

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17795

研究課題名（和文）安定同位体ラベルを用いたエポキシ脂肪酸異性体の体内動態の解明

研究課題名（英文）The migration of dietary epoxy fatty acid isomers in the body

研究代表者

吉永 和明 (Yoshinaga, Kazuaki)

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：40724802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エポキシ脂肪酸の体内動態を評価した。最初に、食用油中の主要なエポキシ脂肪酸であるcis-9,10-epoxy-C18:0とtrans-9,10-epoxy-C18:0の安定同位体ラベル化合物を合成し、これらをマウスに投与後、各種質量分析計にて分析を行った。実験の結果、エポキシ脂肪酸（cis-9,10-epoxy-C18:0とtrans-9,10-epoxy-C18:0）は、オレイン酸と比べ臓器・組織に蓄積しにくいことが判明した。また、エポキシ脂肪酸は、オレイン酸よりも酸化されやすいことが明らかとなり、これらの理由から、エポキシ脂肪酸は体内に蓄積されにくいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、エポキシ脂肪酸の体内動態を明らかにすることができた。エポキシ脂肪酸は、植物油や油脂調理食品など様々な食品に含まれており、我々の食生活の身近に存在している。そのため、本研究によって得られたエポキシ脂肪酸の基礎的知見は、ヒトの安心・安全な食生活に大きく貢献する成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Epoxy fatty acids (EFAs) are stable final products of the decomposition of unsaturated fatty acid hydroperoxides, and have been reported to have toxic effects. However, the details of metabolism of the EFAs are unclear. In this study, we investigated the migration of dietary EFAs in mice. First, we synthesized stable isotope-labeled EFAs (cis-9,10-epoxy-C18:0 and trans-9,10-epoxy-C18:0). After oral administration of EFAs to mice, we analyzed the EFAs using mass spectrometry. As a result, the EFAs were less accumulated in tissues and organs than oleic acid. Furthermore, the EFAs were beta-oxidized faster than oleic acid. These results suggested that EFAs are more catabolized than unsaturated fatty acid.

研究分野：油化学

キーワード：エポキシ脂肪酸 安定同位体 オレイン酸 不飽和脂肪酸 酸化 体内動態 酸化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エポキシ脂肪酸は、不飽和脂肪酸の二重結合がエポキシ化された酸化生成物であり、植物油や油脂調理食品など様々な食品に含まれる。また、近年ではエポキシ化した大豆油 (ESBO) の優れた機能性 (熱・光安定性、低コストなど) が注目され、ESBO は食品包装用フィルムなどの塩素系ポリマーの安定剤として広く利用されている。その反面、食品加工や保存時に ESBO が食品へ溶出する可能性が、欧州食品安全機関 (EFSA) によって指摘されている。一般に、エポキシ構造を持つ化合物は、DNA やタンパク質などの生体分子との反応性が高いことから、エポキシ脂肪酸が生体に及ぼす影響 (遺伝毒性や細胞障害など) が懸念されている。

また、エポキシ脂肪酸には構造の異なる様々な異性体が存在する。例えば、食品中の主要なエポキシ脂肪酸は、エポキシステアリン酸 (epoxy-C18:0) であり、その構造は、図 1 に示すように 2 種の異性体 (*cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0) から構成される。しかしながら、食用油脂中のエポキシ脂肪酸異性体が、どのような脂肪酸から生成しているのか、そして、食事から摂取されたエポキシ脂肪酸異性体が、どのように各種臓器・組織へ移行し、代謝されていくのかというエポキシ脂肪酸の体内動態に関する基礎的な知見は存在せず、どのエポキシ脂肪酸異性体が生体に悪影響を及ぼすのかについては明らかになっていない。

