

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500964

研究課題名(和文)トランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステルの網羅的リスク評価法の確立

研究課題名(英文)Exhaustive risk evaluation of trans-fatty acid and glycidol fatty acid ester

研究代表者

増田 修一 (Masuda, Shuichi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40336657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：食用油中のトランス脂肪酸(TFA)を測定したところ、0.3～1.93g/100gの範囲であったが、加熱すると減少した。食用油中のGE量を測定したところ、いずれの食用油中にも検出されたが、加熱すると減少した。また、GEの遺伝毒性を調べたところ、エームス試験、コメットアッセイ、小核試験で有意な毒性が確認できた。さらに炭直火で加熱調理した豚挽肉パテ中のGEs量を測定したところ、多くのGEが生成した(195g/100g)。以上の結果より我々は日常的に生体に影響を及ぼすTFA及びGEを摂取していることが明らかになった。今後もさらに、これら化学物質のヒトに対するリスク評価を行うことは重要である。

研究成果の概要(英文)：Trans-fatty acid (TFA) was detected in some dietary oils (0.3-1.93g/100g). However, the concentration of TFA was decreased by heating. Though glycidol fatty acid ester (GE) was determined in oils, the level of GE was also decreased by heating. Treatment of GE showed the significantly genotoxicities (reverse mutation, DNA damages and the frequency of micronuclei) in Ames test (TA100), COMET assay and micronuclei test compared to non-treated groups. The concentration of GE in comminuted pig meat heated with charcoal fire was very high (195g/100g meat). From these results, it is demonstrated that we are habitually exposed to TFA and GE that have an influence on the health of human from daily foods. It is important to estimate the risk of these chemicals to human.

研究分野：食品衛生学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：トランス脂肪酸 グリシドール脂肪酸エステル 遺伝毒性

### 1. 研究開始当初の背景

我々の生活環境中には多種多様な化学物質が存在しており、これら化学物質の中には変異・発がん性、生活習慣病の発症、アレルギーの発症等、ヒトに対して悪影響を及ぼす物質が存在している。これら化学物質のヒトへの主な摂取経路として、食品を介しての経路がある。したがって、食品中のこれら化学物質の含量、生成経路、摂取後の吸収・代謝・排泄、生体影響等を明らかにすることは、ヒトが健康な生活を送る上で極めて重要である。

### 2. 研究の目的

現在、特に食用油等の食品に含まれるトランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステルが大きな社会問題となっている。トランス脂肪酸はマーガリン、ショートニングなどの硬化油に含まれている。これら硬化油の製造工程で不飽和脂肪酸から飽和脂肪酸を生成させるために水素化を行うが、その際シス型の脂肪酸がトランス脂肪酸に変化すると報告されている(Skeaff C.M. et al. 2006)。トランス脂肪酸は硬化油中に数%~10 数%含まれており、さらに牛やヤギ等の反芻動物体内の微生物によっても産生されることから、反芻動物の肉や乳中にも約 2~5%含まれている。このトランス脂肪酸の摂取により、心臓疾患リスクの増加との関連性が指摘されており、疫学的調査ではトランス脂肪酸の摂取により動脈硬化や心臓疾患リスクが高まり、その要因としてリポ蛋白の増加が示唆されている(Bassett C.M. et al., 2008)。また中年~老年の健康な女性を対象とした調査では、トランス脂肪酸摂取量が多い群では炎症マーカーである CRP 等炎症因子や細胞接着分子が高くなっており、動脈硬化症の原因となる動脈内皮での炎症誘発が危惧されている(Harvey K.A. et al., 2008)。また、これら炎症因子によりアトピーなどのアレルギーが発症すると考えられている(Lipozencic J. et al., 2009)。日本では、アメリカ等の諸外国に比べ、日常の食生活でのトランス脂肪酸の摂取量は少ないが、現在の食の嗜好性の多様化から、平均的な食生活を営んでいないヒトが多く、高濃度のトランス脂肪酸を摂取することも考えられる。

また、最近、食用油の一種であるジアシルグリセロール油中に含有しているグリシドール脂肪酸エステルのヒトへの健康影響も大きな問題となっている。ジアシルグリセロールは通常の食用油に比べて脂肪酸が1つ少なく、体内において脂肪吸収がされにくいことから、ジアシルグリセロールを用いたダイエット用食物油が市販された。しかし、ジアシルグリセロールの製造工程において、副生成物としてグリシドール脂肪酸エステルが生成することが明らかになった(Masukawa Y. et al., 2010)。また、グリシドール脂肪酸エステルはコメ油やコーン油にも含有していることが報告されている。このグリシドール

