

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第 11 号

令和8年3月

甲子園大学

氏名 (本籍)	ビスマ ライ Bhisma Rai (Dharan 20、ネパール)
学位の種類	博士 (栄養学)
学位記番号	博甲栄第 11 号
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
学位論文名	Development of methods to quantify secondary amino acids and iodine in complex matrices and their application to investigate effects of long-term excess iodine intake on major metabolism of mice (二級アミノ酸およびヨウ素定量法の開発とヨウ素過剰摂取がマウスの代謝に与える影響研究への応用)
論文審査委員	主査 教授 林 晃 之 副査 教授 高 橋 延 行 副査 特任教授 石 田 哲 夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

ヨウ素は甲状腺ホルモンの合成に不可欠な微量栄養素であり、その欠乏は子供においても成人においても重大な健康問題を引き起こす。ヨウ素のほとんどは海洋に貯蔵されており、ネパールのような海洋から離れた地域の土壌はヨウ素が乏しく、食品は十分な量のヨウ素を含んでいない。そのため、これらの地域では、ヨウ素欠乏症を予防するために、ヨウ素添加塩が用いられている。重要なことには、ヨウ素添加塩を不適切に使用すると、ヨウ素の過剰摂取を引き起こす可能性があることである。事実、ネパールでの最近の調査は、国民全体のレベルではヨウ素過剰摂取になっていることが判明した。しかし、慢性的なヨウ素過剰摂取がヒトの健康に及ぼす影響はよくわからないままになっている。さらに、最近の研究からヨウ化物イオンが唾液や胃液に能動的に分泌されていることなどが明らかになり、甲状腺ホルモンを介さないメカニズムでもヨウ素が生理的な役割を果たしていることが示唆されている。

したがって、慢性的なヨウ素過剰摂取がヒトの健康に及ぼす影響を研究することは非常に重要である。この研究を遂行するためには、以下の2つの方法がどうしても必要である。(1) 過剰ヨウ素によって甲状腺ホルモンの依存したあるいは依存しないメカニズムで引き起こされる代謝上の変化を定量する方法、(2) 食品・血清・尿などのヨウ素含

有量をオンサイトで測定する方法（個人のレベルでのヨウ素の摂取と排泄のバランスや体内動態を把握するため）。

二級アミノ酸であるプロリン (Pro)、*trans*-4-ヒドロキシプロリン (t-4-HP)、*cis*-4-ヒドロキシプロリン (c-4-HP) は、L-型か D-型のどちらかの鏡像異性体として自然界に存在する。L-プロリン (L-Pro) と *trans*-4-ヒドロキシ-L-プロリン (t-4-HP<sub>L</sub>) は、動物の体内に最も豊富に存在するタンパク質であるコラーゲンを構成するアミノ酸の約 20% を占める。結合組織が生理的・病的にターンオーバーする際に、コラーゲンはメタロプロテアーゼ・コラゲナーゼ・プロリダーゼにより分解され、遊離型の L-Pro と t-4-HP<sub>L</sub> が生成する。尿中ヒドロキシプロリンは、健康時や様々な病態でのコラーゲンの代謝回転を反映するバイオマーカーとして久しく研究されてきている。さらに、最近、腸内細菌で t-4-HP<sub>L</sub> を *cis*-4-ヒドロキシ-D-プロリン (c-4-HP<sub>D</sub>) を経由して代謝する経路や、クロストリディオイデス・ディフィシルが、宿主のコラーゲン分解を促進し、生成した t-4-HP<sub>L</sub> をまず L-Pro に変え、次に D-プロリン (D-Pro) とし、D-Pro 還元酵素（セレン酵素）が D-Pro のピロリジン環を解列する経路が発見されている。これらの最近の発見は、Pro、t-4-HP、c-4-HP の総量だけでなく、それぞれの D-型と L-型の鏡像異性体比 ( $m_D/L$ ) も測定しなければさまざまな共生微生物の影響下で起こる二級アミノ酸の複雑な代謝を解明できないことを示している。

