

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17678

研究課題名(和文)DHAおよびEPA過酸化脂質に対する安定同位体を用いた体内動態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of isotope labeled DHA and EPA hydroperoxide distribution and metabolism

研究代表者

吉永 絢(桐明絢)(Yoshinaga-Kiriake, Aya)

秋田大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20794845

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文): 脂質過酸化脂質を食事として摂取した際のヒトへの影響を調べることを目的に、安定同位体ラベル化DHAおよびEPA過酸化脂質を合成し、これをマウスに経口投与後、安定同位体比質量分析計で呼気中に含まれる¹³Cの量を測定し、脂質過酸化脂質の体燃焼性を調べた。ただし、DHA過酸化脂質は収量が不足しており、EPA過酸化脂質のみ実施した。EPA過酸化脂質は未酸化のEPAより速やかに酸化を受けることが示唆されたが、総合的な体燃焼量は酸化脂質と未酸化脂質で差がないことが示唆された。また、EPA過酸化脂質は胃酸で分解され、EPAより分子量の小さい脂肪酸やアルデヒド類に変換されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、EPA過酸化脂質の体内動態の一部を明らかにすることができ、EPA過酸化脂質は胃酸で分解され、EPAより分子量の小さい脂肪酸やアルデヒド類に変換されることが判明した。本研究のように、多価不飽和脂肪酸過酸化脂質の体内動態を解明する一連の研究が推進されれば、どの脂質過酸化脂質がヒトの健康に悪影響を及ぼすのかを解明する糸口となる。さらに、悪影響を及ぼす脂質過酸化脂質を除去した食品や体に良い脂質の開発にも応用可能であり、学術的な波及効果だけでなく、社会的な波及効果も極めて高いと考える。

研究成果の概要(英文): To elucidate the effects of ingestion of lipid hydroperoxides in human body, the catabolic rates of synthesized ¹³C-labeled EPA ethyl ester hydroperoxides (*EPA-EE-OOH) and EPA ethyl ester (*EPA-EE) in the mouse were compared using isotope ratio mass spectrometry. Although the catabolic rate of *EPA-EE-OOH was faster than that of *EPA-EE in the mouse, there was no significant differences in total amount of catabolism among *EPA-EE-OOH and *EPA-EE. In addition, it has been shown that EPA ethyl ester hydroperoxides were decomposed to fatty acid and oxo-fatty acid and aldehyde by the treatment of hydrogen chloride. Thereafter, these decomposition products were -oxidized rapidly in the liver.

研究分野：油脂科学

キーワード：安定同位体ラベル化脂肪酸 過酸化脂質 EPA過酸化脂質 呼気 体内動態 体燃焼性 同位体比質量分析計

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、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は酸化を受けやすい。そのため、食品を高温下や照射下などで保管すると、食品中脂質の酸化が急激に進行し、食中毒の原因となる (図1)。現在、脂質酸化物の毒性は、PUFA の酸化で最初に発生する過酸化脂質 (PUFA 過酸化物) が原因ではなく、その分解により生成したアルデヒドやケトンなどの二次酸化生成物が主な原因であると考えられ、食中毒だけでなく、動脈硬化をはじめとした各種病態の発症原因になることが報告されている。

その一方で、PUFA 過酸化物を食事として摂取した際の体への影響はほとんど分かっていない。PUFA 過酸化物またはそのアルコール化物の形で臓器・組織に蓄積するのか、あるいは再び PUFA の形に戻されて臓器・組織に蓄積するのか、もしくは通常の PUFA と同じように体内で代謝 (体燃焼) されるのか、などの体内動態に関する知見は全く得られていないため、食事として摂取した際の PUFA 過酸化物の健康への影響は未知である。

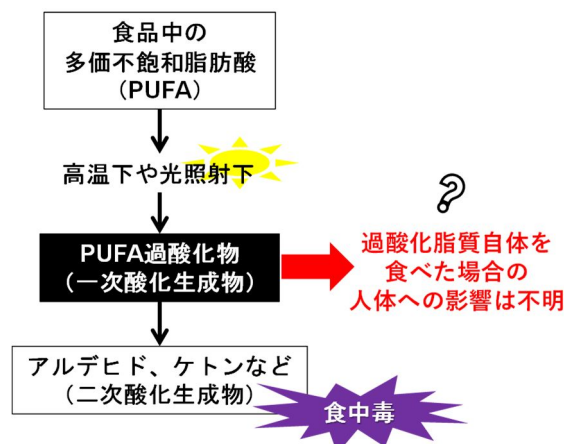


図1 PUFA の酸化による食中毒発生機構

図1 PUFA の酸化による食中毒発生機構

2. 研究の目的

我々はこれまでリノール酸過酸化物 (LA-00H) およびオレイン酸過酸化物 (OA-00H) について、体内動態を明らかにする研究を行ってきた。それらの一連の研究において、LA-00H および OA-00H は胃酸で分解され、炭素数が 8~12 程度の脂肪酸となって、代謝されている可能性が示唆された。しかし、未だ他の PUFA 過酸化物の動態は不明である。

