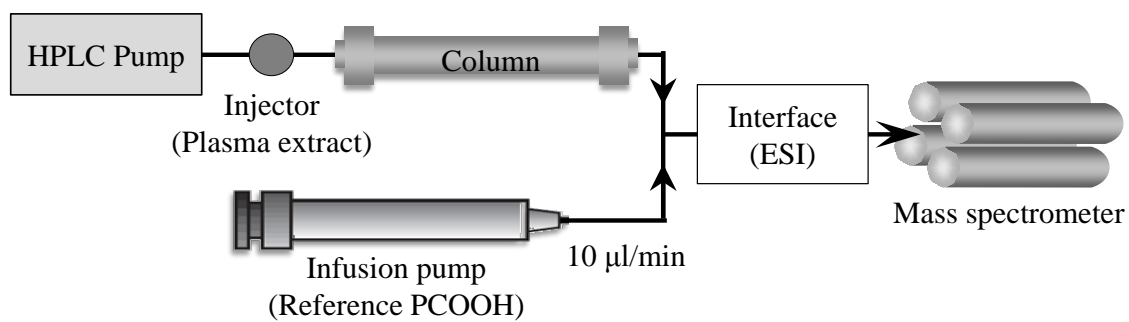


Fig. 2-5 Experimental setup for evaluating LC-MS/MS ion suppression

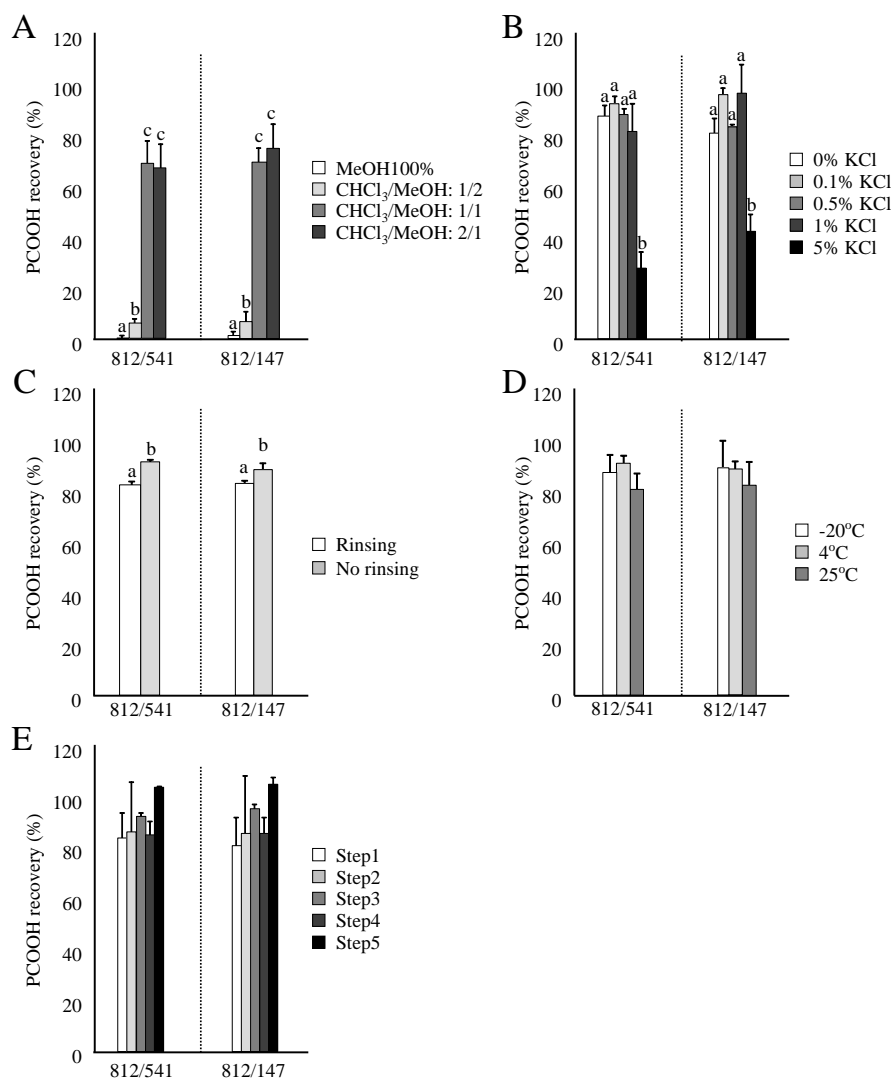


Fig. 2-6 PCOOH recovery rates from plasma spiked with standard PCOOH (16:0/13-HpODE PC). PCOOH-spiked plasma (300 μ L) was diluted with 300 μ L water and mixed with 2.4 mL chloroform-methanol (1:2 or 2:1, v/v). Lipid fractions were collected, and the remaining phase was re-extracted with Folch theoretical lower phase at 4°C. Combined lipid fractions were evaporated and applied to solid phase extraction followed by LC-MS/MS determination of PCOOH. Also, PCOOH-spiked plasma (300 μ L) was diluted with 300 μ L water and mixed with 2.4 mL chloroform-methanol (1:2, v/v) or 100% methanol. Supernatant were collected, and applied to solid phase extraction followed by LC-MS/MS. A, Recovery of PCOOH extracted with different solvent ratios (chloroform-methanol (1:2, 1:1, or 2:1, v/v) or 100% methanol). B, Recovery of PCOOH extracted using 300 μ L of different concentrations of KCl (instead of water) and 2.4 mL of solvent (CHCl_3 -MeOH, 2:1). C, Recovery of PCOOH in cases of washing (rinsing) the combined lipid fraction (obtained from extraction conditions using CHCl_3 -MeOH 2:1 and 0% KCl) with Folch theoretical upper phase. D, Recovery of PCOOH extracted with CHCl_3 -MeOH 2:1, 0% KCl, and no rinsing at with different temperatures (25, 4, or -20°C). E, Recovery of PCOOH after addition of PCOOH standards to different extraction steps (**Fig. 2-4**). Means without a common letter differ significantly at $P < 0.05$.

