

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07860

研究課題名(和文) 新規超微量定量法を用いた超早産児血漿中脂肪酸組成の経時的変化と慢性肺疾患の関係

研究課題名(英文) Relationship between changes over time in plasma fatty acid composition in very preterm infants and the development of bronchopulmonary dysplasia using a novel ultra-trace quantification method.

研究代表者

荻原 享 (Tohru, Ogihara)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：00211128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖不飽和脂肪酸は、乳児の発育や神経発達に必須であり、その欠乏は、新生児慢性肺疾患、未熟児網膜症などの疾患と密接に関連するばかりでなく、長期的な神経発達予後にも影響する。また、炎症収束性脂質メディエーターの母体分子でもある。各臓器や脳への脂質輸送という点から考えると、遊離型およびリポタンパク中のエステル型脂質が重要で、血清あるいは血漿中の総量を、比率ではなく絶対量で評価すべきである。今回、超微量の血漿を用いた、GCMSによる超高感度な測定方法を用いて、新生児慢性肺疾患発症との関連性を調べる予定であったが、研究途中でGCMSが修理不能に陥ったため、最終的に研究遂行は不可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果は、超微量検体による24種類の脂肪酸精密同時測定方法の開発に留まることとなった。具体的には、10µL血漿に内部標準物質を加え、一旦真空下で乾固した後、tolueneに再溶解し、メチル化処理後、NICI-GCMS分析にかけられる方法で、最終測定まで3時間と、現実的な短時間での測定が可能である。脂肪酸量を相対比(%molあるいはwt%)のみで評価した場合、ある脂肪酸が数倍に増加すると、他の脂肪酸はたとえ量が増えても、相対比は低下するので、実際の動態を把握するのは困難である。したがって、全血漿をまとめて、遊離型およびエステル型脂質双方の、実際の濃度を定量することは大きな意味があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Long-chain unsaturated fatty acids are essential for infant growth and neurodevelopment, and their deficiency is not only closely associated with diseases such as neonatal chronic lung disease and retinopathy of prematurity, but also affects long-term neurodevelopmental outcomes. It is also the mother molecule of specialized pro-resolving lipid mediator. In terms of lipid transport to various organs and the brain, ester lipids in free form and in lipoproteins are important, and their total amounts in serum or plasma should be evaluated in absolute rather than ratio terms. In the present study, we planned to use the ultra-sensitive GCMS assay method to investigate the association with the development of neonatal chronic lung disease, but the GCMS failed to be repaired during the study, ultimately making it impossible to carry out the study.

研究分野：新生児慢性肺疾患

キーワード：血中脂肪酸分析 気管支肺異形成 早産低出生体重児

1. 研究開始当初の背景

長鎖不飽和脂肪酸 (Long-chain polyunsaturated fatty acid, LCPUFA)、中でも ω 6 系のアラキドン酸 (arachidonic acid, AA), C 20:4 と、 ω 3 系のドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA), C 22:5 は、乳児の発育や神経発達に必須であり、これらの欠乏は、新生児慢性肺疾患、未熟児網膜症、壊死性腸炎などの重篤な疾患と密接に関連するばかりでなく、長期的な神経発達予後にも影響することが知られている。さらに、最近では、LUPCFA の代謝産物の中に、lipoxin A4, resolvin E1, resolvin D1, protectin D1 などの、強力な炎症抑制作用を示す物質が含まれていることも明らかとなり、炎症収束性脂質メディエーターとして注目を集めている。

