

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：34507

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00815

研究課題名(和文) 過酸化脂質を還元消去する食材の探索と調理加工におけるその利用法の開発

研究課題名(英文) Utilization of hydroperoxy lipid-reducing foodstuff in Food processing and cooking

研究代表者

寺尾 純二 (Terao, Junji)

甲南女子大学・医療栄養学部・教授

研究者番号：60093275

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)：調理や消化過程で生じる過酸化脂質は最小限に抑える必要がある。そこでネギ属野菜が有する過酸化脂質還元作用を利用することにより、過酸化脂質量低減化法を開発することを目的とした。万能ネギ、長ネギ、タマネギ、ニンニクのうちで長ネギの還元作用が最も強いことを明らかにした。食用油脂のトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド(TG-OOH)を人工膵液で加水分解すると遊離脂肪酸ヒドロペルオキシ体(FFA-OOH)が産生したが、長ネギ試料はTG-OOHおよびFFA-OOHどちらも還元作用を示さなかった。消化管ではネギの還元作用を発揮する活性本体が膵液により消化されて消失すると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で発生する過酸化脂質に関しては多くの研究業績があり、その本体であるヒドロペルオキシド(LOOH)を還元消去する酵素群も明らかになっている。しかし、毒性が問題となる食品由来過酸化脂質の低減化方法にLOOH還元消去能は利用されていない。本研究は安全なLOOH還元消去物質を食材からスクリーニングし、ネギ属野菜が新規の抗酸化作用としてグルタチオンペルオキシダーゼ様のLOOH還元能をもつことを明らかにした。食材が有するLOOH還元能は、調理加工過程で脂質含有食材に混合させることや、食事における組み合わせに応用することにより、健全な「低過酸化脂質食」を作出することができる。

研究成果の概要(英文)：The content of peroxidized lipids in the cooked foods should be hold at the lowest level to prevent the oxidative injury in the postprandial process including digestion. Therefore, this study aimed to develop a new method for minimizing the peroxidized lipid by the use of lipid hydroperoxide-reducing activity of onion-family vegetables. It was found that green onion possesses higher hydroperoxy-linoleic acid-reducing activity than welsh onion, onion and garlic. Artificial pancreatic juice-dependent hydrolysis of hydroperoxy-triacylglycerol (TG-OOH) generated hydroperoxy-free fatty acids (FFA-OOH). However, simultaneous addition of gree onion sample did not reduce neither TG-OOH nor FFA-OOH. In the digestive tract, it is likely that active components of green onion is digested to lose their hydroperoxide-reducing activity. Further study is required to overcome this problem for the practical uses of green onion-derived onion active component for new antioxidant ingredient.

研究分野：食品機能学

キーワード：過酸化脂質 還元作用 食品機能 酸化ストレス 抗酸化活性 ネギ属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸を有する脂質は、活性酸素 (ROS) との反応により過酸化脂質を生じる。その一次反応生成物は脂質ヒドロペルオキシド (lipid hydroperoxide: L00H) であり、生体内で生じた L00H は生体膜物性を変化させるとともに、細胞内外の酸化ストレスメディエータとして作用する。さらに L00H が分解すると、生体毒性をもたらすラジカル種や活性カルボニルが発生し、これらの二次反応生成物が生体成分と反応することにより障害をもたらされる。一方、近年の酸化ストレス研究は、酸化ストレス防御におけるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) やペルオキシレドキシシン (PrX) に代表される L00H 還元解毒酵素の重要性を明らかにした。すなわち生体内の L00H は、L00H 還元解毒酵素により毒性を発揮しないレベルに機能調節されている。

