

氏 名(本籍)	安 田 啓 一
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 6 7 号
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	ヒト血中過酸化リン脂質の超微量定量に 関する研究

論文審査委員(主査)	教 授 藤 本 健四郎
	教 授 安 元 健
	教 授 目 黒 熙
	助教授 宮 澤 陽 夫

論文内容要旨

緒言

生体内での脂質の過酸化反応は、正常な生理機能により制御されていると考えられているが、動脈硬化症、糖尿病などの疾病や細胞老化現象との関係が示唆されるにつれ、過酸化脂質の蓄積が持つ意義が注目されるようになった。従来、油脂化学や食品化学の立場から不飽和脂肪酸の自動酸化反応をはじめいろいろな酸化反応についてよく研究されてきているが、その研究の流れは生体系へと大きく移行しつつある。とくに、医学臨床的あるいは栄養学的立場から、ヒト体内における過酸化脂質の生成と生体機能との関係を知るためには、健常者血中の過酸化脂質の分布やその存在量を正確に明らかにすることが重要と思われる。これに伴い、より高感度で特異性の高い過酸化脂質分析法の開発とその応用が強く望まれてきた。

生体脂質（リン脂質、トリグリセリドなど）を構成する脂肪酸は、分子状酸素（三重項）による自動酸化反応、光増感反応で生じる一重項酸素などの活性酸素種との反応、あるいはリポキシゲナーゼなどによる酵素的な酸素化反応を受け、反応一次産物として脂肪酸ヒドロペルオキシドを生じる。これは、さらに分解や酵素的修飾により、エポキシド、アルコール、ケトン、アルデヒドなどの酸化二次生成物となる。とくに、生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、高度不飽和脂肪酸に富むために過酸化反応を受けやすく、その第一次産物であるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成量が問題とされる。

これまでに、数多くの過酸化脂質分析法が報告されているが、分析法によって過酸化脂質の測定対象が異なるために論議がかみ合わなくなることがしばしば見られ、特に定量的および分子レベルでの検討が困難であった。生体組織中の過酸化脂質の定量には、TBA（チオバルビツール酸）法が広く用いられてきた。TBA法は、過酸化脂質の分解で生じるアルデヒド類をチオバルビツール酸と反応させ、生じる赤色色素を比色法または蛍光法で定量する。しかし、この方法はチオバルビツール酸が過酸化脂質に由来するアルデヒド以外の成分とも反応すること、過酸化脂質の構造によりアルデヒド類の生成比および量が異なること、加熱などの分析条件により定量値が大きく変化するなど問題点が多く指摘されている。他の定量法も感度、特異性の点で問題が多いとされている。

そこで、真の脂質過酸化の進行とその生理的意義を知るためには、反応一次産物であるヒドロペルオキシド体を脂質クラスのレベルで精度よく分離し、検出定量することが必要であると考えた。本研究では、まず生体膜脂質として非常に重要な機能を持ち、かつ広く分布しているリン脂質に着目し、生体試料中のリン脂質ヒドロペルオキ

シドを精度よく分離定量できる分析法の開発を行い、ヒト血中の過酸化リン脂質の分布およびその存在形態や存在量を明らかにし、過酸化脂質研究における基本的問題点の解明を試みた。

第1章 ヒドロペルオキシド定量のための化学発光-高速液体クロマトグラフ法の開発

生体組織中のヒドロペルオキシド型の過酸化脂質の定量を行うため、化学発光-高速液体クロマトグラフ (CL-HPLC) 法を開発した。本法は、化学発光法の高感度な特性とHPLC法による脂質クラスレベルへの高分離能という両者の長所を組合わせたものである。Fig. 1に示すように、順相シリカカラムのHPLCで分離した各脂質クラス中のヒドロペルオキシド型過酸化物をチトクロームc-ルミノール系の化学発光試薬で発光させ検出することを基本原理とした。はじめに卵黄レシチンの光酸化で調製したホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) を用いて本法のヒドロペルオキシド体に対する反応特異性を検討した。その結果、HPLCで分離された脂質クラスのヒドロペルオキシド型過酸化物 (PCOOH) を化学発光法で選択的に定量することができ、未酸化脂質やヒドロペルオキシドの還元生成物であるヒドロキシ脂質の影響を受けないことが明らかにされた (Fig. 2)。