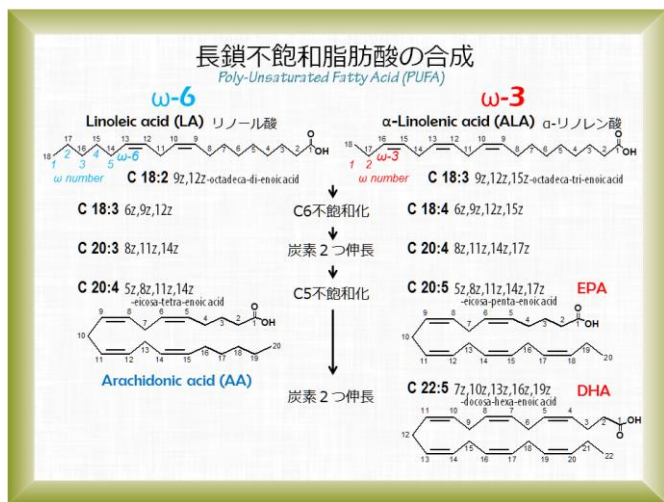
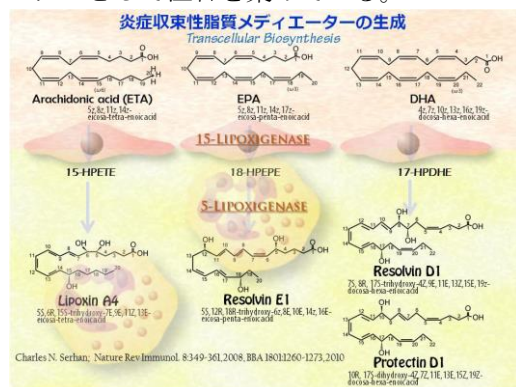
超早産低出生体重児、中でも、胎内発育不全を伴った子宮内発育不全児では、出生後の体重増加あるいは頭圍の catch up が、短期的にも長期的にも生命予後や神経発達等に極めて重要であり、従来の栄養法では十分な効果が得られないため、最近では超早期からの aggressive nutrition が栄養管理の主流となっている。しかしながら、栄養法の変化と血中脂質組成との関連についてはほとんど情報がない。

LCPUFA は、在胎 28 週以降に選択的に胎盤を通して児に輸送されるが、超早産児では元々この段階をスキップしているため、欠乏状態で生まれてくる。その上、 ω 6 系のリノール酸 (linoleic acid, C 18:2) や、 ω 3 系の α -リノレン酸 (α -linolenic acid, C 18:3) を元

に、AA や DHA 等を合成するための desaturase enzymes の活性も極めて低いため、これらの前駆物質を投与しても、有効に変換されないことも知られている。

ところで、新生児や早産児における、従来の血中脂肪酸組成に関する報告は、大半が、赤血球中あるいは血清中のリン脂質分画の分析であり、他には、赤血球を含む全血をまとめて分析した報告がある程度である。さらに、ほとんどがガスクロマトグラフィー (GC) を用いているため、総脂質当たりの比率でしか表示されない。しかしながら、各臓器や脳への脂質輸送という点から考えると、遊離型およびリポタンパク中のエステル型脂質が重要で、血清あるいは血漿中の総量をまとめて測るべきであり、また、総脂質当たりの比率よりも、絶対量とその体重比の方がより重要であると思われる。

筆頭研究者である荻原は、京都府立医科大学生命環境科学研究科の市原謙一教授の監修のもとで、ごく微量の血漿から GCMS を用いて、全血漿中の遊離型およびエステル型脂質を、極めて高感度に、しかも一斉に測定する方法を開発した。この方法では、10 μ L 以下の血漿を用いて、一回の測定で 30 種類以上の脂肪酸を、fmol レベルの感度で再現性良く測ることが可能である。



2. 研究の目的

今回の研究の目的は、超早産児で、経時的に血漿を集めて、脂肪酸組成の精密な測定を行い、新生児慢性肺疾患、未熟児網膜症、壊死性腸炎などの疾患や、発達予後との関連性を探ることであった。また、当研究室では、aggressive nutrition 導入以前の、超早産児の経時的な血漿サンプルを多数保有しているので、今後、新たなサンプルと比較すれば、現在の栄養法の改善点と共に課題も明らかになるとと思われる。こうした検討は現時点で報告はない。また、超微量の検体(10 μ L 程度)で十分なので、臨床的に必要な採血時に発生する僅かな余剰検体で十分であり、児への負担は一切ない。さらに、全血漿をまとめて、遊離型およびエステル型脂質の双方を定量した報告も未だ見当たらない。