本論文で、申請者は、L-Pro、D-Pro、t-4-HP<sub>L</sub>、t-4-HP<sub>D</sub>、c-4-HP<sub>L</sub>、c-4-HP<sub>D</sub> のすべての光学異性体を正確に測定する方法の開発に成功した。同位体希釈法を利用するために、<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ダブシルクロリド (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Dabs-Cl) を <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-アニリンから合成した。<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Dabs-Cl を用いて二級アミノ酸のそれぞれの <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ダブシル誘導体を合成し、内部標準として用いた。試料に含まれるさまざまな物質によるダブシルラベル反応に対するマトリックス効果を繰り返すために、標準添加法を用いた。ダブシル誘導体の光学分離は、キラルカラム (OJ-H、ダイセル (株)) を用いることでベースライン分離に成功した。試料由来のアミノ酸は市販のダブシルクロリド (<sup>12</sup>C<sub>6</sub>-Dabs-Cl) でラベルし、対応する <sup>12</sup>C<sub>6</sub>-ダブシルアミノ酸と <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ダブシルアミノ酸（内部標準）の量比は、キャピラリー-HPLC-エレクトロスプレーイオン化-質量分析 (LC-ESI-MS) で得られる質量差 6 ( $\Delta m/z = 6$ ) の一対のピークの強度比 ( $I_6/I_6$ ) として決定できた。直線性の高い検量線が得られ、Pro、t-4-HP、および c-4-HP の総量を高い精度と正確さで決定できるようになった。鏡像異性体比 ( $m_D/L$ ) も 0.001 から 200 までの広い範囲で決定できるようになった。今回開発した方法により、マウスの血清に t-4-HP<sub>D</sub> が 0.20  $\mu\text{mol/L}$  存在すること、アフリカマイマイ (*Achatina fulica*) のヘモリンフに D-Pro が 0.070  $\mu\text{mol/L}$  存在すること、白檀の木粉に L-Pro、D-Pro、t-4-HP<sub>L</sub>、t-4-HP<sub>D</sub>、c-4-HP<sub>L</sub>、c-4-HP<sub>D</sub> がすべて含まれることが明らかになった。通説と異なり、白檀の木粉に含まれる t-4-HP はほとんどが D-型であることが分かり、白檀にまだ知られていない代謝経路が存在することが強く示唆された。

次に、申請者は、さまざまな食品中のヨウ素を定量するために、Sandell-Kolthoff 法 (S-K 法) の改良と食品グループ（普通牛乳、新鮮な海藻、乾燥海藻、出汁など）ごとに最適なヨウ素の抽出法・前処理法を開発を行った。S-K 法は、集団レベルで尿中のヨウ素濃度を測定するときの標準法として国際的に普及している。しかし、食品には、尿には存在しないさまざまな S-K 法で利用する反応（硫酸酸性下での 3 価のヒ素イオンによる）を干渉する物質が高濃度で含まれている。したがって、尿の分析と同じ方法では信頼できるデータは得られず、実際、たとえば普通牛乳のヨウ素は測定できなかった。

過硫酸アンモニウム処理は、ホームセンターで入手できる安価な材料で自作したチューブホルダーを用い、0.5-mL ポリプロピレン製チューブを反応容器として 110°C で 1 時間行った。試料由来の物質による S-K 反応の干渉の有無を評価するために、標準添加法による検量線と蒸留水での検量線を同時に測定し、検量線の傾きを比較した。傾きが一致しない場合はヨウ素ゼロでの S-K 反応速度を蒸留水でのヨウ素ゼロでの S-K 反応速度と同じと仮定できないので、ヨウ素含有量の上限量の推測しかできない。これらの改良により、申請者はさまざまな食品中のヨウ素含有量を決定した。① 全国の各地からの普通牛乳 21 商品のヨウ素含有量は、130 µg/L から 349 µg/L の範囲に分布し、平均値は 220 µg/L であること、② 新鮮な生の海藻では、湿重量 100 g 当たり、ヒジキが 316 µg、あおさが 135 µg、ワカメが 42.6 µg、モズクが 22.5 µg のヨウ素をそれぞれ含んでいること、③ 乾燥海藻では、乾燥重量 100 g 当たり、刻み昆布が 210 mg、おぼろ昆布が 140 mg、ふりかけ昆布が 128 mg、ヒジキが 68.6 mg のヨウ素をそれぞれ含んでいること、が解明された。