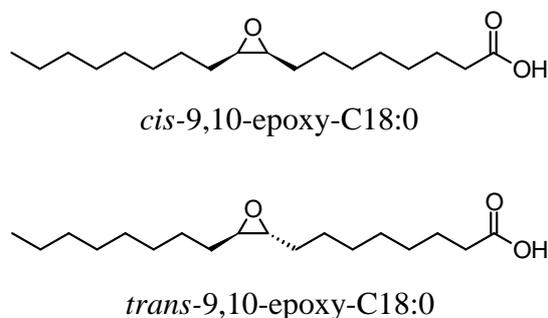


図 1 エポキシ脂肪酸の構造

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)食品におけるエポキシ脂肪酸異性体の生成経路と、(2)食品に含まれる主要なエポキシ脂肪酸異性体がヒトに及ぼす影響を明らかにすることを目的に研究を実施した。これまで、エポキシ脂肪酸の生成量を精査した先行研究では、天然油脂を加熱した際に生成するエポキシ脂肪酸を精査していた。しかしながら、天然油脂は様々な脂肪酸を含む混合系のため、どの脂肪酸からどのような構造のエポキシ脂肪酸が生成するのか評価することは困難である。

そこで実験①では、食用油脂に豊富に含まれるオレイン酸とリノール酸に着目し、オレイン酸から構成されるトリグリセリド (トリオレイン, OOO) とリノール酸から構成されるトリグリセリド (トリリノール, LLL) を有機合成し、それらの加熱試験を実施することで、オレイン酸およびリノール酸から生成するエポキシ脂肪酸異性体を評価した。また、抗酸化剤の添加によるエポキシ脂肪酸の生成抑制効果を評価した。

実験②では、食用油脂の主要なエポキシ脂肪酸である *cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0 を摂取した際の体内動態を評価するため、上記のエポキシ脂肪酸異性体 2 種を安定同位体にてラベル化を行い、これをマウスに投与し、各種質量分析計を用いて、マウス体内におけるエポキシ脂肪酸異性体の動態を精査した。

3. 研究の方法

(1) トリグリセリド標準品を用いたエポキシ脂肪酸の生成挙動の評価

トリグリセリド標準品として、OOO と LLL を有機合成した。この標準品に α -トコフェロール (AT) を 0.1% 添加したものと無添加のものを調製した。4 種の標準品 (OOO、OOO+AT、LLL、LLL+AT) をそれぞれ 180°C にて加熱し、時間ごとにサンプリングを行った。試料は、CH₃ONa/メタノールにて誘導体化を行い、固相抽出にてエポキシ脂肪酸メチルエステル画分を回収した。その後、GC/MS にて測定を行い、試料中のエポキシ脂肪酸異性体含有量を定量した。

(2) エポキシ脂肪酸の体内動態の評価

重水素 2 分子でラベル化を行った 2,2-D₂-オレイン酸 (C18:1; コントロール)、2,2-D₂-*cis*-9,10-epoxy-C18:0、2,2-D₂-*trans*-9,10-epoxy-C18:0 の 3 種の脂肪酸エチルエステルを合成した (図 2)。ICR マウス (4 週齢・雄) を 3 群に分け、ゾンデを用いて試料乳剤を 3 日間または 5 日間経口投与した。各脂肪酸の一日あたりの投与量は、120 μ mol/20 g マウス体重とした。その後、マウスを安楽死させ、血漿、肝臓、副睾丸脂肪組織を採取した。臓器・組織から Folch 法を用いて脂質抽出後、CH₃ONa/メタノールにて誘導体化を行った。その後、GC/MS にて測定を行い、臓器・組織中のエポキシ脂肪酸異性体含有量を定量した。