一方、脂質含有食品の健全性の観点から、調理加工ばかりでなく摂取後の消化過程における過酸化脂質の生成が注目されている (Kanner and Lapidot, *Free Radic. Biol. Med.* 2001:31:1388-1395; Tirosh et al. *J. Agric. Food Chem.* 2015:63:7016-7023 など)。さらに、摂取食事由来の酸化ストレスとの関連で、動脈硬化症発症原因としての食品由来過酸化脂質の役割が示唆されている (Ursini and Sevanian *Biol. Chem.* 2002:383:599-605)。これは、生体の酸化ストレス障害発生に食品摂取が関わることを示すものである。しかし、食品脂質を対象とした過酸化脂質生成抑制の研究は、ROS 捕捉作用により L00H 生成を抑制するビタミン E、ビタミン C やポリフェノールなどの低分子抗酸化物質に限られている。すでに研究代表者 (寺尾) は、生体内の L00H 還元解毒酵素を模倣して L00H の生成抑制に働く食材をスクリーニングし、ネギ属野菜が強い L00H 還元能を有することを初めて発表した (Terao et al. *Biofactors* 2005:23:1-6)。万能ネギ (welsh onion) に強い L00H 還元能が検出され、本還元能は GPx 活性とは相関せず、主に非酵素的反応に基づくことを明らかにした。この L00H 還元能は加熱を含む食品の調理加工過程およびタンパク質分解が起こる消化プロセスでも有効に作用するかどうかに興味もたれる。もし調理過程や消化過程でも有効であれば、食品由来新規抗酸化物質として L00H 還元能を有する食材を調理加工過程で脂質含有食材に混合させることや、食事における組み合わせに利用することにより、食品添加物によらない健全な「低過酸化脂質食」を作出することができる。

研究代表者は、L00H 還元能の評価方法として、13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE) を用いた簡便な逆相 HPLC 法を開発した (Kotosai et al. *Lipids* 2013:48:569-578)。さらに消化管における過酸化脂質の挙動に関して、さらに、人工消化モデルを用いた L00H の消長を報告した経験がある (Terao and Fukino, *J. Food Lipids* 1993:1:9-86; J. Terao et al. *Biosci. Biotech. Biochem* 1995:55:69-872)。したがって、本研究の目的である「食品添加物に依存しない低過酸化脂質食」を作出するための研究を開始する基盤が整った。

2. 研究の目的

以下の (1)(2)(3)(4) を研究目的とした。

- (1) ネギ属野菜を対象食材として、ネギ・タマネギ等の各種類から最も L00H 還元能が強く、調理加工における脂質含有食品との組み合わせが可能な種類を選定する。
その野菜を用いて以下の項目を明らかにする。
- (2) 高脂質食品 (畜肉・魚肉パテ) の加熱調理における選抜種の L00H 還元能を機能評価する。
- (3) 加工プロセス (乾燥肉・魚干物等) における選抜品種の L00H 還元能を機能評価する。
- (4) 上記の調理あるいは加工後の食品を人工消化モデルに暴露することにより、消化プロセスでの過酸化脂質生成に対する抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- ・ 13-HPODE およびその還元誘導体である 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) の HPLC 分析を利用した L00H 還元能評価法を用いて、ネギ属野菜から最も L00H 還元能が強い種類を決定した。
- ・ 決定した野菜を畜肉・魚肉パテに混合して加熱調理することにより、調理過程での還元能の発現を検討した。
- ・ 乾燥肉や魚干物などの加工において決定した種類の野菜を混合することにより、加工過程での還元能の発現を検討した。
- ・ これらの調理品や加工品を人工消化液に暴露してインキュベーションすることにより、消化過程での過酸化脂質生成蓄積に対する野菜の効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 2016 年度の結果は以下のとおりである。

光増感酸化反応 (Type II) により、リノール酸から 13-HPODE と 9-HPODE の異性体混合物を調

製した。

この異性体混合物を NaBH4 で還元することにより、13-HODE と 9-HODE の異性体混合物を調製した。

これらのヒドロペルオキシ体(13HPODE + 9-HPODE)とその還元体である(13HODE + 9-HODE)を標準試料として用いることにより、ヒドロペルオキシリノール酸(ヒドロペルオキシ体: LA-00H)とその還元体であるヒドロキシリノール酸(ヒドロキシ体: 体 LA-0H)の HPLC 分離が可能であることを確認した。

本 HPLC 法により、万能ネギの水抽出液が LA-00H を LA-0H に還元することを確認した(図 1)。

タマネギにも還元作用が見られたが、万能ネギよりもその活性は弱かった。万能ネギ抽出液の加熱処理(沸騰水浴中 30 分)で LA-00H 還元作用は変化しなかったため、非酵素的な反応であることが推測された。

クロラミン-T 処理により万能ネギの LA-00H 還元作用は著しく減少したことから、メチオニンが反応に関与することが示唆された。しかし、高濃度のメチオニンそのものは LA-00H を還元しなかったことから、メチオニン以外の構造も還元作用に必要と思われた。