さらに、申請者は、生涯にわたる過剰ヨウ素摂取のマウスモデルを作成するために、少数マウス (C57BL/6J) でのパイロット研究を行っている。近年、中国をはじめ多くの国で慢性的なヨウ素の過剰ヨウ素摂取が蔓延するようになり、その健康への影響や他の生活習慣病との相関が懸念されてきている。そのため、大規模なヒトでの横断的研究だけでなく、マウスモデルでの研究が活発に行われている。しかし、ほとんどのマウスモデルではヨウ素は飲水を通して投与されており、経口の場合は胃管を使って強制的に投与されている。ヨウ素添加塩で調理された食べ物の経口摂取というネパールの実態にあったモデルとするため、申請者は、粉末飼料用の特殊な餌箱を工夫し、摂食量を正確に把握することに成功している。また、個体ごとのヨウ素摂取量と尿への排泄量を定期的に調べるために、代謝ケージによる 24 時間尿の採取 (粉末飼料の混入のない) 方法の改善を行っている。本研究で開発したヨウ素測定法で、コントロールの餌 (CE-2) とヨウ素酸カリウム (KIO<sub>3</sub>) 添加 CE-2 (EI 飼料) がそれぞれ 1 g 当たり 0.8 µg と 16 µg のヨウ素を含有していることを確認し、1 日当たりの各マウスのヨウ素摂取量の把握に成功している。また、24 時間尿のヨウ素量の測定し、コントロール群では 1 日当たり 4.0 µg であるのに対し、EI 飼料群では 1 日当たり 46 µg であることを確認するなどヨウ素バランスの測定を目途をたてている。本研究で開発した方法で、24 時間尿中の Pro、t-4-HP、c-4-HP の測定も行っている。その他、尾静脈から定期的に 10 µL 程度の採血をできるだけストレスをかけずに行う手法の習得、甲状腺の摘出の困難さなど、今後解決すべき多くの課題も明らかにされ、パイロット研究として十分な目的を達成している。

## 参考文献

1. Bhisma Rai, and Tetsuo Ishida (2026) Quantification of L- and D-enantiomers of proline, *trans*-4-hydroxyproline, and *cis*-4-hydroxyproline in natural samples using differential labeling with <sup>12</sup>C- and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-dabsyl chloride, chiral separation, and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Biochem.* DOI 10.1093/jb/mvag020 (印刷中)

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、(1) 研究の背景と目的、(2) プロリンと 4-ヒドロキシプロリンの各構造異性体の定量法の開発、(3) Sandell-Kolthoff 法による食品中のヨウ素含有量の定量、(4) 慢性的な過剰ヨウ素摂取のマウスモデル作成のためのパイロット研究、以上の 4 章から構成されている。

申請者は、ネパールのトリブバン大学で行った修士論文 (“Dietary habits, nutritional status and comorbidities among the adults with hypothyroidism”) での研究から、① 1973 年のヨウ素添加塩導入から約 50 年となる現在のネパールではヨウ素欠乏からヨウ素過剰摂取に変化していること、② 成人の 30~40% に甲状腺異常が認められること (日本の約 3 倍の罹患率)、③ 甲状腺機能低下症の患者の約 70% に高血圧・糖尿病・脂質異常症などの合併症がみられることなどを明らかにし、慢性的なヨウ素過剰摂取がネパール人 (約 142 の民族からなる多民族国家) の健康にどのような影響を与えるのかの解明および個人レベルでのヨウ素摂取量の正確な評価を行うことが喫緊の課題であることを明確にした。そこで、申請者は、ネパールに帰国後に行う将来の研究プロジェクトに生かせることを条件とし、博士論文では上記の 3 つの研究テーマに取り組んだ。