脂肪酸エステルは構造内にグリシドール骨格を持ち、グリシドールは国際がん研究機関(IARC)によって、「ヒトに対して発がん危険性あり(2A)」に分類されていることから(National Toxicology Program, 2007)、ヒトがグリシドール脂肪酸エステルを摂取した場合、生体内においてグリシドールが遊離し、発がん性が誘導されると考えられている。以上のことより、食品中のトランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステルのヒトへのリスク評価を行う上で、両物質の調理過程での生成や分解、ヒト生体内における吸収・代謝・排泄等の挙動、また毒性発現メカニズムや他の疾病発症との関連を調べることは極めて重要である。さらに、実際にトランス脂肪酸やグリシドール脂肪酸エステルを摂取した場合、これら化学物質の誘導する毒性や疾病を抑制することも必要である。

本研究では(1)トランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステルが通常の調理過程において分解または生成するのか、(2)これらの物質について、各種遺伝毒性試験を用いて毒性発現メカニズムの解明をする。

### 3. 研究の方法

(1)市販の9種類の食用油(サラダ油、キャノーラ油、べに花油、調合油、大豆油、オリーブ油、米油、コーン油、綿実油)及び DAG 油中のトランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステル含有量を測定した。また、通常の調理温度(180 )で、これら食用油を加熱処理し、含有しているトランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステル量を測定した。トランス脂肪酸測定法: 試料を試験管に分取し、内部標準物質(トリフェニルエチレン)を添加し、0.5mol/l 水酸化ナトリウム/メタノール溶液を加えて、100 で加熱した。三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液を加えて 100 で加熱し、冷却後、ヘキサン、飽和食塩水を加えて振とうした後、遠心分離を行い、ヘキサン層を採取して、GC-FID によりトランス脂肪酸量を測定した。グリシドール脂肪酸エステル測定法: 試料を遠心管に採取し、アセトニトリルを加えて遠心分離を行った。ODS カートリッジカラムに上清を負荷後、アセトニトリルで溶出した。溶出液を濃縮後、残渣にクロロホルムを加えて溶解し、シリカゲルカートリッジカラムに負荷後、クロロホルムで溶出した。窒素ガスで溶媒を除去し、残渣にメタノール/2-プロパノール混合溶液(1:1)を加えて試料とし、LC/MS/MS によりグリシドール脂肪酸エステル量を測定した。

(2)グリシドール脂肪酸エステル及びグリシドールの変異原性を TA98 及び TA100 を用いるエームス試験で調べた。また、両物質を ICR マウス(6週齢・ )に解剖 24 及び 3 時間前の 2 回経口投与(各 2.7 mmol/kg.b.w.)し、血液、骨髓細胞、肝臓、腎臓、脳を採取した。各臓器における DNA 損傷性はコメットアッセ

イを用いて、骨髄細胞における染色体異常誘発性は小核試験を用いて調べた。

(3) 豚挽肉 100 g を用いて、直径 100×厚さ 15 mm の大きさのパテ様肉を作製し、ガス加熱（フライパン調理）や炭直火加熱（BBQ 調理）で加熱後、粉碎した。粉碎した加熱処理肉を凍結乾燥し、乾燥物約 10 g をソックスレー抽出器を用いて、エーテルで抽出した。抽出液を減圧濃縮して測定用試料とし、試料を逆相固相抽出カートリッジ（Sep-Pak Vac RC C18 cartridge）及び順相固相抽出カートリッジ（Sep-Pak Vac RC Silica cartridge）を用いて前処理を行った後、メタノール/2-プロパノール（1:1）に溶解して分析用試料とし、LC/MS/MS を用いて。なお、測定対象グリシドール脂肪酸エステルとして、テアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸グリシジルの各グリシドール脂肪酸エステル s 量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 9 種類の食用油（サラダ油、キャノーラ油、ペに花油、調合油、大豆油、オリーブ油、米油、コーン油、綿実油）および販売中止された DAG 油中のトランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステル含量を測定するとともに、通常の調理温度（180℃）で加熱処理した場合におけるこれら食用油中の両物質の変動を調べた。各食用油に含まれるトランス脂肪酸の総含有量を測定したところ一日摂取エネルギー換算でいずれも世界保健機関（WHO）の定めた基準の 1%以下であった。各食用油（DAG 油以外）を 180℃、2 時間及び 10 時間で加熱処理したところ、トランス脂肪酸の総量は減少する傾向が見られた。また、代表的なトランス型脂肪酸であるリノール酸のトランス異性体とリノレン酸のトランス異性体の含量も加熱処理により減少する傾向がみられた。DAG 油においては加熱処理により、トランス脂肪酸の含量が微量に増加する傾向がみられた。市販の各種食用油中のグリシドール脂肪酸エステル含量が測定したところ DAG 油に特に多く含まれていることを確認した。また DAG 油以外の食用油においてもグリシドール脂肪酸エステル含量が微量に検出された。グリシドール脂肪酸エステルを多く含む DAG 油を 180℃で、2、4 及び 10 時間加熱処理したところ、グリシドール脂肪酸エステル量が減少する傾向を示した。DAG 油以外の食用油を 2 時間加熱処理したところの変化は、2 時間を加熱したところ、米油、コーン油、綿実油においてグリシドール脂肪酸エステル量は減少する傾向を示した。