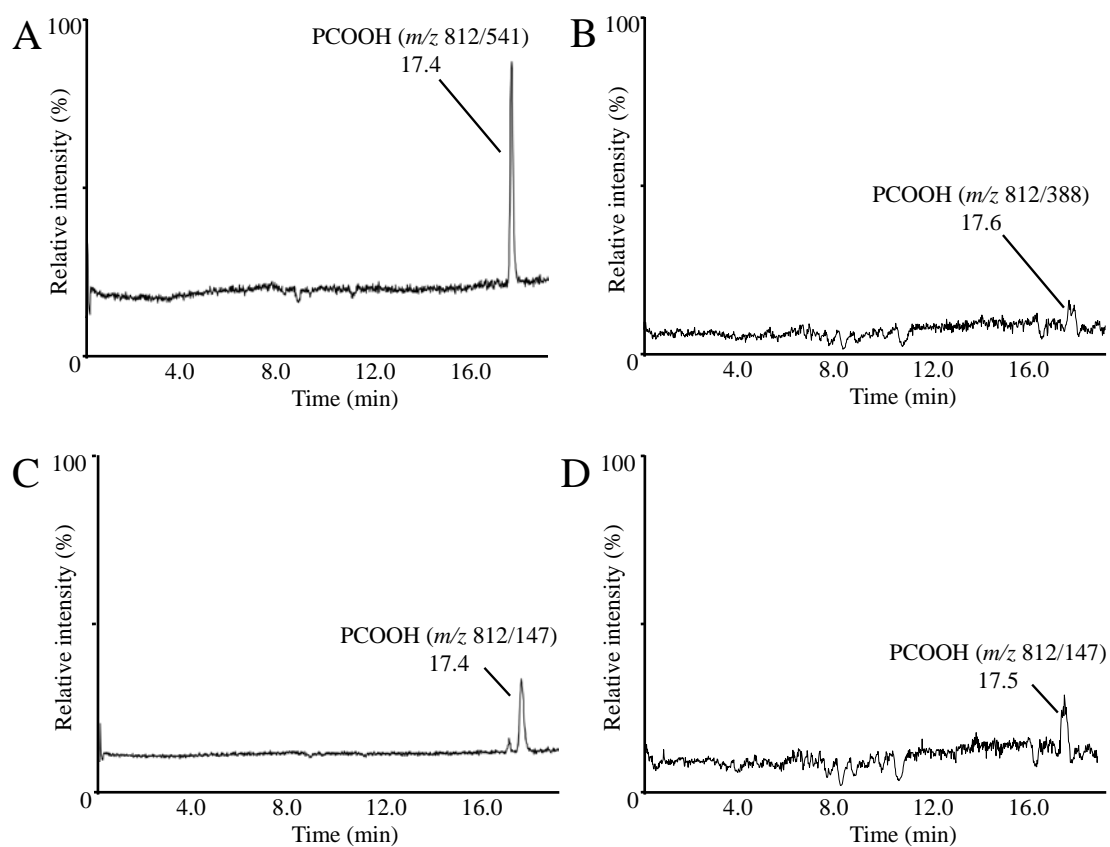


Fig. 2-7 MRM chromatograms of PCOOH when the plasma extract (10 μ L) was injected into an LC-MS/MS system in parallel with continuous post-column infusion of a PCOOH standard solution [0.1 pmol 16:0/13-HpODE PC (A, C) or 16:0/9-HpODE PC (B, D)/mL methanol] at 10 μ L/min. MRM conditions were 812/541 (A), 812/388 (B), and 812/147 (C, D).

第2章 小括

本章では PCOOH の親イオンに Na⁺付加体を用いることで、PCOOH の側鎖脂肪酸の構造情報が得られることを明らかにした。本研究ではリノール酸型の PCOOH を用いて、そのヒドロペルオキシド位置異性体である 16:0/13-HpODE PC (m/z 812 → 541) と 16:0/9-HpODE PC (m/z 812 → 388) を定量できる新規 MRM を構築した。さらに、ホスホコリンに由来する MRM (m/z 812 → 147) を用いることで、総 16:0/HpODE PC も同時に検出することができた。

また、抽出過程における PCOOH の分解が生体サンプル中の水溶性フラクションと接触することが原因であることを明らかにし、PCOOH を安定して抽出できる方法を構築した。本 LC-MS/MS MRM 条件および抽出サンプルにおいてイオン suppression は認められなかった。

以上により血漿中の PCOOH 異性体を精密に定量できると考えられた。

第3章 ヒト血漿の PCOOH 異性体解析

緒言

現在、脂質過酸化と様々な疾患との関連性について非常に多くの研究が進められている[1]。1987年 Miyazawa らは PCOOH を高感度かつ高選択的に検出する CL-HPLC を開発し、初めてヒト血中に PCOOH の存在を証明した。その後、CL-HPLC を用いて、高脂血症 [25, 26]、アルツハイマー病 [58]、糖尿病 [74] さらに加齢 [25] といった要因で血中の PCOOH が有意に高値になることを明らかにしてきた。また、動脈硬化発症ウサギの血漿および動脈壁において PCOOH が蓄積すること [75]、さらにヒトにおいても動脈硬化病変に PCOOH が検出されたことが報告されている [76, 77]。高脂血症や糖尿病は動脈硬化発症リスクを高めるため [78-80]、このような PCOOH の増加は動脈硬化発症と強く関わると考えられた。