プロリンと 4-ヒドロキシプロリンの各構造異性体の定量法の開発は、ヨウ素過剰摂取に伴う体内の代謝の変化の鋭敏なバイオマーカーになりうる可能性が高いと考え、行われた。結合組織は体内のいたるところに存在し、その主成分のひとつであるコラーゲンは体内でもっとも豊富に存在するタンパク質で、大量のプロリンと 4-ヒドロキシプロリンを含む。コラーゲンは常に分解と合成が行われており、分解過程で L-プロリンと *trans*-4-hydroxy-L-proline が遊離する。本論文では、正確な測定を実現するために標準添加法と同位体希釈法を適応している。そのために、二級アミノ酸を効率よくラベルするダブシルクロリドに着目し、その安定同位体として  $^{13}\text{C}_6$ -ダブシルクロリドを  $^{13}\text{C}_6$ -アニリンから合成し、それを用いてそれぞれの構造異性体の  $^{13}\text{C}_6$ -ダブシル誘導体を合成している。試料由来のアミノ酸は市販の  $^{12}\text{C}$ -ダブシルクロリドでラベルし、既知量の  $^{13}\text{C}_6$ -ダブシル誘導体を加えた後、固相法でクリーンアップし、キャピラリー液体クロマトグラフィーで分離後エレクトロスプレーイオン化し生成したプロトン負荷陽イオンを質量分析で分離している。申請者は、プロリン、*trans*-4-ヒドロキシプロリン、*cis*-4-ヒドロキシプロリンの各ダブシル誘導体の鏡像異性体の分離にも成功し、D-型異性体/L-型異性体のモル比を高感度で測定した。マウス血清に  $0.20\ \mu\text{mol/L}$  の *trans*-4-hydroxy-D-proline が存在すること、アフリカマイマイのヘモリンフに  $0.07\ \mu\text{mol/L}$  の D-プロリンが存在すること、白檀の木の粉末に含まれる *trans*-4-ヒドロキシプロリンは D-型異性体がほとんどであることなどをはじめ明らかにしている。

これらの成果の一部は、査読付き学術誌の The Journal of Biochemistry に受理され印刷中である (DOI 10.1093/jb/mvag020)。

Sandell-Kolthoff 法 (S-K 法) は、尿中ヨウ素濃度の測定に国際的に利用されており、その測定値は集団レベルでのヨウ素摂取の過不足の判定に使われる。S-K 法では硫酸酸性下での 3 価のヒ素イオンによる 4 価のセリウムイオンの 3 価のセリウムイオ

ンへの還元反応をヨウ素が触媒することを利用する。食品には S-K 反応を干渉するさまざまな物質が含まれており、尿サンプルの前処理と同じ処理（過硫酸アンモニウム処理）だけでは妨害を除去できないことが多い。本論文では、普通牛乳など食品グループごとにヨウ素抽出方法などを最適化し、標準添加法による検量線と蒸留水での検量線を同時に作成し、その勾配が一致することで食品成分による干渉がないことを確認する方法を開発している。普通牛乳、生の海藻、乾燥海藻、出汁などのヨウ素含有量の測定にはじめて成功している。

慢性的な過剰ヨウ素摂取のマウスモデル作成は、最近、中国の研究者を中心に、さまざまな実験モデルが報告されている。しかし、ヨウ素の投与が飲水によることがほとんどで、経口の場合はゾンデを使ったストレスの高い投与方法が用いられている。本論文のパイロット研究では、コントロール飼料にヨウ素をヨウ素酸カリウムとして添加した飼料（17 µg/g 飼料）を用い、特別な餌箱を工夫することで正確な飼料摂取量を把握することに成功し、ヨウ素酸カリウムを添加した食塩によるヨウ素摂取というネパールの現状に合ったモデルである。また、代謝ケージによる 24 時間尿の採取にも成功し、S-K 法によるヨウ素測定を行い、ヨウ素の摂取量と尿中への排泄量のバランス測定を行っている。24 時間尿中のプロリンや 4-ヒドロキシプロリンの定量にも成功している。

以上のように、本論文の研究内容は博士論文にふさわしい優れた内容である。実際、その一部は査読のある英文学術誌に発表されている。

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第11号

令和8年3月31日

発行 甲子園大学

編集 甲子園大学

〒665-0006 兵庫県宝塚市紅葉ガ丘10番1号

電話(0797)87-5111 (代表)