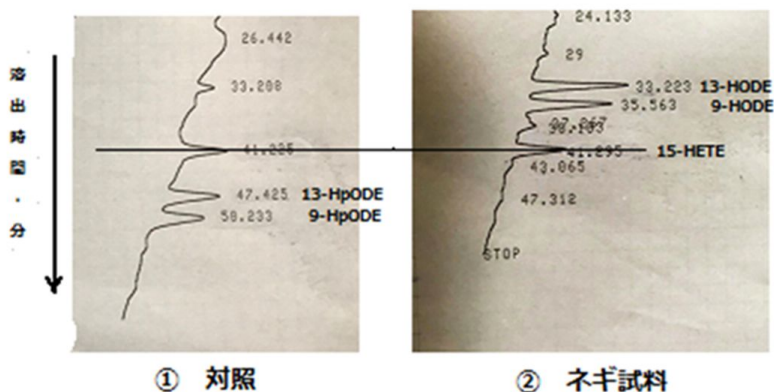


図-1 長ネギ水抽出物によるリノール酸ヒドロペルオキシドの還元作用の HPLC 分析

(2) 2017 年度の成果は以下の通りである。

ネギ属野菜として万能ネギ、長ネギ、タマネギ、ニンニク、および比較対照としてニンジン材料として、HPLC 法により 13-HPODE から 13-HODE への還元率を測定した結果、長ネギの 13-HpODE 還元作用が最も強いことが明らかになった(図 2)。上部緑色部と下部白色部では作用の強さに相違は見られなかった。4 種のネギ属野菜すべてにおいて加熱処理(沸騰水浴中 30 分)で還元作用は低下した。この結果は前年度の結果とは異なるため、検証が必要である。

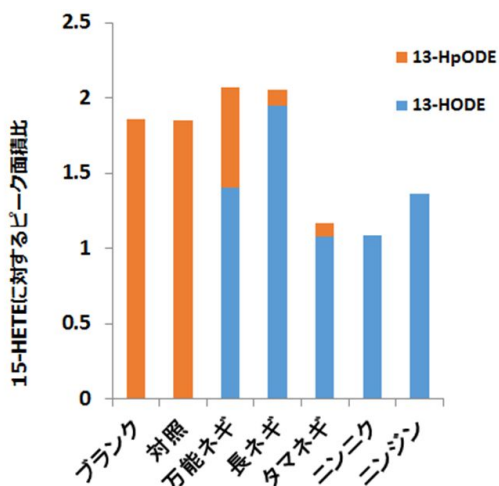


図-2 ネギ試料の 13-HPODE還元能の比較

食用油脂(サラダ油)から光増感酸化法によりトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド(TG-00H)を作成した。TG-00H は人工膵液であるパンクレアチン処理により加水分解されて、ジアシルグリセロール(DG)、遊離脂肪酸(FFA)および遊離脂肪酸ヒドロペルオキシド

(FFA-00H)を産生することを確認した。
 パンクレアチンによる TG-00H 加水分解反応において、長ネギ試料を同時添加すると TG-00H の加水分解は促進されたが、TG-00H および FFA-00H の還元作用は観察されなかった(図 3)。

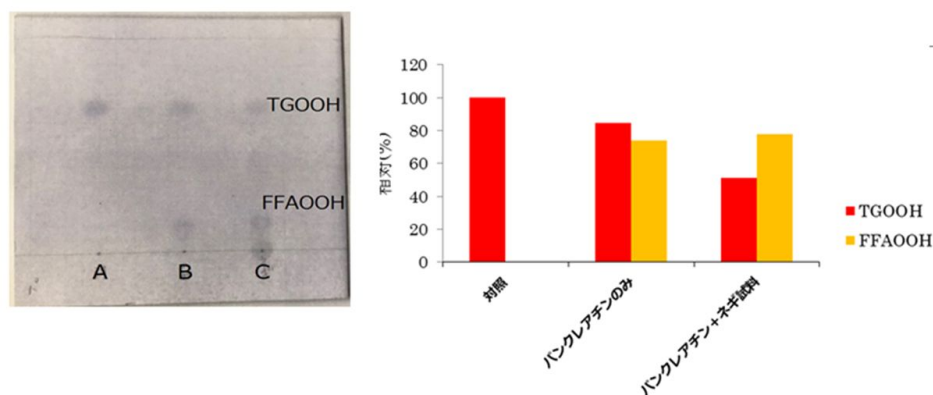


図-3 人工唾液 (パンクレアチン) によるTG-00Hの加水分解に対する長ネギ試料同時添加の影響 (TLC分析)