本法を実際に生体組織に応用する場合、 α -トコフェロール等の光を消去する抗酸化物質はHPLCカラムで過酸化物から分離されるため影響が出ないという長所がある。しかし、生体組織の過酸化物の定量のためにはまだ検出感度が不十分 (nmolオーダー) であったので感度向上への工夫をさらに行った。すなわち、光電子増倍管 (PM) 下でのヒドロペルオキシド基依存の化学発光反応の滞留時間を長くするため、それまで用いていたUV検出器用のフローセル (vol: 80 μ l) から渦巻き型のセル (vol: 500 μ l) に交換するとともにPM面とセル間の距離を縮めた。その結果、検出感度の上昇がはかられ、PCOOHの場合 10pmolから 2000pmolの範囲でヒドロペルオキシドの定量が可能になり (Fig. 3)、生体組織中とくに臨床試験に応用しやすいヒト血中のヒドロペルオキシド型過酸化脂質の検出を十分可能にした。

第2章 ヒト血漿のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの分析

ここで開発したCL-HPLC装置を実際にヒト血漿のPCOOHの検出定量に応用した。ヒト血漿からクロロホルム-メタノール混液を用いて総脂質を抽出し、これをCL-HPLC分析に供した。その結果、健康人血漿中にPCOOHの存在が世界で初めて確認された (Fig. 4)。健康人では10nMから500nMの範囲でPCOOHが存在し、その平均値は約227nMであった。また、動脈硬化症をはじめとする各種疾病と血漿 PCOOH量の関係についても検討した。その結果、動脈硬化症、高脂血症、脳および心臓血管障害などで高レベルのPCOOH (500nMから10000nM) が血漿中に検出される場合のあることを初めて明らかにした (Fig. 5)。

第3章 健康人血中の過酸化リン脂質の分布

第2章で健康人血漿にPCOOHが存在することが明らかにされたが、赤血球もまたその機能上、酸素と接する機会が多いことから赤血球膜のリン脂質にも過酸化物の存在が考えられたので、その検討を行った。

第1章で開発した分析条件では、ホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) と α -トコフェロールの保持時間が近接するため、PEOOHの発光反応と α -トコフェロールの消光反応が重なりPEOOHの正確な定量が困難であった。そこでPCOOHとPEOOHを同時分析するためアミノプロピルカラムを用いたCL-HPLC分析を行った。

健康人血中の過酸化リン脂質は、血漿ではPCOOH (159 ± 10 nM) が大部分であり、赤血球膜からはPCOOH (107 ± 14 nM) と共にPEOOH (139 ± 17 nM) も相当量検出された。この様に、血漿と赤血球では、リン脂質ヒドロペルオキシドの組成に大きな差のあることがはじめて明らかになった。この時、血漿と赤血球で、総リン脂質に対するリン脂質ヒドロペルオキシドのモル比に差はみられず、リン脂質全体に占める過酸化物の量は血漿と赤血球では大きな差がないことがわかった (Fig. 6, Table 1)。血漿中のPCOOHとPEOOHの比は 97:3であり、血漿リン脂質ヒドロペルオキシドの大部分はPCOOHであることがはじめて明らかになった (Fig. 7)。