そこで、本研究では PUFA のうち、DHA および EPA に焦点を当てた。DHA および EPA は、体内で合成される局所ホルモンの出発材料で、脳、網膜などの膜リン脂質の主な構成成分である。さらに、DHA や EPA は、抗酸化、抗炎症作用、心血管疾患リスクの軽減や精神疾患への有効性などが報告され、脳機能改善効果も期待されている。反対に、生体内で生成された過酸化脂質は認知症への関与が示唆されている。しかし、食事で摂取した DHA や EPA 過酸化物のヒトへの影響は不明であり、解明すべき重要な課題である。

食事で摂取した DHA や EPA 過酸化物のヒト体内における動態を解明するため、我々が有している技術を駆使し、本研究においては DHA または EPA 過酸化物の体燃焼性を精査した。つまり、安定同位体 (重水素 (D) やカーボン 13 (^{13}C)) でラベル化した DHA および EPA 過酸化物を合成し、これをマウスに経口投与して、安定同位体比質量分析計 (IR-MS) で呼気中に含まれる ^{13}C の量を測定することで、安定同位体ラベル化 DHA 過酸化物と安定同位体ラベル化 EPA 過酸化物の体燃焼性を、未酸化の DHA および EPA と比較し、検討した。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体ラベル化 DHA エチルエステルおよび安定同位体ラベル化 EPA エチルエステルの合成

DHA または EPA を Barton 脱カルボキシル化反応によって臭素化後、Grignard 反応を用いて安定同位体 (^{13}C) でラベル化した。これをエチルエステル化し、目的の安定同位体ラベル化 DHA エチルエステル ($^*DHA-EE$) と安定同位体ラベル化 EPA エチルエステル ($^*EPA-EE$) を得た。

(2) 安定同位体ラベル化 DHA エチルエステル過酸化物および安定同位体ラベル化 EPA エチルエステル過酸化物の合成

合成した $^*DHA-EE$ または $^*EPA-EE$ にメチレンブルーを添加し、クロロホルムに溶解後、照射下 (50,000 lux) でインキュベート (4、24 時間) し、光酸化を行った。その後、ハイドロスーパーセルおよびシリカゲルを用いて吸引する過することで、メチレンブルーを除去し、エバポレーターで減圧乾固した。これをシリカゲルでフラッシュカラム精製し、安定同位体ラベル化 DHA エチルエステル過酸化物 ($^*DHA-EE-00H$) または安定同位体ラベル化 EPA エチルエステル過酸化物 ($^*EPA-EE-00H$) を合成した。

(3) マウス呼気による体燃焼性の分析

(2) の $^*DHA-EE-00H$ の精製が十分量得られなかったことから、マウス呼気による体燃焼性の分析は、 $^*EPA-EE-00H$ のみ行った。

具体的には、合成した安定同位体ラベル化物は、末端に ^{13}C が結合していることから、マウス体内で燃焼されると、呼気中に ^{13}C でラベル化された二酸化炭素 ($^{13}CO_2$) が発生する。この $^{13}CO_2$ の発生量を測定することにより、 $^*EPA-EE-00H$ の体内燃焼性を精査した。つまり、 $^*EPA-EE-00H$ ま

たは、コントロールとして¹⁴C-EPA-EE を乳化し、これを 4 週齢 ICR マウス () へ強制経口投与 (16 μmol/20 g body weight) した (n=5) 。投与後、30、45、60、75、90、105、120、150、180、240、300、360 分に呼気採取用チャンバーの中でマウス呼気を採取し、¹³CO₂ 発生量を IR-MS で測定した。

(4) EPA-EE-OOH の酸による分解試験

EPA-EE-OOH に 0.2 M HCl (pH 1) を添加し、37 °C で 3 h インキュベートした。これにヘキサンを添加し、上清をエバポレーターで減圧乾固した。これに 1 mL のヘキサンを加え、GC-MS に供した。

4 . 研究成果

(1) DHA-EE および¹⁴C-EPA-EE の合成

約 1 g の¹⁴C-DHA-EE および¹⁴C-EPA-EE を合成した。

(2) ¹⁴C-DHA-EE-OOH および¹⁴C-EPA-EE-OOH の合成

照射下における酸化反応によって、0.3 g の¹⁴C-EPA-EE-OOH を得ることができた。一方、¹⁴C-DHA-EE-OOH は、フラッシュカラムで¹⁴C-DHA-EE-OOH と過酸化脂質の分解によって生じた二次酸化生成物などの副生成物を分離することができず、¹⁴C-DHA-EE-OOH の精製には至らなかった。