近年ではこれらの現象を解明するため、LC-MS/MS を用いて、血中 PCOOH の分子種レベルでの定量値が報告されているが [55, 56, 59]、何故こういった病態において PCOOH が増大するのか、その原因の解明にはまだ至っていない。

そもそも、生体内の PCOOH の生成にはラジカル酸化、一重項酸素酸化、酵素酸化の3つの経路が考えられる [15, 20-22]。ラジカル酸化は、外因性のものとしては喫煙や薬物代謝、空気汚染などによって、内因性のものとしては NADPH オキシダーゼのような酵素、ミトコンドリアの電子伝達系より発生するラジカルなどによって酸化されるものである。一重項酸素酸化は一重項酸素を必要とするものであり、これは基底状態にある酸素が光によって励起される必要がある。酵素酸化は生体が持つ酵素（代表的なものとして、5-LOX、12/15-LOX など）によって酸化されるものである。そして、これら3つの経路によって生成される PCOOH は脂肪酸ヒドロペルオキシドと同様、ヒドロペルオキシドの結合位置が異なると考えられる。

すなわち、PCOOH のヒドロペルオキシド位置異性体の精密定量は、生体内の過酸化脂質生成の原因を明らかにし、動脈硬化といった病態の発症メカニズムの解明につながると考えられた。

3-1-1 目的

本研究第1章でヒドロペルオキシドの結合位置が異なる PCOOH 異性体の高純度標品を調製した。また、第2章では LC-MS/MS を用いて PCOOH のヒドロペルオキシドの位置を特定することが可能になり、血中 PCOOH の精密な定量が可能となった。本章ではこれらの標品および分析法を用いて、健常者と脂質代謝異常症者の血中 PCOOH 異性体 (16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC) の定量解析を行い、疾患と酸化プロセスの関係についての知見を得ようとした。

3-1-2 方法

3-1-2-1 試薬成分

PCOOH 標品には第1章で調製した 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC を用いた。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

3-1-2-2 健常人血漿と冠動脈有意狭窄患者の血漿

健常人血漿は当研究室学生のものを用いた。8名の健常学生(男性6名、女性2名、25 ± 2歳)からヘパリン処理した血液を遠心分離(1,000 × g、10 min、4℃)により、血漿を得た。

冠動脈有意狭窄患者の血漿は日本医科大学・内分泌代謝と心臓血管研究所付属病院よりご供与いただいた。冠動脈のいずれかの血管部位に有意狭窄 > 50% を有する患者の血漿を用いた(男性9名、女性3名、69 ± 11歳)。

3-1-2-3 血漿中 PCOOH の LC-MS/MS 分析

血漿 PCOOH 抽出は第2章第2節で確立した方法を用いた。また、PCOOH の分析には第2章第1節で構築した MRM および LC-MS/MS 条件を用いた。

3-1-2-4 統計処理

2-2-2-5 と同様に行った。

3-1-3 結果と考察

3-1-3-1 ヒト血中 PCOOH 異性体濃度解析

血漿中 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC、16:0/HpODE PC 総量の解析を行ったところ、ヒト血中において両異性体の存在を確認することができた (Fig. 3-1)。また、16:0/9-HpODE PC は *cis-trans* 異性体である 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoyl PC と 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*E*-dienoyl PC の分離が確認できた。第 1 章で調製した 16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC 標品を用いて定量を行ったところ、健常人の血漿中 16:0/13-HpODE PC (m/z 812/541)、16:0/9-HpODE PC (m/z 812/388) 濃度はそれぞれ 36.1 ± 11.5 pmol/mL (means \pm SD) と 33.1 ± 10.2 pmol/mL であった (Table 1)。また総 16:0/HpODE PC (m/z 812/147) は 72.3 ± 23.5 pmol/mL となり、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の総量は総 16:0/HpODE PC にほぼ一致することがわかった。この結果は他の 2 種の異性体 (16:0/10-HpODE PC と 16:0/12-HpODE PC) が血中にはほとんど存在していないことを示しており、すなわち血中において一重項酸素酸化はほとんど起きていないと考えられる (Fig. 2, Table 2)。

一方脂質代謝異常症者の 16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC および 16:0/HpODE PC 濃度はそれぞれ 52.4 ± 24.6 , 45.2 ± 18.1 , 97.3 ± 39.5 pmol/mL であり、過去の報告と一致して [25]、いずれの異性体においても PCOOH が高まることを確認した。また健常人の血中 PCOOH と同じく、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の合計は総 16:0/HpODE PC にほぼ一致することがわかった。

本分析条件では 16:0/9-HpODE PC の *cis-trans* 異性体の分離が達成できた。そこで 16:0/9-HpODE PC に対する 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*, 12*Z*-dienoyl PC の割合を算出したところ、脂質代謝異常症において健常人に比べ有意に高値であり ($P < 0.01$)、5-LOX 活性化の可能性が示唆された (Table 3)。Hartmut らは動脈硬化病変形成の初期段階における 15-LOX の関与として、13-hydroxy-octadecadienoic acid の増加を報告している [19]。今回の結果は Hartmut らの結果とは逆の結果であるが、遊離型脂肪酸は細胞から放出される一

方で、リン脂質型は細胞内に留まる（すなわち遊離型とリン脂質型はその機能が大きく異なる）ということが報告されているため [81]、PCOOH 異性体の解析は動脈硬化の発症・進展について新たな知見を与えるのかもしれない。

今回、脂質代謝異常症者において PCOOH が高まること、さらに PCOOH 異性体比率が変化する可能性が示唆されたが、被験者が高齢に偏っていたため、今後は年齢も考慮に入れた試験が必要である。また、今回測定できなかった分子種、異性体も測定することにより、より詳細に酸化ストレスと疾患との関係を明らかにできると考えられる。

3-1-4 結論

過去の報告と一致して、健常者に比べ脂質代謝異常症者では PCOOH 濃度は高値であった。そして、健常者、脂質代謝異常症者いずれの血漿中でも、16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の定量値の合計が 16:0/HpODE PC の総量にほぼ一致したことから、ヒト血中では一重項酸素酸化は生じていないと考えられた。まだ予備試験的段階ではあるが、脂質代謝異常症者において PCOOH 異性体の比率が変化している可能性が考えられた。今回は 16:0/9-HpODE PC の *cis-trans* 異性体が HPLC で分離されたが、今後は 16:0/13-HpODE PC の *cis-trans* 異性体についても分離・定量を行うことで、生体の酸化メカニズムについてより詳細な情報が得られると思われた。

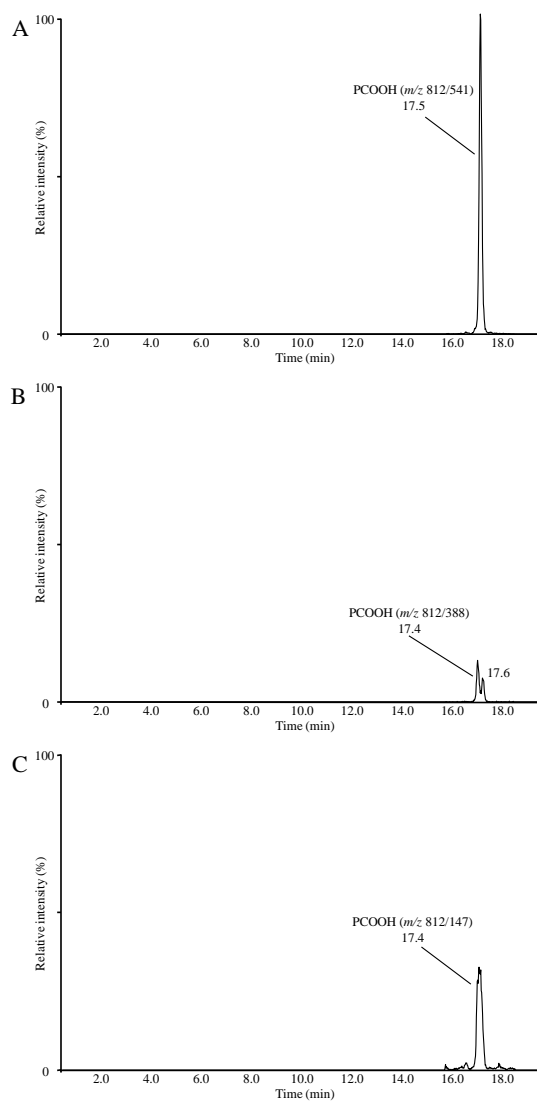


Fig. 3-1 MRM chromatograms of PCOOH in the plasma of healthy subjects. Plasma extracts (10 μ L) were analyzed by LC-MS/MS MRM (812/541 (A), 812/388 (B), and 812/147 (C)) under optimal conditions.

TABLE 1 PCOOH (16:0/HpODE PC) concentrations in plasma of healthy subjects and patients with angiographically significant stenosis

MRM	812/541	812/388	812/147*
	pmol/mL		
Healthy subjects n = 8	36.1 ± 11.5	33.1 ± 10.2	72.3 ± 23.5 (69.3 ± 23.5)
Patients n = 12	52.4 ± 24.6	45.2 ± 18.1	97.3 ± 39.5 (97.6 ± 42.2)
<i>P</i> value	0.063	0.105	0.127

*Contents in parentheses () represents the sum of 16:0/13-HpODE PC (812/541) and 16:0/9-HpODE PC (812/388).

Values are means ± SD.

TABLE 2 Individual PCOOH (16:0/HpODE PC) concentrations in plasma of healthy subjects and patients with angiographically significant stenosis

MRM	812/541	812/388	812/147*
		pmol/mL	
Healthy subjects n = 8	25.4	22.6	49.8 (48.0)
	46.3	41.0	86.4 (87.3)
	50.5	46.0	103.4 (96.5)
	34.7	34.3	67.3 (69.0)
	31.9	30.9	66.1 (62.7)
	49.3	43.5	102.7 (92.8)
	19.0	16.6	38.2 (35.6)
	31.9	30.3	64.8 (62.2)
Patients n = 12	86.9	66.0	138.6 (152.8)
	32.9	32.2	64.4 (65.1)
	45.5	35.0	90.3 (80.5)
	39.0	36.0	77.8 (75.1)
	42.8	38.9	87.2 (81.8)
	112.5	84.3	194.6 (196.8)
	49.8	50.1	99.5 (99.9)
	67.4	69.4	132.5 (136.8)
	33.3	30.2	61.9 (63.6)
	43.6	34.9	80.6 (78.6)
32.3	32.9	61.3 (65.2)	
42.9	32.8	79.1 (75.6)	

*Contents in parentheses () represents the sum of 16:0/13-HpODE PC (812/541) and 16:0/9-HpODE PC (812/388).

TABLE 3 Plasma 16:0/9-HpODE PC *cis-trans* isomers concentration in healthy subjects and patients with angiographically significant stenosis

	16:0/9-hydroperxyoctadeca- 10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -dienoyl PC	16:0/9-hydroperxyoctadeca- 10 <i>E</i> ,12 <i>E</i> -dienoyl PC
	pmol/mL	
Healthy subjects n = 8	18.5 ± 5.4 (56.2 ± 4.2%)	14.6 ± 5.3
Patients n = 12	30.0 ± 15.0 (65.1 ± 7.9%)	15.2 ± 4.9
<i>P</i> value	0.0541 (0.0097)	0.7870

*Contents in parentheses () represents the ratio of 16:0/9-hydroperxyoctadeca-10*E*,12*Z*-dienoyl PC to 16:0/9-HpODE PC. Values are means ± SD.

第3章 小括

本章では酸化ストレス関連疾患と脂質過酸化の関係性を明らかにしようとした。第1章で調製した PCOOH 異性体標品、および第2章で確立した LC-MS/MS 法と血漿 PCOOH 抽出法を用いて、ここでは健常人と脂質代謝異常症の血中 PCOOH 異性体 (16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC) の解析を行った。過去の報告と一致して、脂質代謝異常症者の血中 PCOOH はいずれの PCOOH 異性体についても健常人に比べ高まることが示された。そして、16:0/13-HpODE PC、16:0/9-HpODE PC の血中濃度は健常人と脂質代謝異常症において総 16:0/HpODE PC にほぼ一致しており、血中において一重項酸素酸化は生じていない可能性が示唆された。今後、より詳細な異性体解析と他の脂質パラメーターを比較することで、酸化ストレス関連疾患と脂質過酸化の関係性について新たな知見が得られることが期待された。

総括

本博士論文の目的は血中の過酸化リン脂質 (PCOOH) のヒドロペルオキシド位置異性体を精密に定量することで、酸化ストレスとそれに関与する病態の関係について新たな知見を得ることである。

第1章ではヒドロペルオキシドと 2-Methoxypropene の反応条件およびヒドロペルオキシドの再生条件の検討を行い、より高収率かつ安定な PCOOH 標品調製法を確立した。また、脂肪酸の酵素酸化および脂肪酸メチルエステルのラジカル酸化を用いて、PCOOH 異性体標品の調製法を確立した。これらの方法により、PCOOH のあらゆる位置異性体標品を調製できる可能性が示唆された。

第2章では PCOOH の Na^+ 付加体を親イオンに用いることで、側鎖脂肪酸の構造情報が得られることを明らかにした。そしてこれを応用した LC-MS/MS 法はヒト血中にもっとも多い PCOOH (16:0/HpODE PC) の異性体である 16:0/13-HpODE PC と 16:0/9-HpODE PC の直接定量を可能とした。また、抽出過程における PCOOH 分解の原因が生体サンプルの水溶性画分にあることを明らかにし、その分解を回避できる抽出法を構築した。

第3章では健常人と脂質代謝異常症者(有意狭窄>50%)の血漿中 16:0/HpODE PC 異性体の解析を行った。脂質代謝異常症者の血中 PCOOH はいずれの PCOOH 異性体についても健常人に比べ高値になること、そして、血中において一重項酸素酸化は生じていない可能性を示した。また、病態の進展に伴い血中過酸化リン脂質の異性体組成が変化する可能性が示唆された。

本研究では初めて過酸化リン脂質異性体の直接定量に成功した。そして、一部ではあるが、生体脂質過酸化の原因を明らかにすることができた。本研究はその他の分子種(アラキドン酸型、DHA 型 PCOOH など)にも応用が可能である。これらの方法を発展させることで、脂質過酸化と病態の関係性をより詳細に解明できると思われる。

引用文献

- [1] Ilie, M.; Margina, D. Trends in the evaluation of lipid peroxidation processes. INTECH Chapter 5, 111-130 (2012).
- [2] Morrow, J. D.; Harris, T. M.; Roberts, L. J. 2nd. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* **184**, 1-10 (1990).
- [3] Morrow, J. D.; Prakash, C.; Awad, J. A.; Duckworth, T. A.; Zackert, W. E.; Blair, I. A.; Oates, J. A.; Roberts, L. J. 2nd. Quantification of the major urinary metabolite of prostaglandin D₂ by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal. Biochem.* **193**, 142-148 (1991).
- [4] Morrow, J. D.; Zackert, W. E.; Yang, J. P.; Kurhts, E. H.; Callewaert, D.; Dworski, R.; Kanai, K.; Taber, D.; Moore, K.; Oates, J. A.; Roberts, L. J. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F_{2t}-isoprostane (8-iso-PGF_{2α}) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal. Biochem.* **269**, 326-331 (1999).
- [5] Davì, G.; Ciabattoni, G.; Consoli, A.; Mezzetti, A.; Falco, A.; Santarone, S.; Pennese, E.; Vita-colonna, E.; Bucciarelli, M. T.; Costantini, F.; Capani, F.; Patrono, C. In Vivo Formation of 8-Iso-Prostaglandin F_{2α} and Platelet Activation in Diabetes Mellitus. *Circulation* **99**, 224-229 (1999).
- [6] Liu, S. X.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wan, J. Oxidized cholesterol in oxidized low density lipoprotein may be responsible for the inhibition of LPS-induced nitric oxide production in macrophages. *Atherosclerosis* **136**, 43-49 (1998).
- [7] Itabe, H.; Takeshima, E.; Iwasaki, H.; Kimura, J.; Yoshida, Y.; Imanaka, T.; Takano, T. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation

- of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. *J. Biol. Chem.* **269**, 15274-15279 (1994).
- [8] Itabe, H. ; Yamamoto, H. ; Suzuki, M. ; Kawai, Y. ; Nakagawa, Y. ; Suzuki, A. ; Imanaka, Y. ; Takano, Y. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **271**, 33208-33217. (1996).
- [9] Kato, Y. ; Mori, Y. ; Makino, Y. ; Morimitsu, Y. ; Hiroi, S. ; Ishikawa, T. ; Osawa, T. Formation of Nepsilon-(hexanonyl) lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. A plausible marker for lipid hydroperoxide-derived protein modification. *J. Biol. Chem.* **274**, 20406-20414 (1999).
- [10] Kato, Y. ; Osawa, T. Detection of lipid hydroperoxide-derived protein modification with polyclonal antibodies. *Methods Mol. Biol.* **186**, 37-44 (2002).
- [11] Toyokuni, S. ; Miyake, N. ; Hiai, H. ; Hagiwara, M. ; Kawakishi, S. ; Osawa, T. ; Uchida, K. The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Lett.* **359**, 189-191 (1995).
- [12] Sowell, J. ; Frei, B. ; Stevens, J. F. Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: structural characterization and detection in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17964-17969 (2004).
- [13] Yamada, S. ; Funada, T. ; Shibata, N. ; Kobayashi, M. ; Kawai, Y. ; Tatsuda, E. ; Furuhata, A. ; Uchida, K. Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* **45**, 626-634 (2004).
- [14] Yamada, S. ; Kumazawa, S. ; Ishii, T. ; Nakayama, T. ; Itakura, K. ; Shibata, N. ; Kobayashi, M. ; Sakai, K. ; Osawa, T. ; Uchida, K. Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from

- malondialdehyde and lysine. *J. Lipid Res.* **42**, 1187-1196 (2001).
- [15] Bochkov, V. N.; Oskolkova, O. V.; Birukov, K. G.; Levonen, A.-L.; Binder, C. J.; Stockl, J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid. Redox Sign.* **12**, 1009-1059 (2010)
- [16] Kuhn, H.; Belkner, J.; Weisner, R.; Brash, A. R. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* **265**, 18351-18361 (1990).
- [17] Belkner, J.; Weisner, R.; Rathman, J.; Barnett, J.; Sigal, E.; Kuhn, H. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. *Eur. J. Biochem.* **213**, 251-261 (1993).
- [18] Wittwer, J.; Hersberger, M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **77**, 67-77, (2007).
- [19] Kuhn, H.; Belkner, J.; Zaiss, S.; Fahrenklemper, T.; Wohlfeil, S. Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J. Exp. Med.* **179**, 1903-1911 (1994).
- [20] 岸本幸治; 大日方英; 岸美紀子; 大嶋紀安; 立井一明; 和泉孝志 脂質メ
ダイエーターとしての酸化遊離脂肪酸-G2A の役割を中心に-. 生化学 **83**,
545-554 (2011).
- [21] Liu, W.; Yin, H.; Akazawa, Y.; Yoshida, Y.; Niki, E.; Porter, N. A. Ex vivo oxidation in tissue and plasma assays of hydroxyoctadecajienoates: *Z,E/E,E* stereoisomer ratios. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 986-995 (2010).
- [22] Frankel, E. N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog. Lipid Res.* **23**, 197-221 (1985).
- [23] Miyazawa, T.; Suzuki, T.; Fujimoto, K.; Yasuda, K. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the

- rat. *J. Lipid Res.* **33**, 1151-1159 (1992).
- [24] Miyazawa, T.; Suzuki, T.; Fujimoto, K.; Yasuda, K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **233**, 324-332 (1994).
- [25] Kinoshita, M.; Oikawa, S.; Hayasaka, K.; Sekikawa, A.; Nagashima, T.; Toyota, T.; Miyazawa, T. Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin. Chem.* **46**, 822-828 (2000).
- [26] Chien, C.-T.; Chang, W.-T.; Chen, H.-W.; Wang, T.-D.; Liou, S.-Y.; Chen, T.-J.; Chang, Y.-L.; Lee, Y.-T.; Hsu, S.-M. Ascorbate supplement reduces oxidative stress in dyslipidemic patients undergoing apheresis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1111-1117 (2004).
- [27] Asai, A.; Okajima, F.; Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Tanimura, K.; Nakajima, Y.; Nagao, M.; Sudo, M.; Harada, T.; Miyazawa, T.; Oikawa, S. Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.* **50**, 957-965 (2009).
- [28] Asai, A.; Okajima, F.; Nakajima, Y.; Nagao, M.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T.; Oikawa, S. Involvement of Rac GTPase activation in phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to ICAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 273-277 (2011).
- [29] Nakagawa, K.; Shibata, A.; Saito, T.; Sookwong, P.; Kato, S.; Tsuduki, T.; Matsubara, K.; Miyazawa, T. Phosphatidylcholine hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 1205-1211 (2011).
- [30] Ibusuki, D.; Nakagawa, K.; Asai, A.; Oikawa, S.; Masuda, Y.; Suzuki, T.; Miyazawa, T. Preparation of pure lipid hydroperoxides. *J. Lipid Res.* **49**, 2668-2677 (2008).

- [31] Soumya, S. J.; Binu, S.; Helen, A.; Sudhakaran, P. R.; Anil Kumar, K.; Reddanna, P.; Sudhakaran, P. R. Effect of 15-lipoxygenase metabolites on angiogenesis: 15 (*S*)-HPETE is angiostatic and 15 (*S*)-HETE is angiogenic. *Inflamm. Res.* **61**, 707–718 (2012).
- [32] Zhao, Y.-Y.; Xiong, Y.; Curtis, J. M. Measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: The determination of choline containing compounds in foods. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5470–5479 (2011).
- [33] Narváez-Rivas, M.; Gallardo, E.; Ríos, J. J.; León-Camacho M. A new high-performance liquid chromatographic method with evaporative light scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3453–3458 (2011).
- [34] Rigaudy, J.; Izoret, G. Addition of hydroperoxides to activated double bonds of vinyl ethers. *Compt. Rend.* **236**, 2086–2088 (1953).
- [35] Dussault, P.; Porter, N. A. The resolution of racemic hydroperoxides: the preparation of optically pure hydroperoxide natural products. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6276–6277 (1988).
- [36] Porter, N. A., Dussault, P.; Breyer, R. A.; Kaplan, J.; Morelli, J. The resolution of racemic hydroperoxides: a chromatography-based separation of perketals derived from arachidonic, linoleic, and oleic acid hydroperoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 236–243 (1990).
- [37] Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466–468 (1959).
- [38] Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1956).
- [39] Fagan, P.; Wijesundera, C. Rapid isolation of omega-3

long-chain polyunsaturated fatty acids using monolithic high performance liquid chromatography columns. *J. Sep. Sci.* **36**, 1743–1752 (2013).

- [40] Ahmeda, S.; Atiab, N.N. Simultaneous determination of montelukast as sparing therapy with some inhaled corticosteroids in plasma of asthmatic patients. *J. Pharmaceut. Biomed.* **74**, 250–256 (2013).
- [41] Graeve, M.; Janssen, D. Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids. *J. Chromatogr B* **877**, 1815–1819 (2009)
- [42] Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Nelson, E. C. Acid catalysis of a linoleic acid hydroperoxide: formation of epoxides by an intramolecular cyclization of the hydroperoxide group. *J. Org. Chem.* **49**, 508–515 (1984).
- [43] Morgan, A. H.; Hammond, V. J.; Morgan, L.; Thomas, C. P.; Tallman, K. A.; Garcia-Diaz, Y. R.; McGuigan, C.; Serpi, M.; Porter, N. A.; Murphy, R. C.; O’Donnell, V. B. Quantitative assays for esterified oxylipins generated by immune cells. *Nat. Protoc.* **5**, 1919–1931 (2010).
- [44] Kondo, Y.; Kawai, Y.; Miyazawa, T.; Mizutani, J. Chemiluminescence-HPLC analysis of fatty acid hydroperoxide isomers. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1575–1576 (1993).
- [45] Baba, N.; Yoneda, K.; Tahara, S.; Iwasa, J.; Kaneko, T.; Matsuo, M. A regioselective, stereoselective synthesis of a diacylglycerophosphocoline hydroperoxide by use of lipoxygenase and lipase. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1281–1282 (1990).
- [46] Pauti, S.; Peresson, C.; Braidot, E.; Tubaro, F.; Colussi, A.; Bonnländer, B.; Macri, F.; Vianello, A. Lipoxygenase distribution in coffee (*Coffea Arabica L.*) berries. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8223–8230

(2007).

- [47] 山本尚三; 鹿取信. プロスタグランジン研究法(下), 2 酵素調製法と活性測定法. 東京化学同人 (1987)
- [48] Sekiya, J.; Aoshima, H.; Kajiwara, T.; Togo, T.; Hatanaka, A. Purification and some properties of potato tuber lipoxygenase and detection of linoleic acid radical in the enzyme reaction. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 827-832 (1977).
- [49] 都築毅 平成 16 年度博士論文「共役脂肪酸の食品栄養学的特性に関する研究」 東北大学大学院農学研究科
- [50] Bostock, R. M.; Yamamoto, H.; Choi, D.; Ricker, K. E.; Ward, B. L. Rapid Stimulation of 5-Lipoxygenase Activity in Potato by the Fungal Elicitor Arachidonic Acid. *Plant Physiol.* **100**, 1448-1456 (1992).
- [51] 高村仁知; 的場輝佳. リポキシゲナーゼとシクロオキシゲナーゼの測定 1) 植物. 過酸化脂質実験法-5.
- [52] Chiba, N.; Imai, H.; Nakagawa, Y. Determination of 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid produced in rat basophilic leukemia cell line RBL-2H3 by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. B* **728**, 35-40 (1999).
- [53] 内山充; 松尾光芳; 嗟峨井勝. 過酸化脂質と生体. 学会出版センター (1988).
- [54] Rosario, M.; Domingues, M.; Reis, A.; Domingues P. Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **156**, 1-12 (2008).
- [55] Hui, S.-P.; Chiba, H.; Jin, S.; Nagasaka, H.; Kurosawa, T. Analyses for phosphatidylcholine hydroperoxides by LC/MS. *J. Chromatogr. B* **878**, 1677-1682 (2010).
- [56] Hui, S.-P.; Taguchi, Y.; Takeda, S.; Ohkawa, F.; Sakurai, T.; Yamaki, S.; Jin, S.; Fuda, H.; Kurosawa, T.; Chiba, H. Quantitative