臨床の現場で使用可能な脂肪製剤は、ダイズ油が主原料とし、脂肪酸組成は、 ω 3 系のリノール酸 (C 18:2) と、 ω 9 系のオレイン酸 (C 18:1) が大半を占めている。そのため、 ω 3 系の補充には役立たないし、記述の通りアラキドン酸の合成能も低いため、早期より脂肪酸製剤を補充しても

AA や DHA の上昇には結びつかないと思われるが、**aggressive nutrition** のもう一つの柱である早期母乳注入は、ある程度の効果は期待できるかもしれない。ただし、いずれにしても、おそらく絶対量は決定的に不足している可能性があり、また、重篤な疾患との関連性もおそらく見出せると考える。本研究によって、新たな栄養法や脂肪酸製剤の開発に結び付けば非常に有意義であろうと考えた。

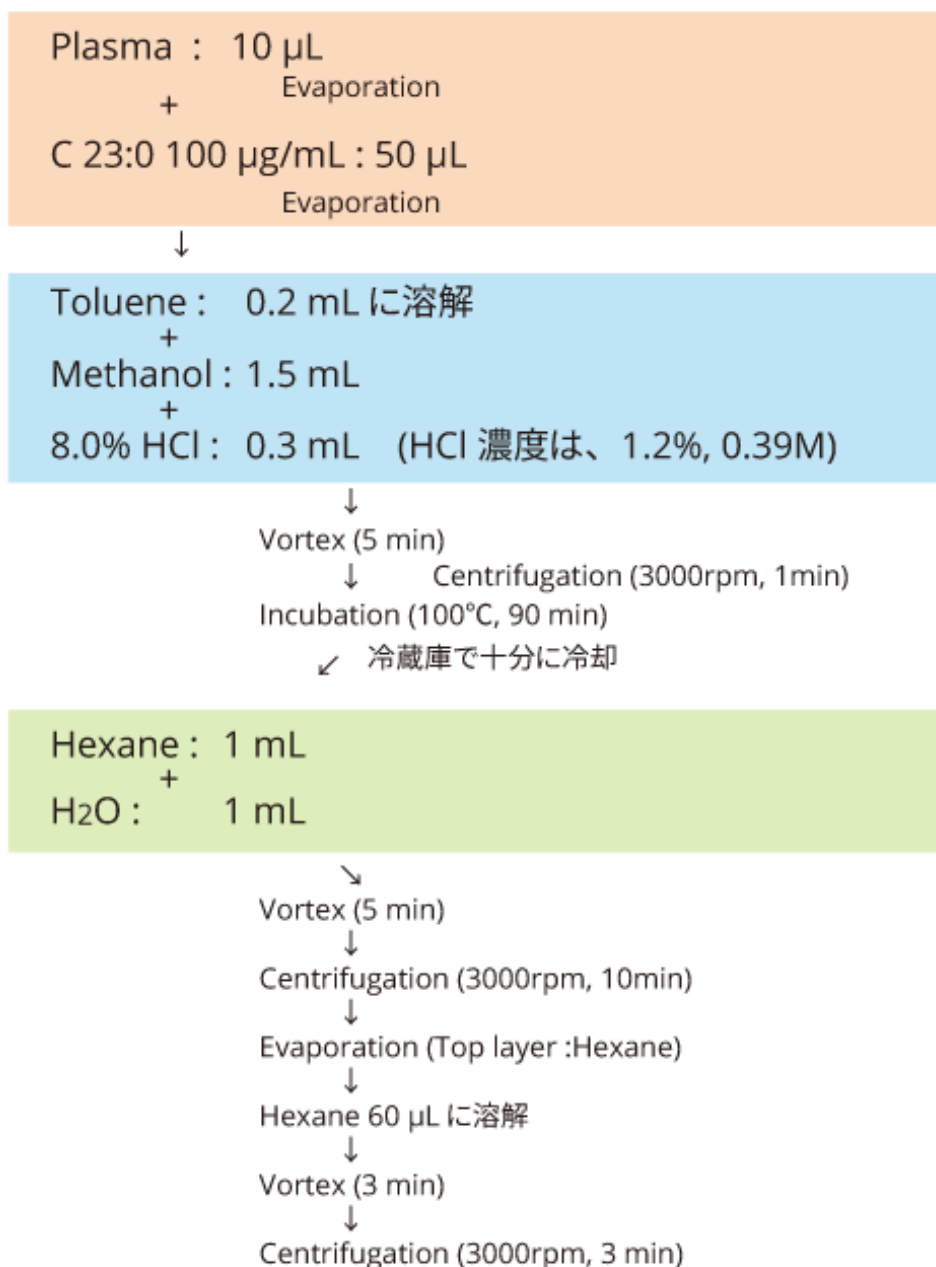
3. 研究の方法

方法の詳細は、次ページに図示する。

10 μ L 血漿に内部標準物質として、C23:0 を加え、一旦真空化で乾固した後、toluene に再溶解し、メチル化処理後、NICI-GCMS 分析にかける方法で、最終測定まで3時間と、現実的な短時間での測定が可能である。

今回の新法の最大の特徴は、必要検体量の少なさと、感度の高さである。再現率、回収率とも申し分なく、必要な時間も結果が出るまで3時間程度と現実的である。対象が超早産児であり、経時的な計画的検体採取は困難で、倫理的にも許されないため、临床上必要不可欠な血液検査時の余剰検体のみを用いることとした。臍帯血を含め、出生後の経時的な血漿サンプルを可能な限り集めて、以前の保有サンプルと比較検討する予定であった。

Plasma Fatty Acid Analysis - Protocol 2017



8.0% (w/v) HCl 作成 50 mL (10 mL)
35% HCl : 9.7 mL (1.94 mL) + Methanol : 41.5 mL (8.3 mL)
(85% (v/v) methanol and 15% (v/v) water)

60°C to 190°C at 10°C/min
190°C to 280°C at 5°C/min
Injector temperature 250°C
Ion source 250°C

4. 研究成果