以上の結果より、我々が日常的に調理に使用している食用油には、トランス脂肪酸、グリシドール脂肪酸エステルが含有されていることが明らかになった。

(2) TA98 株と TA100 を用いてグリシドール及びグリシドールリノール酸エステルの変異

原性を調べた。TA98 株の - S9 mix において、グリシドール脂肪酸エステルは対照群の復帰コロニー数の 2 倍を下回ることから、変異原性を陰性と判定した。グリシドールにおいても、対照群の 2 倍のコロニー数に及ばなかったが、変異原性が增强する傾向がみられた。+ S9 mix においてはいずれも変異原性が認められなかった。TA100 株においてグリシドール脂肪酸エステル及びグリシドールは変異原性を示し、+ S9 mix においては、復帰コロニー数は対照群と比較してグリシドールエステルでは約 5 倍、グリシドールでは約 8 倍増加した。また、- S9 mix においてはグリシドールが最も高い変異原性を示し、対照群の約 12 倍であった。

グリシドール及びグリシドールリノール酸エステルを経口投与したマウス肝臓、腎臓、脳、血液における DNA 損傷性を調べた。グリシドール投与における各臓器の Tail moment をみたところ、いずれの臓器においても DNA 損傷は control 群に比べて有意に上昇した。特に肝臓において強い DNA 損傷性が確認できた（ $5.83 \pm 0.21$ ）。グリシドールリノール酸エステル投与における DNA 損傷性は、いずれの臓器においても control 群に比べて有意に上昇した。特にグリシドールと同様に肝臓において強い DNA 損傷性が確認できた（ $3.99 \pm 0.17$ ）。同モル量で投与したグリシドールとグリシドールリノール酸エステルの DNA 損傷性を比較したところ、いずれの臓器においてもグリシドールが強い DNA 損傷性を示した。

グリシドールリノール酸エステルおよびグリシドールの骨髄における小核誘発頻度を Fig.14 に示した。グリシドール投与群の小核誘発頻度は、コントロール群（ $2.12 \pm 0.30$ ）に比べて、有意に上昇した（ $6.43 \pm 0.43$ ）。また、グリシドールリノール投与群の小核誘発頻度は Control 群に比べて有意な上昇は認められなかったが、上昇する傾向がみられた（ $3.37 \pm 0.53$ ）。

(3) フライパンを用いたガス加熱調理、バーベキューで調理を用いる炭直火調理で加熱調理をした DAG 油中の各グリシドール脂肪酸エステル量を LC/MS/MS を用いて測定した。未加熱の DAG 油（コントロール）におけるクロマトグラムでは、大きなオレイン酸グリシジルとリノール酸グリシジルのピークが確認できた。ガス加熱を 15 分間行った際の DAG 油のクロマトグラムでは、コントロールに比べ小さなリノール酸グリシジルとオレイン酸グリシジルのピークが確認できた。炭直火加熱 5 分間（アルミトレー予熱なし）を行った際の DAG 油のクロマトグラムでは、コントロールに比べては小さいピークを確認したが、ガス加熱を 15 分間行った際の DAG 油のクロマトグラムに比べ大きなピークがみられた。フライパンを用いたガス加熱調理した DAG 油中のグリシドール脂肪酸エステル合計量と各