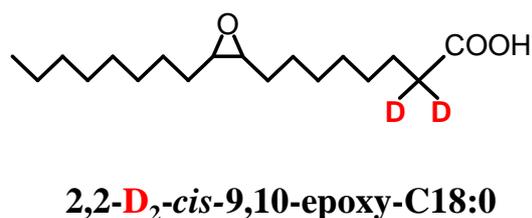


図 2 実験に使用した安定同位体ラベル化エポキシ脂肪酸の構造

4. 研究成果

(1) トリグリセリド標準品を用いたエポキシ脂肪酸の生成挙動の評価

図3に、トリグリセリドの180℃加熱試験の結果を示した。OOOからは、*trans*-9,10-epoxy-C18:0と*cis*-9,10-epoxy-C18:0の2種のエポキシ脂肪酸が生成した。また、LLLからは、*trans*-9,10-epoxy-*trans*-12-C18:1、*trans*-12,13-epoxy-*trans*-9-C18:1、*trans*-9,10-epoxy-*cis*-12-C18:1、*trans*-12,13-epoxy-*cis*-9-C18:1、*cis*-9,10-epoxy-*cis*-12-C18:1、*cis*-12,13-epoxy-*cis*-9-C18:1の6種のエポキシ脂肪酸が生成した。以上より、オレイン酸からはepoxy-C18:0のエポキシ脂肪酸が生成し、リノール酸からはepoxy-C18:1のエポキシ脂肪酸が生成することが判明した。

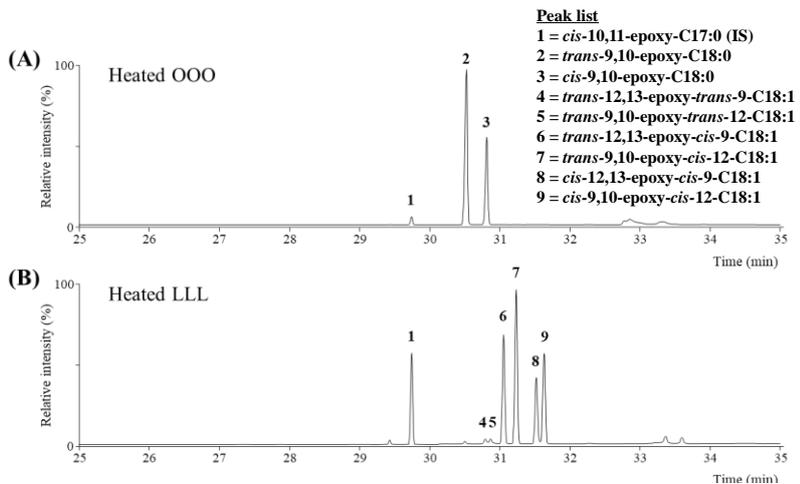


図3 加熱したOOOとLLLのクロマトグラム

図4に、抗酸化剤によるエポキシ脂肪酸生成量への影響を精査した結果を示した。OOO+ATでは、加熱1時間、3時間におけるエポキシ脂肪酸生成量がOOOよりも低い値となった。同様に、LLL+ATでは、加熱1時間におけるエポキシ脂肪酸生成量がLLLよりも低い値となった。以上より、エポキシ脂肪酸生成量は、抗酸化剤の添加によって抑制できることが示唆された。

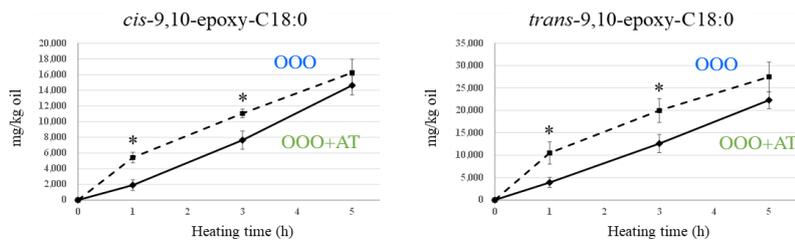


図4 OOO加熱時に生成するエポキシ脂肪酸量

本研究の結果より、油脂加熱時に生じるエポキシ脂肪酸の生成経路を図5のように推定した。一般的な脂質のラジカル酸化によって生成するエポキシ脂肪酸は、二重結合位置の転位が生じると考えられる(図5下の経路)。しかしながら、本実験で確認されたエポキシ脂肪酸は、元の不飽和脂肪酸の二重結合がエポキシ基に変換されたもののみであり、二重結合位置またはエポキシ基の転位は認められなかった。そのため、エポキシ脂肪酸の生成経路は、油脂加熱時に生成するペルオキシラジカルが不飽和脂肪酸の二重結合位置に付加した後、アルコキシラジカルが外れることでエポキシ脂肪酸が生成する経路(図5上の経路)と示唆された。