第4章 ヒト血中の過酸化リン脂質の保存安定性と人為的生成物でないことの証明 および添加回収実験

ヒト血漿の過酸化リン脂質の分析を行うにあたって、過酸化リン脂質と血漿の保存安定性と保存時の凍結融解の影響を明らかにする必要があると考え、標品の卵黄PCOOHとヒト血漿を、それぞれ 5°C, -25°C, -85°C暗所で保存し、その変化を調べた。その結果、標品PCOOHは-25°Cと-85°Cで、血漿は-85°Cで保存した場合、少なくとも6か月間はPCOOHは安定に保たれることがわかった。また、血漿を-85°Cで保存した場合でも、凍結融解を繰り返すとPCOOH量が明らかに増加することもわかった。これらの結果から、標品PCOOHは-25°Cに、血漿は-85°Cに保存し、凍結融解を繰り返さないことが分析試料の保存時に必要であることを確認した。

また、ヒトの血中に検出されるリン脂質ヒドロペルオキシドが、血中からの総脂質の抽出操作中に生成したものであるという疑義を明らかにするため、以下の検討を行った。標品PCOOHと血漿をインキュベートした場合、脂質抽出溶媒（クロロホルム-メタノール）に添加している抗酸化剤ブチルヒドロキソトルエンの存在下ではPCOOH定量値に変化はなく、人為的に血中のリン脂質が過酸化を受けないことが確認された。さらに血漿については、総脂質の抽出回数を重ねても総リン脂質に対するPCOOH量に差はなく、血漿脂質が抽出操作中に人為的過酸化を受けないことを確認した (Table 2)。また、赤血球では、溶血時ヘモグロビンによる過酸化物の分解が考えられたが、溶血液を赤血球ゴースト膜に加えた場合にも過酸化リン脂質量に差はなく、溶血による定量値への影響のないことを確認した (Table 3)。以上の結果から、健康人の血漿と赤血球中で検出されるリン脂質ヒドロペルオキシドが抽出操作中の人為的生成物でないことを確認した。

CL-HPLC法により血中のリン脂質ヒドロペルオキシドがどの程度回収定量されているのかを知るため添加回収実験を行った (Table 4, 5, 6)。血漿に標品ヒドロペルオキシド (外因性) を添加した時の回収率は60%であり、リポソームとして加えた場合の回収率も64%と低かったが、あらかじめ分離した低密度リポタンパク質 (LDL) (内在性) を加えた時はPCOOHの回収率は97%であった。また、赤血球膜に標品リン脂質ヒドロペルオキシド (外因性) を加えた時の回収率は17%程度であったが、赤血球ゴースト膜 (内在性) を加えた時はリン脂質ヒドロペルオキシドの回収率は91%であった。これらの結果から本法により定量された血漿および赤血球の過酸化リン脂質の回収率は、ほぼ100%に近いものであり、CL-HPLCによる定量値が血中過酸化リン脂質の真の値を示すことがわかった。なお、血漿に過酸化したLDLを加えインキュベーションを長

時間行くと時間とともに酸化LDLのPCOOHの定量値が低下した(Fig. 8)。これは、酸化LDL中の過酸化リン脂質が血漿成分の作用を受け通常の血漿中の過酸化脂質レベルまで減少されたものと考えられ、血漿過酸化リン脂質レベルを一定に保とうとする生体恒常性を維持する機構の存在も示唆された。

第5章 ヒト血中の過酸化リン脂質の分子種分析

ヒト血中から検出された過酸化リン脂質がどのような脂肪酸のヒドロペルオキシドからなっているのかを知るためにHPLCで分取したPCOOHとPEOOHの画分をさらに逆相カラム(C₁₈)のCL-HPLCに供し、その分子種分析を世界で初めて試みた。

PCOOHは、血漿と赤血球で分子種組成に差はみられなかったが、いずれも 16:0-18:200H-PC, 16:0-20:400H-PC, 18:0-18:200H-PC, 18:0-20:400H-PCが主分子種であった(Fig. 9, 10)。赤血球のPEOOHの分子種は、PCOOHより多くの分子種からなっておりその同定は困難であった(Fig. 11)。これは、赤血球のPEにはエーテル型リン脂質が存在することと、PCとPEの構成脂肪酸の差に由来すると思われた。