長ネギ試料による還元作用がみられなかった原因として、ネギの還元作用を示す活性本体がパンクレアチンにより消化されて消失した可能性が考えられた。

食肉中の脂質過酸化反応の触媒としてミオグロビン等のヘムたんぱく質が働く可能性がある。一方、ヘムたんぱく質は L00H を還元消去するペルオキシダーゼ活性を有することが知られている。そこで、ミオグロビンのペルオキシダーゼ作用に対する長ネギの効果を見た結果、長ネギは L00H に対するミオグロビンのペルオキシダーゼ作用を強める可能性が示された。

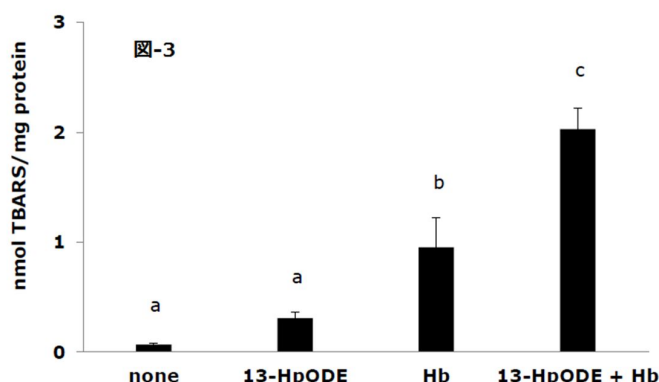
(3) 2018 年度の成果は以下のとおりである。

TG-00H に対して長ネギは還元作用を示さないことを確認した。

ヘムタンパク質としてヘモグロビンを用い、大腸モデル細胞 (Caco-2細胞) の脂質過酸化反応をTBA法で検討した結果、13-HPODEはヘムタンパク質の共存により、細胞脂質の過酸化反応を惹起させることがわかった(図 3)。したがって、消化管中での食事由来成分によるL00Hの還元消去は大腸粘膜の酸化ストレス障害の抑制に働く可能性が示された。

結論として、ネギ属野菜(特に長ネギ)は遊離脂肪酸ヒドロペルオキシド (FFA-00H) を還元解毒する作用を有するが、この作用はトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド (TG-00H) には働かない。唾液による TG-00H 消化過程で FFA-00H が生じるが、ネギ本体の活性本体が唾液により消化されて活性を失うため FFA-00H を還元できない可能性がある。消化管(とくに大腸粘膜)での酸化ストレス抑制において食物由来 FFA-00H の還元作用は効果的であるが、その活性発現のためには、消化酵素に対する安定性確保などの問題点を克服する必要があることが明らかである。

なお、当初予定していた調理過程および加工過程での還元能の様相を検討することは、本研究期間中は実施できず、今後の検討課題として残された。



13-HPODEとヘムたんぱく質による大腸粘膜細胞の酸化障害

Hb:ヘモグロビン Molares et al. J. Clin. Biochem. Nutr. 2018;63:175-180

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Kawabata K., Yoshioka Y., Terao J. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols *Molecules* (査読有) 2019:24:e370 doi:10.3390/molecules2402370.
- 2) Morales AM, Mukai R., Murota K., Terao J. Inhibitory effect of catecholic colonic metabolites of rutin on fatty acid hydroperoxide and hemoglobin dependent lipid peroxidation in Caco-2 Cells *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (査読有) 2018:63:175-180 doi:10.3164/jcfn.18-38.
- 3) 寺尾純二 ポリフェノール研究の現状と未来 (査読無) 日本ポリフェノール学会雑誌 2017:6:7-10
- 4) Junji Terao. Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology* (査読有) 2017:139:15-23. doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.021

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 寺尾純二 動物実験による食品機能成分の有効性評価とその問題点ーカロテノイドとフラボノイドについてー 日本栄養食糧学会 2017 年度大会 2017 年
- 2) Junji Terao Factors affecting bioavailability of plant polyphenols ICMAN IUPHAR National Products at Aberdeen UK. 2017

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 寺尾純二 抗酸化ポリフェノールの体内動態と機能性発現機構 アグリバイオ 2 巻 748-752 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。