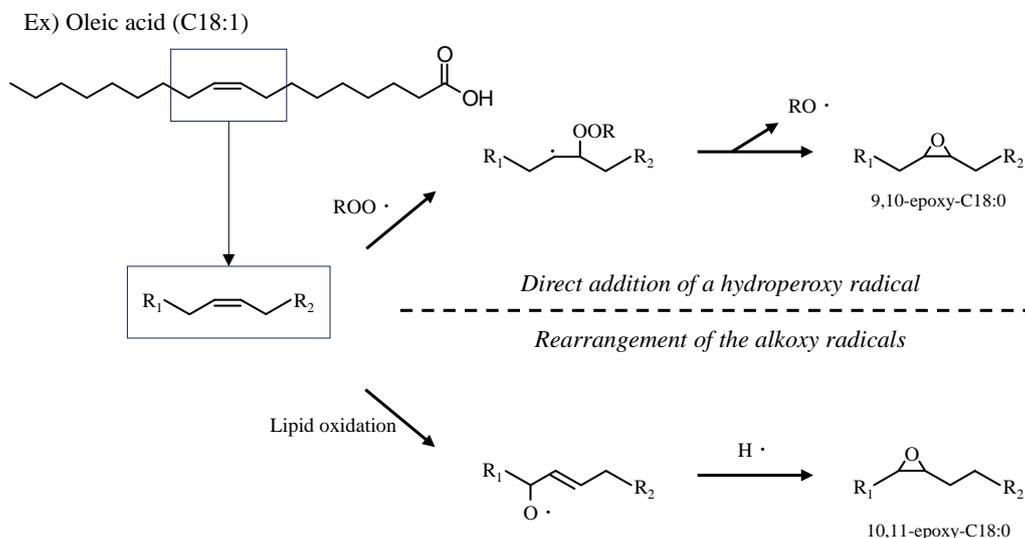


図5 本研究で推定されたエポキシ脂肪酸の生成経路

(2) エポキシ脂肪酸の体内動態の評価

安定同位体ラベル化 C18:1 (コントロール)、*cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0 のエチルエステルをマウスに強制経口投与し、臓器・組織中の安定同位体ラベル化物の量を測定した。図 6 に各投与群における (A) 血漿、(B) 肝臓、(C) 副睪丸脂肪組織における安定同位体ラベル化物の経時変化を示した。図 6 より、C18:1 は、いずれの臓器・組織においても有意に高い値を示したのに対し、*cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0 は低い値を示した。また、エポキシ脂肪酸は *cis* 型、*trans* 型に関わらず、不飽和脂肪酸よりも蓄積しにくいことが示唆された。さらに、*cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0、C18:1 の β 酸化のされやすさを比較した結果 (図 6D)、*cis*-9,10-epoxy-C18:0、*trans*-9,10-epoxy-C18:0 は、C18:1 と比較して β 酸化されやすいことが確認された。以上の結果より、エポキシ脂肪酸はオレイン酸よりも β 酸化されやすく、体内に蓄積されにくいことが示唆された。