- determination of phosphatidylcholine hydroperoxides during copper oxidation of LDL and HDL by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1831-1840 (2012).
- [57] Nakajima, A.; Hidaka, H. Photosensitized oxidation of oleic acid, methyl oleate, and olive oil using visible light. *J. Photoch. Photobio. A.* **74**, 189-194 (1993).
- [58] Kiko, T.; Nakagawa, K.; Tsuduki, T.; Suzuki, T.; Arai, H.; Miyazawa, T. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* **28**, 593-600 (2012).
- [59] Hui, S.-P.; Chiba, H.; Sakurai, T.; Asamawa, C.; Nagasaka, H.; Murai, T.; Ide, H.; Kurosawa, T. An improved HPLC assay for phosphatidylcholine hydroperoxides (PCOOH) in human plasma with synthetic PCOOH as internal standard. *J. Chromatogr. B* **857**, 158-163 (2007).
- [60] Frei, B.; Yamamoto, Y.; Niclas, D.; Ames, B. N. Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydroperoxide in human blood plasma. *Anal. Biochem.* **175**, 120-130 (1988).
- [61] Yamamoto, Y.; Niki, E. Presence of cholesteryl ester hydroperoxide in human blood plasma. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **165**, 988-993 (1989).
- [62] 伴坐行則; 筒井達也; 橋本貴弘; 出口夫美子; 米田昌裕; 伴創一郎; 川勝剛志; 稲田眞之助; 永井博昭 LC-MS 測定におけるマトリックス効果とその低減.
- [63] Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* **49**, 1041-1044 (2013).
- [64] Nelson, M. D.; Dolan, J. W. Ion suppression in LC-MS-MS — A case study. *LCGC North America* **20**, 24-32 (2002).
- [65] Jessome, L. L.; Volmer, D. A. Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *LCGC North America* **24**, 498-510 (2006).
- [66] Aurand, C. LC-MS ionization effect from solid phase extraction

- extractables. *Supelco The Reporter* **24.4**, 16-18.
- [67] Xia, Y.-Q.; Jemal, M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: composition of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 2125-2138 (2009).
- [68] Ismaiel, O. A.; Zhang, T.; Jenkins, R. G.; Karnes, H. T. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **878**, 3303-3316 (2010).
- [69] Hamberg, M. Decomposition of unsaturated fatty acid hydroperoxides by hemoglobin: structures of major products of 13L-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid. *Lipids* **10**, 87-92 (1975).
- [70] Peers, K. E.; Coxon, D. T.; Chan, H. W.-S. Thermal decomposition of individual positional isomers of methyl linolenate hydroperoxides, hydroperoxy cyclic peroxides and dihydroperoxides. *Lipids* **19**, 307-313 (1984).
- [71] Xu, F.; Zou, L.; Lin, Q.; Ong, C. N. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and online databases for identification of phosphocholines and lysophosphatidylcholines in human red blood cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3243-3254 (2009).
- [72] LC-MS 分析における効果的な塩の使用法. *Analytix* **5** 1-28 (2007).
- [73] Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **37**, 911-917 (1959).
- [74] Nagashima, T.; Oikawa, S.; Hirayama, Y.; Tokita, Y.; Sekikawa, A.; Ishigaki, Y.; Yamada, R.; Miyazawa, T. Increase of serum

- phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **56**, 19-25 (2002).
- [75] Tokita, Y.; Hirayama, Y.; Sekikawa, A.; Kotake, H.; Toyota, T.; Miyazawa, T.; Sawai, T.; Oikawa, S. Fructose ingestion enhances atherosclerosis and deposition of advanced glycated end-products in cholesterol-fed rabbits. *J. Atheroscler. Thromb.* **12**, 260-267 (2005).
- [76] Piotrowski, J. J.; Shah, S.; Alexander, J. J. Mature human atherosclerotic plaque contains peroxidized phosphatidylcholine as a major lipid peroxide. *Life Sci.* **58**, 735-740 (1996).
- [77] Ravandi, A.; Babaei, S.; Leung, R.; Monge, J. C.; Hoppe, G.; Hoff, H.; Kamido, H.; Kuksis, A. Phospholipids and oxophospholipids in atherosclerotic plaques at different stages of plaque development. *Lipids* **39**, 97-109 (2004).
- [78] Beckman, J. A.; Creager, M. A.; Libby, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**, 2570-2581 (2002).
- [79] Hurst, R. T.; Lee, R. W. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. *Ann. Intern. Med.* **139**, 824-834 (2003).
- [80] Steinberg, D. An interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* **46**, 2037-2051 (2005).
- [81] O'Donnell, V. B.; Murphy, R. C. New families of bioactive oxidized phospholipids generated by immune cells: identification and signaling actions. *Blood* **120**, 1985-1992 (2012).

謝辞

本研究は、終始、宮澤陽夫教授、仲川清隆准教授のもとで行われたものであることを記すとともに、博士課程後期課程の修了に臨み、懇切なご指導とご鞭撻を賜ったことに心より感謝の意を表します。

また、本論文を校閲して頂きました山下まり教授と都築毅准教授に心より感謝いたします。

日本医科大学の及川眞一教授、浅井明博士、心臓血管研究所付属病院の永島和幸部長には研究に関して助言とサンプル提供を頂き、感謝いたします。

そして本研究を遂行していくにあたり、適切な指導、助言を頂きました木村ふみ子助教、機能性植物研究所の樋口央紀博士に深謝いたします。

また、温かい雰囲気です研究室に迎え入れ、研究面では丁寧で柔軟にアドバイスをくれ、様々な面で交流をして下さった機能分子解析学研究室の多くの仲間と先輩方に深く御礼申し上げます。最後に精神的、経済的に多大な支援をしていただき、私のわがままな思いを理解してくれた家族と支えてくれた友人たちに心から感謝します。

平成 26 年 2 月