グリシドール脂肪酸エステル量、また、加熱中における DAG 油の最高温度との関係を調べた。加熱未処理では、グリシドール脂肪酸エステルは 170 ppm であった。また、DAG 油を 1, 3, 5, 7, 10, 15 分でガス加熱調理処理、また炭直火加熱(アルミトレ予熱なし及びあり)で加熱したところ、ガス加熱調理時間が長い程、DAG 油中のグリシドール脂肪酸エステル量が減少する傾向を示した。特に、オレイン酸グリシジルとリノール酸グリシジルで著しい減少が見られた。また、5 分間の炭直火加熱処理では、同 5 分間のガス加熱処理に比べて、グリシドール脂肪酸エステル量は減少した。フライパンを用いたガス加熱調理、バーベキュー調理を用いた炭直火調理及び電子レンジ加熱を用いて各種条件下で加熱調理した豚挽肉パテ中の各グリシドール脂肪酸エステルを測定した。なお、未加熱の豚挽肉パテ(コントロール)はグリシドール脂肪酸エステル量が 0 µg であった。フライパンを用いたガス加熱調理をした豚挽肉パテ中の各グリシドール脂肪酸エステル量を LC/MS/MS を用いて測定した。フライパンに残った油を回収したところ、加熱時間が長いほど、豚挽肉パテからフライパンに流出する油の量が増えたことが確認できた。また、豚挽肉パテは、弱火調理 20 分間また強火調理 10 分間では、一般的に食すには不十分な見た目、硬さであった。弱火 20 分間加熱では各グリシドール脂肪酸エステルのピークが顕著に確認できなかったが、強火 10 分間加熱では、パルミチン酸グリシジル、ステアリン酸グリシジル、オレイン酸グリシジルのピークが標準物質(0.01 ppm)と同等以上で検出された。弱火(150 )及び強火(250 )の各グリシドール脂肪酸エステル量を調べたところ、いずれの加熱条件においても、グリシドール脂肪酸エステルが生成することを確認し、加熱時間が長いほどグリシドール脂肪酸エステル量が多く生成される傾向が見られた。特に、強火 10 分間加熱で最も多くのグリシドール脂肪酸エステルを生成していた。また脂肪酸別にみると、オレイン酸グリシジル、パルミチン酸グリシジル、ステアリン酸グリシジルの順に多く含有していることを確認した。バーベキュー調理に用いた炭直火調理で加熱処理された豚挽肉パテ中のグリシドール脂肪酸エステル量を LC/MS/MS を用いて測定したところ、グリシドール脂肪酸エステルが生成することを確認し、網の上に直に豚挽肉パテを置いて加熱した方がグリシドール脂肪酸エステル量が多く生成されることを確認した。また各脂肪酸別にみると、オレイン酸グリシジル、パルミチン酸グリシジル、ステアリン酸グリシジルの順に加熱調理後の豚挽肉パテに多く存在していた。電子レンジを用いて加熱調理された豚挽肉パテ中のグリシド

ール脂肪酸エステル量を LC/MS/MS を用いて測定したところ、1, 3, 5 分間豚挽肉パテを加熱調理したところ、いずれの加熱条件下においても、グリシドール脂肪酸エステルが生成することを確認し、加熱時間が長くなるほど、グリシドール脂肪酸エステル量が減少していることが確認できた。また脂肪酸別にみると、パルミチン酸グリシジルを除き、グリシドール脂肪酸エステル量の変動と同様に減少傾向が見られた。ガス、炭直火及び電子レンジを用いて加熱調理された豚挽肉パテ中の脂肪酸エステル量を GC-FID を用いて測定し、脂肪酸含有量を測定した。コントロールとして、生豚挽肉を使用した。いずれの加熱条件下においても、コントロールより脂肪酸メチル量が減少することを確認し、ガス加熱調理で脂肪酸量の減少が見られた。また各脂肪酸メチル別にみると、オレイン酸メチル、パルミチン酸メチル、ステアリン酸メチルの順に加熱調理後の豚挽肉パテに多く存在していた。

以上の結果をまとめると、市販の食用油中にはトランス脂肪酸、グリシドール脂肪酸エステルが含有されていることが明らかになった。また、通常の調理過程では、トランス脂肪酸及びグリシドール脂肪酸エステルは分解や構造の変化等を受けて、減少する傾向を示した。グリシドール脂肪酸エステル及びその分解物であるグリシドールは遺伝毒性を示すことが明らかになった。DAG 油をガスまたは炭直火加熱処理したところ、加熱時間が長いほどグリシドール脂肪酸エステル量は減少した。豚挽肉パテを、ガス、炭直火及び電子レンジにより加熱処理を行ったところ、全ての加熱調理方法でグリシドール脂肪酸エステルが生成され、特に炭直火加熱で多くのグリシドール脂肪酸エステルが生成された。また、また、ガス加熱においては加熱時間が長くなるほどグリシドール脂肪酸エステル量が増加傾向にあった。一方、電子レンジ加熱では、加熱時間が長くなるほど、グリシドール脂肪酸エステル量が減少していた。したがって、より長時間高温で加熱することにより、グリシドール脂肪酸エステルが生成することが示唆された。