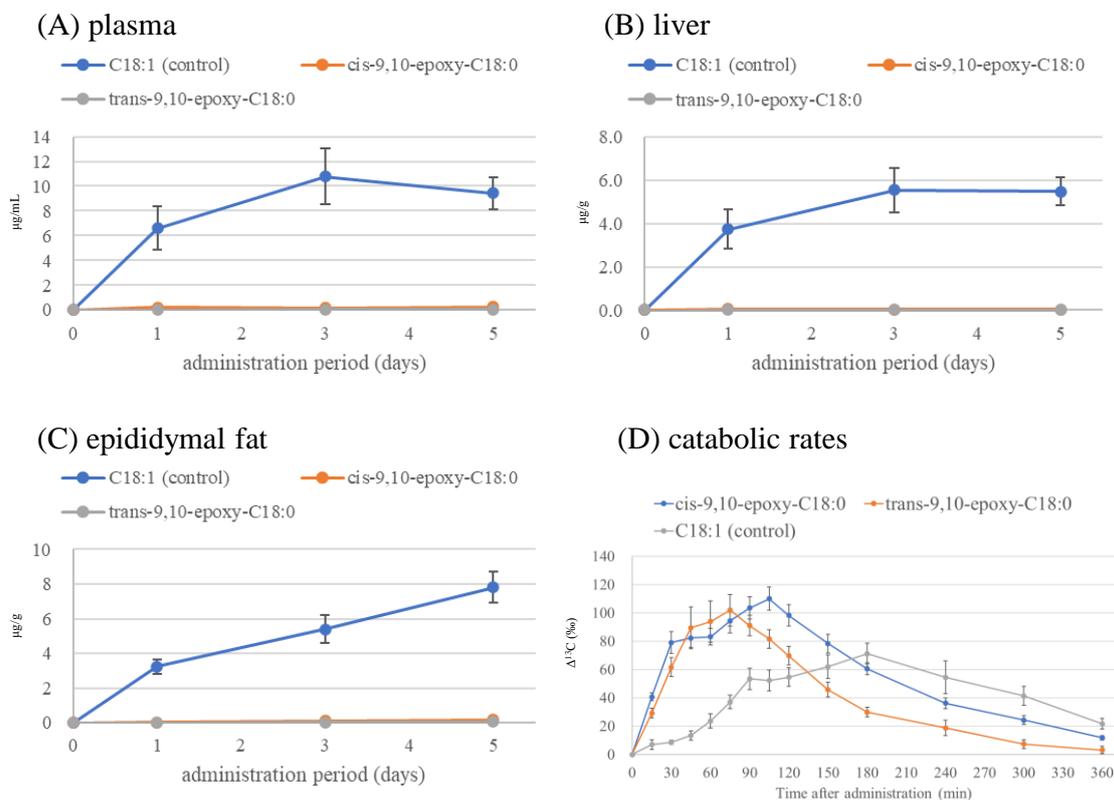


図 6 (A) 血漿、(B) 肝臓、(C) 副睪丸脂肪における安定同位体ラベル化脂肪酸量、(D) エポキシ脂肪酸の呼気試験結果

本研究結果により、食用油脂におけるエポキシ脂肪酸の生成経路、ならびにエポキシ脂肪酸の体内における蓄積性を評価することができた。

エポキシ脂肪酸は、植物油や油脂調理食品など様々な食品に含まれており、我々の食生活の身近に存在している。そのため、本研究によって得られたエポキシ脂肪酸の基礎的知見は、ヒトの安心・安全な食生活に大きく貢献する成果といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuya Nishimura, Xiannan Huang, Aya Yoshinaga-Kiriake, Yuna Yahata, Seiya Tanaka, Naohiro Gotoh, Kazuaki Yoshinaga	4. 巻 73
2. 論文標題 Formation of Epoxy Fatty Acids in Triacylglycerol Standards during Heating	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 637-644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess23200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉永和明
2. 発表標題 安定同位体を用いた脂肪酸の体内動態評価
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉永和明, 西村和也, 黄顕南, 八幡 佑奈, 田中誠也, 後藤直宏
2. 発表標題 トリグリセリド標準品を用いたエポキシ脂肪酸の生成挙動の評価
3. 学会等名 第61回日本油化学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉永和明
2. 発表標題 食用油脂の酸化生成物であるエポキシ脂肪酸の吸収・動態解析
3. 学会等名 第61回日本油化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉永和明
2. 発表標題 脂質の有機合成法開発と分析手法構築に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第158回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------