市販の Standard mix と、それに含まれていない脂肪酸 standards を混合して standard とし、まずは retention time の検討を行った。新生児血中には、十分多い脂肪酸と、極めて微量な脂肪酸が、測定予定の脂肪酸の中でもそれぞれ 10 種類以上あり、同一の条件で一挙に測定するには無理があるので、多量群・少量群の 2 群に分け、それぞれの isotope Internal Standard を変えて、2 つの program を作成した。

次に、まずは spectrum data が豊富な EI mode での検出を試みた。成人 sample では支障はないが、新生児ではごく少量の脂肪酸の検出は困難であり、methane を使った NICI mode も試し、新たな program を作成した。

Term baby の予備測定では、良好な感度と再現性が得られ、実際の検体での測定が現在進行中である。抽出に要する時間は 80 分程度で、一時に多くの検体処理ができるため、大きな trouble

がなければ、予定検体数をこなすにはそれほどの時間は要しないと思われた。実際の新生児 sample でも、対象となる 24 種類のすべての脂肪酸で、再現率、回収率とも CV は 5% 以下で、測定を開始した。

しかしながら、最終的に、2021 年 1 月に発生した Shimadzu GC/MS QP5050ANC (1999 年製) の故障に関しては、修理部品保管期間を過ぎているため 2021 年 2 月 18 日に Shimadzu 社より修理不能という通達を受けた。その後、中古品の部品調達を各方面に当たったが、さすがに古すぎて、海外も含め現物は発見できなかった。代替案として、Shimadzu の依頼測定システムを利用して、検体の前処理をこちらで行った後、Shimadzu で測定を継続してもらうことも考えたが、一件当たり 5000 円なので、全部の検体を測定すると 300 万円以上と膨大な費用が掛かることが判明した。そこで、再度、別の中古品の購入を目指して業者を虱潰しに当たってみたが、最低でも 500 万以上の費用が掛かり、しかも保証も得られないので、最終的に研究続行は不可能と判断した。したがって、今回の成果は、超微量検体による 24 種類の脂肪酸精密同時測定方法の開発に留まることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 昌子 (Masako Yasui) (70550218)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関