第6章 ヒトの血漿リポタンパク質画分における過酸化リン脂質の分布

これまでの実験から、健常人の血漿の過酸化リン脂質はリポタンパク質画分に分布すると考えられたため、過酸化リン脂質が血漿リポタンパク質中にどのような割合で分布しているのかを知ろうとした。

血漿を超速心分画法により超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、高密度リポタンパク質(HDL)、残渣(Bottom)に分画して、それぞれから抽出した総脂質をCL-HPLCに供した。その結果、過酸化リン脂質はLDLとHDLに存在し、とくにLDLに最も多く分布していることがはじめて明らかになった。一方、TBA反応物をみた場合、残渣画分で高い値を示した(Fig. 12, Table 7)。

一方、LDLとHDLの過酸化の受けやすさを比較すると、LDLのリン脂質は、HDLより過酸化を受けやすいことが明らかとなった(Fig. 13)。LDLとHDLに含まれるPCの脂肪酸組成に差はみられなかったが、HDLでは α -トコフェロールとタンパク質含量がLDLよりも高いために脂質過酸化を受けにくいものと思われた。このことは、血漿のPCOOHがLDLに多く含まれていることを裏づける結果であり、過酸化脂質と各種疾病との関

係を知る上でLDLの過酸化が重要なキーポイントであることが強く示唆された。

第7章 ヒト血中の過酸化リン脂質レベルに対する食事摂取の影響

ヒト血中の過酸化リン脂質の日内変動を知るために、食事摂取の影響を検討した (Fig. 14)。

血漿では、食事摂取によりトリグリセリドの増加がみられたが、リン脂質、コレステロールエステル、コレステロール、タンパク質含量等に影響は全くみられず、血漿中のPCOOHとTBA反応物も食事の前後で変化はなかった (Fig. 15)。このことから、食事摂取による血漿過酸化リン脂質レベルへの影響は大きくないと思われた。一方、赤血球でも、リン脂質ヒドロペルオキシド含量やTBA反応物に全く食事の前後で差はなかった (Fig. 16)。

ヒトでは、食事摂取による血中の過酸化リン脂質レベルへの影響はほとんどないことが明らかとなった。健常者血中に微量に存在する過酸化リン脂質は、それ自身が何らかの生理的役割をもつことが期待される一方、疾病等での異常な過酸化リン脂質の蓄積は細胞障害の原因となりうるということが強く考えられた。

総括

生体組織中に存在する過酸化脂質の定量を目的として化学発光 (CL)-HPLC法を考案し、本法を用いてヒト血中のリン脂質ヒドロペルオキシドの分布とその存在形態を検討した。本研究により以下のことがはじめて明らかにされた。

1. 化学発光-高速液体クロマトグラフ (CL-HPLC)法を開発し、本法は、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシドを10から2000pmolの間で定量可能であり生体組織への応用が十分可能であることを確認した。
2. CL-HPLC法を用いてヒト血漿のリン脂質ヒドロペルオキシドを定量した。健常人では、PCOOHが10nMから500nMの範囲内にあり、動脈硬化症等の患者の血漿PCOOH量は、500nMから10000nMの有意に高い値を示す場合のあることがわかった。
3. 健常人血中の過酸化リン脂質は、血漿ではPCOOHが大部分を占め、赤血球ではPCOOHのほかにPEOOHも存在することを明らかにした。検出されたリン脂質ヒドロペルオキシドは抽出や分析操作中に生成したものではないことを確認した。血漿と赤血球のPCOOHの分子種に差はなかったが、赤血球のPEOOHはPCOOHより複雑な分子種組成

を持つことが確認された。血漿PCOOHはLDLに多く存在し、HDLにはあまり存在せず、HDLよりLDLのリン脂質が過酸化を受けやすいことを明らかにした。

4. 健常人血中の過酸化リン脂質は、食事摂取の影響をほとんど受けないことが明らかになった。すなわち、健常人血中の過酸化リン脂質は食事などの一時的な影響を受けるほど敏感ではなく、例えば、食生活や慢性的なストレスなどのようなより長期的なサイクルで変化しているものと思われた。
5. 健常人血中の過酸化脂質レベルは個人差があるものの一定値をとり、健常人血中の過酸化リン脂質は何らかの生理的機能を発揮していると考えられた。しかし、疾病などで観測された比較的高いレベルの過酸化リン脂質は血中においてそれ自体細胞障害の原因になっている可能性が示唆された。

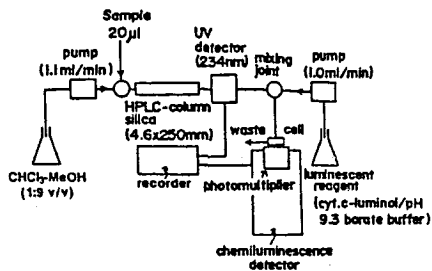


Fig.1 CL-HPLC system for the assay of phosphatidylcholine hydroperoxide

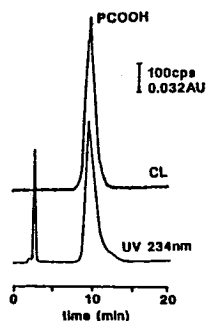


Fig.2 CL-HPLC pattern of PCOOH (145 nmol hydroperoxide-O₂)

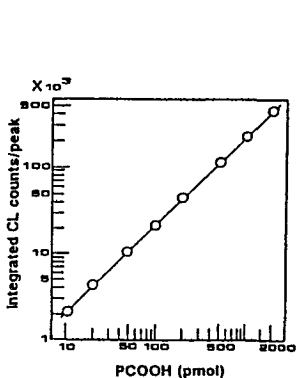


Fig.3 Calibration line of PCOOH in CL-HPLC

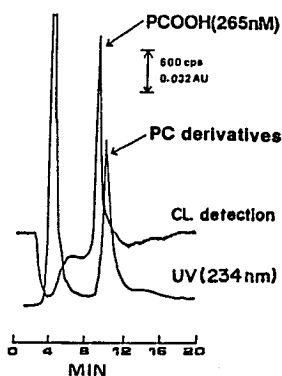


Fig.4 CL-HPLC of PCOOH in human plasma lipids

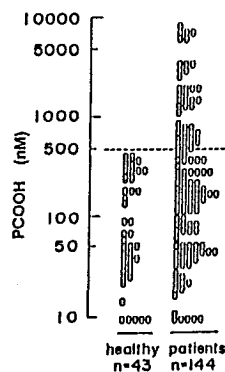


Fig.5 Human plasma PCOOH levels determined by CL-HPLC

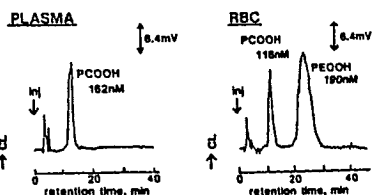


Fig.6 CL chromatograms of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma and red blood cells

Table 1 Lipid composition and phospholipid hydroperoxide contents in plasma and red blood cells obtained from healthy human donors

Human blood samples	Total lipids (mg/ml)	Phospholipids (% total lipids)	PCOOH (nM)	PEOOH (nM)	PCOOH+PEOOH / Phospholipid (molar ratio)
plasma	4.0 ± 0.3	37.7 ± 2.5	158 ± 10	< 10	8.0 × 10 ⁻⁶
red blood cells (packed cells)	4.5 ± 0.3	58.4 ± 5.0	107 ± 14	139 ± 17	8.0 × 10 ⁻⁶

Values represent means ± SEH of 10 donors (26 ± 1 of age).
 PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide.
 PEOOH, phosphatidylethanolamine hydroperoxide.

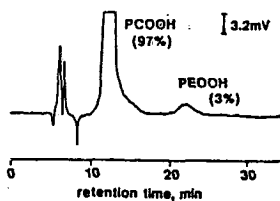


Fig.7 Chemiluminescence chromatogram of plasma phospholipid hydroperoxides recorded when the total lipids extracted from 5ml of plasma was assayed in CL-HPLC

Table 2 No formation of artificial PCOOH during the extraction of total lipids from human blood plasma

PCOOH, pmol/μg PL phosphorus		
1st extraction	1st extraction + 2nd extraction	1st extraction + 2nd extraction + 3rd extraction
1.9±0.1	1.8±0.4	1.7±0.2

Mean±SE of 4 experiments

Table 3 No effect of RBC hemolysate on the assay of hydroperoxides in RBC membrane

Sample	PCOOH	PEODH
	pmol/mg RBC ghost protein	
RBC ghost*	8.4±0.5	16.1±1.8
RBC ghost* + hemolysate solution*	8.3±0.9	15.2±1.2

Values represents mean±SE of 5 experiments.
 *RBC ghost(3mg prot./ml suspension) was prepared for fresh blood by the method of Burton et al.
 *Hemolysate solution was contained 8.2g hemoglobin/dl 0.9% NaCl solution. Hydroperoxide contents were determined by CL-HPLC of RBC total lipids extracted after latin incubation of RBC samples in the ice bath.
 PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide; PEODH, phosphatidylethanolamine hydroperoxide.

Table 4 Recoveries of phospholipid hydroperoxides from normal saline and blood plasma

Systems	PCOOH	PL phosphorus
	% recovery	% recovery
plasma (ml+PCOOH(400pmol) (n=11)	80±4	94±2
plasma (ml+liposome(PCOOH 400pmol) (n=8)	84±4	95±4
saline (ml+PCOOH(400pmol) (n=8)	93±4	90±8
saline (ml+liposome(PCOOH 400pmol) (n=11)	91±3	94±1

Values represent mean±SE of 8-11 experiments.

Table 5 Recoveries of phospholipid hydroperoxides from human plasma

Systems	PCOOH	PL phosphorus
	% recovery	% recovery
plasma total lipid+PCOOH(400pmol) (n=4)	100±1	-
plasma (ml+me-18:2-OOH*(400pmol) (n=4)	102±4	-
plasma (ml+PEODH(400pmol) (n=5)	PCOOH: 95±8 PEODH: 87±3	101±1
plasma (ml+LX(550pmol PCOOH/60μg prot.) (n=4)	87±2	96±1

*Methyl linoleate hydroperoxide.
 Values represent mean±SE of 4-5 experiments.

Table 6 Recoveries of phospholipid hydroperoxides from human red blood cells

Systems	PCOOH recovery (%)	PEODH recovery (%)	Total phospholipids phosphorus recovery (%)
	RBC packed cells + liposome PLCOOH (containing 290pmol PCOOH and 28pmol PEODH)	17±4	14±3
RBC packed cells + RBC ghost (containing 70pmol PCOOH and 74pmol PEODH)	91±6	91±4	96±6

Values represent mean±SE of 5 experiments.

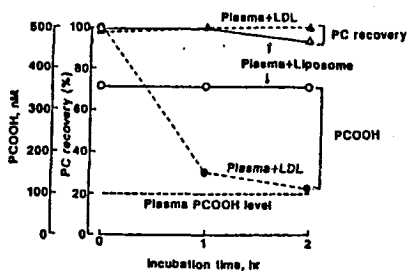


Fig.8 Effect of plasma against liposome PCOOH and LDL PCOOH contents

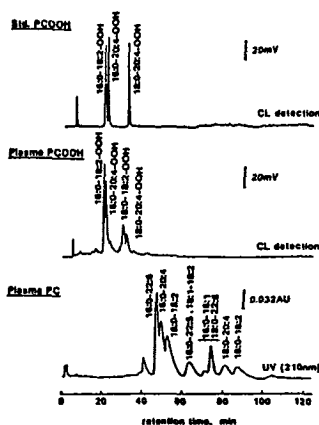


Fig.9 Molecular species of human plasma phosphatidylcholine hydroperoxide

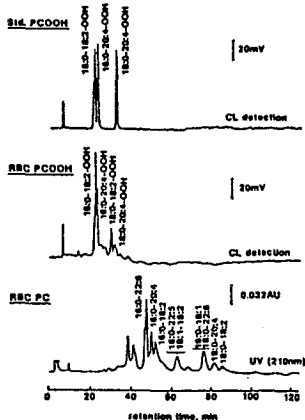


Fig.10 Molecular species of phosphatidylcholine hydroperoxide in human red blood cell membrane

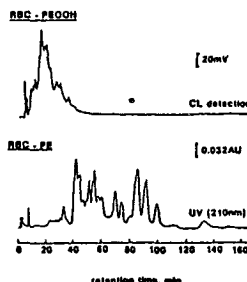


Fig.11 Molecular species of phosphatidylethanolamine hydroperoxide in human red blood cell membrane

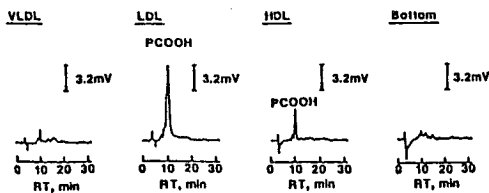


Fig.12 CL chromatograms of phospholipid hydroperoxides present in human plasma lipoproteins

Table 7 Phospholipid hydroperoxide and TBARS contents of plasma lipoproteins obtained from healthy human donors

Lipoprotein	VLDL	LDL	HDL	Bottom
PCOOH	pmol/ml plasma (% plasma total PCOOH)	<10 (13)	42.5±7.3 (57)	12.4±3.2 (17)
	pmol/μg phosphorus	<0.2	2.3±0.4	0.7±0.3
TBARS	nmol/ml plasma (% plasma total TBARS)	1.32±0.19 (16)	1.96±0.07 (24)	2.12±0.29 (26)
		2.70±0.18 (33)		

Values represent means±SE of 4 donors. Figures in parentheses are relative percentages.

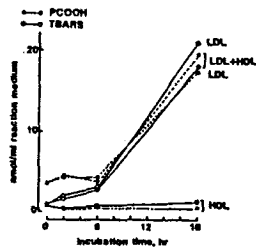


Fig. 13 Time course for the formation of phosphatidylcholine hydroperoxide and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during the oxidation of human LDL and HDL

(Experimental protocol)

Normal human subjects (10a): after 12hr fasting (n=4; male 3, female 1)

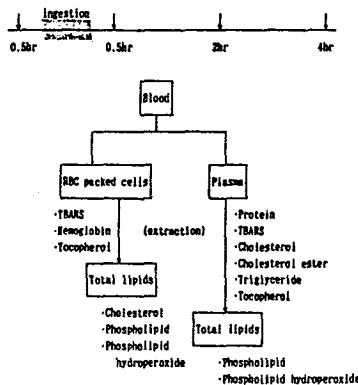


Fig.14 Experimental protocol for studying the effect of food ingestion on blood phospholipid hydroperoxide levels in healthy human volunteers

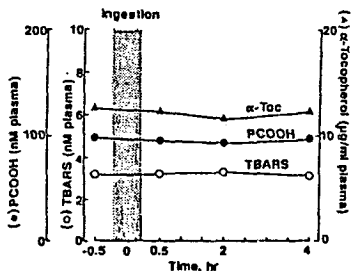


Fig.15 Effect of food ingestion on phosphatidylcholine hydroperoxide, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and α -tocopherol contents in human plasma