これらの結果より、我々は日常的にトランス脂肪酸やグリシドール脂肪酸エステルなどの生体に対して影響を及ぼす化学物質を日常的に摂取・暴露していることが明らかになった。今後は、さらにこれら化学物質の暴露量や摂取源を解明し、ヒトに対するリスク評価を行うことが重要である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Koyama N, Yasui M, Oda Y, Suzuki S, Satoh T, Suzuki T, Matsuda T, Masuda S, Kinai N, Honma M. : Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems., *Environ Mol Mutagen.*, 52(1),11-19 (2011)

Koyama N, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinai N, Matsuda T, Imai T, Honma M. : Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis.*, 26(4),545-549 (2011)

Masuda S, Shimamura Y, Kato T, Tan Yu-Feng, Iwamoto K, and Kinai N: Change in Mutagenic Activity of Genistein after a Nitrite Treatment. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 76(5), 938-941(2012)

Inui S, Shimamura Y, Masuda S, Shirafuji K, Moli RT, Kumazawa S.: A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 76(5), 1038-1040 (2012)

Inui S, Hosoya T, Shimamura Y, Masuda S, Ogawa T, Kobayashi H, Shirafuji K, Moli RT, Kozone I, Shin-ya K, Kumazawa S.: Solophenols B-D and solomonin: new prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the Solomon Islands and their antibacterial activity., *J. Agric. Food Chem.*, 60(47):11765-70(2012)

Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S: In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. *Environ. Toxicol.*, 28(10), 588-594 (2013).

Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 7(4), 452-461 (2013).

[学会発表](計10件)

飯尾美沙子, 平野元美, 増田修一, 米谷民雄, 中村好志: 静岡県地場産品のアクリルアミドの生成及び遺伝毒性に対する抑制効果、日本農芸化学会 2011 年度大会(京都)2011年3月26-28日

飯尾美沙子, 平野元美, 島村裕子, 中村好志, 米谷民雄, 増田修一: 静岡県地場産品におけるアクリルアミドの生成及び遺伝

毒性に対する抑制効果(2)、第 102 回日本食品衛生学会学術講演会(秋田)2011年9月29-30日

山田昌徳, 島村裕子, 戸塚ゆ加里, クウリバリ・スレウマン, 田村友佳, 長谷井友尋, 若林敬二, 渡辺徹志, 増田修一: メイラド反応由来新規変異原性物質 ABAQ の生体内生成に関する研究、日本環境変異原学会第40回大会(東京)2011年11月21-22日  
糺, 島村裕子, 米谷民雄, 増田修一: グリシドール及びグリシドール脂肪酸エステル類の遺伝毒性に関する研究。第104回日本食品衛生学会学術講演会(岡山)2012年9月20-22日

柴田昌治, 島村裕子, 佐藤緑, 楊平, 増田修一: 金銀花の抗糖尿病効果に関する研究。第17回日本フードファクター学会(JSoFF)学術集会・第9回日本カテキン学会総会 合同大会(静岡)2012年11月10-11日

京谷恭弘, 岩元莉香, 飯尾美沙子, 寺田めぐみ, 増田修一: In vivo コメットアッセイにおける手法間差の検討(2)。日本環境変異原学会 第41回大会(静岡)2012年11月29-30日

新家桃香, 島村裕子, 青野博志, 青野盈瓠, 篠田和代, 佐藤勝浩, 村田容常, 増田修一: 食肉中の食中毒菌の分布とその抑制に関する研究。日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台)2013年3月25-27日

青木菜摘, 島村裕子, 田中 隆, 村田容常, 増田修一: 食中毒菌の毒素産生および活性を抑制する植物食品の探索。日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台)2013年3月25-27日

平井央子, 島村裕子, 増田修一: 食肉の加熱調理により生成するグリシドール脂肪酸エステルに関する研究。第106回日本食品衛生学会学術講演会(沖縄)2013年11月21-22日

平石美季, 島村裕子, 新家桃香, 佐藤勝浩, 青野博志, 青野盈瓠, 篠田和代, 村田容常, 増田修一: 食肉中の食中毒菌の分布と電解水による殺菌効果に関する研究。第106回日本食品衛生学会学術講演会(沖縄)2013年11月21-22日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodhygn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田修一 (MASUDA SHUICHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40336657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし