

別紙1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	乙	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 浅野 友美

論 文 題 目

One-Pot Extraction and Quantification Method for Bile Acids in the Rat Liver
by Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

(ラット肝臓中胆汁酸のワンポット抽出法およびキャピラリー液体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いた胆汁酸定量方法の構築)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

加藤 昌志 

名古屋大学教授

委員

若井 建志 

名古屋大学教授

委員

木山 博資 

名古屋大学教授

指導教授

石井 晃 

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2


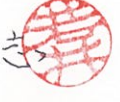


本研究では、キャピラリー液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (cLC/MS/MS) を用いたラット肝臓中の胆汁酸定量方法を構築した。メタノール/アセトニトリル混液によるワンポットでの肝臓中胆汁酸の簡易・高回収率な抽出と、より最適な移動相の選択により、検出下限が 0.9-10 ng/g liver、定量下限が 2.3-27 ng/g liver、日内・日間における確度および精度の変動が概ね 20%以下の高い定量性と再現性が示された。NASH モデルラット ; SHRSP5/Dmcr に適用した結果、normal 群と NASH 群の明確な胆汁酸プロファイルの変動を確認し、10 種の胆汁酸の有意な変化を捉え、その有用性が確認された。本法は、様々な疾患における胆汁酸の病態生理学的特性の解明に役立つことが示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

- 1 および 2. 分子量が同じ異性体であるウルソデオキシコール酸とヒオデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸とデオキシコール酸、およびそれらのグリシンやタウリンの抱合体は分離が困難であるが、構築法では通常 (conventional) のカラムより直径の細かいキャピラリーカラムと移動相の選択により良好に分離できている。また、日内・日間の精度、確度も高く、各胆汁酸の定量精度や再現性も良いため有用性、実用性は高いと考えられる。しかし、臨床応用するためには血中胆汁酸の測定が必要になると考えられる。試料採取や分析条件などの最適化は必要となるが、本手法を応用すれば血中胆汁酸の分析も可能となり、臨床への適用も期待できると考える。
3. SHRSP5/Dmcr は Wister Kyoto (WKY) から易脳卒中発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を経て作成されたモデルで、高コレステロール・高脂肪 (HFC) 食により NASH を発症する。本研究の主目的は、構築した分析法の実用性を示すことであり、そのためには、NASH により線維化を起こしている肝臓と、線維化が起こっていない肝臓での胆汁酸組成の違いを確認することが重要と判断した。よって、SHRSP5/Dmcr に HFC 食を与えたもの (NASH 群) と control 食を与えたもの (normal 群) を比較した。結果として両群の明確な胆汁酸組成の差を捉え、構築法の実用性が確認された。
4. cLC は、従来法で用いられてきた conventional LC と比較し、カラムの内径が細く、移動相の流量も少ない。これにより成分の分離能力が向上し、MS/MS 部へ取り込む際の対象成分のイオン化効率、すなわち検出感度が向上する。胆汁酸は異性体が多く、生体試料中の胆汁酸の定量を行うためには高分離かつ高感度な分析が必要である。本研究は cLC/MS/MS を用いることで、従来法と比べ胆汁酸をしっかりと分離することができ、かつ、イオン化効率の向上による高感度な分析法を構築することに成功した。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 乙 第	号	氏 名	浅野友美
試験担当者	主査	加藤 昌志 	副査 ₁	若井 建志 
	副査 ₂	木山 博資 	指導教授	石井 晃 
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cLC/MS/MSの有用性について 2. 構築した分析法の実用化、臨床分野への応用について 3. 遺伝子変異が起こっているNASHモデルラット;SHRSP5/Dmcrにcontrol食を与えNASHを発現していない検体をnormalとした根拠について 4. 従来の胆汁酸分析と本研究で開発した手法 (cLC/MS/MS) の相違について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、法医・生命倫理学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				

学力審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 乙 第	号	氏 名	浅野友美
試験担当者	主査	加藤昌志	副査 ₁	若井 達志
	副査 ₂	木山博資	指導教授	石井 晃
(学力審査の結果の要旨)				
<p>名古屋大学学位規程第10条第3項に基づく学力審査を実施した結果、大学院医学系研究科博士課程を修了したものと同等以上の学力を有するものと学位審査委員合議の上判定した。</p>				