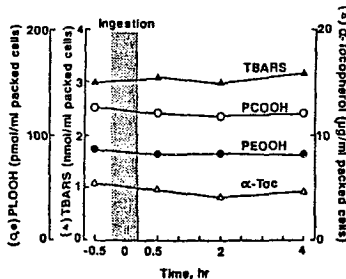


Fig.16 Effect of food ingestion on phosphatidylcholine hydroperoxide, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and α -tocopherol contents in human red blood cells

発表論文

- 1) "Chemiluminescence-high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide." Anal. Lett., 20, 915-925 (1987)
- 2) "Determination of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma by chemiluminescence-high performance liquid chromatography." Anal. Lett., 21, 1033-1044 (1988)
- 3) "Presence of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma." J. Biochem., 103, 744-746 (1988)
- 4) "Chemiluminescence-high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide in human blood plasma." in "Oxygen Radicals in Biology and Medicine", ed. by M. G. Simic et. al., Plenum Publ. Co., pp.191-194 (1989)
- 5) "Chemiluminescent detection of lipid hydroperoxides in food and biological tissues." Proc. ISF-JAOCS World Congress, 1988, Vol. I pp. 315-323
- 6) "Further characterization of phospholipid hydroperoxides present in human plasma and red blood cells." J. Lipid Res., submitted for publication.

審査結果の要旨

生体膜を構成しているリン脂質中の多価不飽和脂肪酸は、過酸化反応により一次産物としてヒドロペルオキシドを生成する。本反応は、通常は一定のレベルで制御されているが、動脈硬化症、糖尿病などの疾病や老化などの場合には異常に亢進することが示唆されている。

脂質ヒドロペルオキシドの定量法としては、ヨウ素滴定法が公定法となっているが感度が低く、生体試料には適当な方法がなかった。そこで、従来、チオバルビツール酸（TBA）法が汎用されてきたが、過酸化脂質との反応特異性が低いという問題がある。そこで本研究では、臨床検査試料として最も重要な血液中の脂質ヒドロペルオキシドの特異的微量定量法の確立を目的として、化学発光を検出に用いた高速液体クロマトグラフ（CL-HPLC）法の開発を行ったものである。

第一に、順相系カラムでクラス別に分離した脂質ヒドロペルオキシド含有脂質を、チトクロームc- α -ニール系発光試薬と反応させ、光電子増倍管で検出する脂質ヒドロペルオキシド検出の基本的骨格を確立した。本法では、化学発光を消去するトコフェロールなどの抗酸化剤の影響を除去することができ、主要脂質であるホスファチジルコリン中のヒドロペルオキシド（PCOOH）の定量が可能になった。

第2に、CL-HPLCを実際にヒト血漿に応用し、健常人血漿中10–500 nMのPCOOHを初めて検出した。また、動脈硬化症、糖尿病等の患者には、極めて高濃度のPCOOH（ $\sim 10^4$ ）を示す場合があった。健常人血液では、血漿以外にも赤血球にヒドロペルオキシドが存在し、赤血球ではPCOOHと共にホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド（PEOOH）の存在が明らかになったので、PCOOHとPEOOHの同時定量のために分析条件を設定した。

第3に、ヒト血中の過酸化リン脂質は -85°C で安定性であり、抽出操作中には変動したことを明らかにした。さらに、標品PCOOHの添加回収率は60%だったが、血漿中の存在形態であるリポたんぱく質として加えると、回収率はほぼ100%に近かった。

第4に、ヒト血漿中の過酸化リン脂質のリポたんぱく質画分の分布を調べ、LDLに最も多いことを明らかにした。また、逆相系カラムを用いてPCOOHの分子種分析を行い、主要分子種を明らかにした。

以上のように、本研究はヒト血液中のリン脂質ヒドロペルオキシドの微量定量法を確立したもので、生体中の脂質過酸化反応を研究する上で、重要な貢献をするものとして、審査員一同は著者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。