(3) マウス呼気による¹⁴C-EPA-EE-OOH の体燃焼性の検討

¹⁴C-EPA-EE-OOH または、コントロールとして¹⁴C-EPA-EE をマウスに強制経口投与し、呼気中の¹³CO₂ 発生量を比較した。その結果、コントロールである¹⁴C-EPA-EE 投与群と比較して、¹⁴C-EPA-EE-OOH 投与群では投与後 30 ~ 60 分まで呼気中の¹³C の値が有意に高くなった (図 2) ため、この時点での体燃焼性は EPA-EE-OOH の方が高くみえる。しかし、投与後、75 ~ 240 分においては、¹⁴C-EPA-EE-OOH と¹⁴C-EPA-EE 投与群どちらの場合でも、呼気中の¹³C の値に有意差はなかった。さらに、投与後 6 時間の間に得られた¹³C (‰) の値を積分した曲線下面積 (Area under the curve、図 3) においては、燃焼量に差は見られなかった。曲線下面積をみると、EPA 過酸化化物と EPA の間で燃焼量に差がなく、小腸から吸収されてリンパ液へ移行し、体循環によって組織や細胞に蓄積されているように推測できるが、¹⁴C-EPA-EE-OOH 投与群の 30 ~ 60 分において呼気中の¹³C の値が有意に高く、この間は小腸から吸収された後に、肝臓で酸化を受けて代謝されていると推測できる。

前述のように、LA-OOH および OA-OOH は胃酸で分解され、炭素数が 8 ~ 12 程度の脂肪酸となつて、代謝されていることが示唆された。そこで、¹⁴C-EPA-EE-OOH 投与群では投与後 30 ~ 60 分まで呼気中の¹³C の値が有意に高くなった理由として、EPA-EE-OOH の一部が、胃液で分解され、炭素数が中くらいの脂肪酸となつて肝臓で酸化されている可能性が考えられる。そこで、胃酸による EPA-EE-OOH の分解試験を行った。

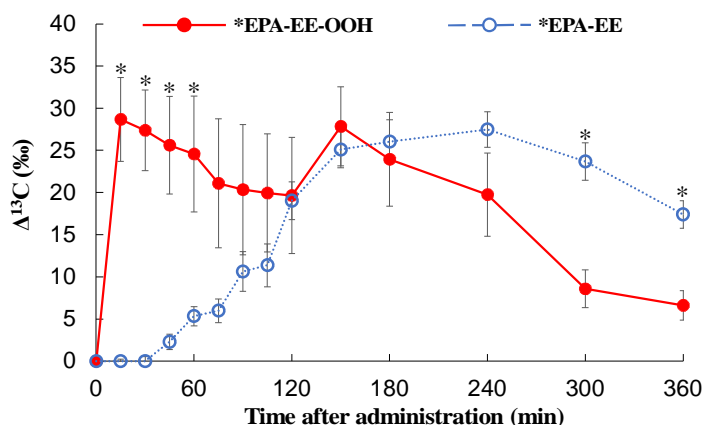


図 2 ¹⁴C-EPA-EE-OOH および¹⁴C-EPA-EE 投与後に呼気中に排出された¹³C (‰) の値の比較。n=6 で測定した。* は有意差 (p<0.05) を示す。

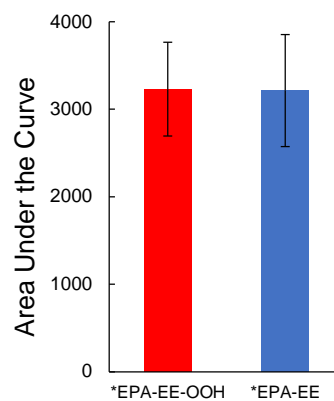


図 3 ¹⁴C-EPA-EE-OOH および¹⁴C-EPA-EE の曲線下面積の比較

(4) EPA-EE-OOH の酸による分解試験

EPA-EE-OOH を塩酸によって処理し GC-MS でマスフラグメントから化合物を同定した結果、図 4 のように Butanoic acid ethyl ester、Decadienoic acid ethyl ester、Tridecatricenoic acid ethyl ester などの脂肪酸や 2-Butenal、3,6-Nonadienal、2,4-Heptadienal、2,4,7-Decatrienal などのアルデヒド類が検出され、EPA-EE-OOH が塩酸によってヒドロペルオキシ基の前後で分解されていると推測された。よって、EPA-EE-OOH の一部は、胃液で分解され EPA よ

り炭素数が短くなった脂肪酸やアルデヒド類として代謝されているため、¹³C-EPA-EE-OOH 投与群で投与後 30 ~ 60 分まで呼気中の ¹³C の値が有意に高くなった可能性が示唆された。

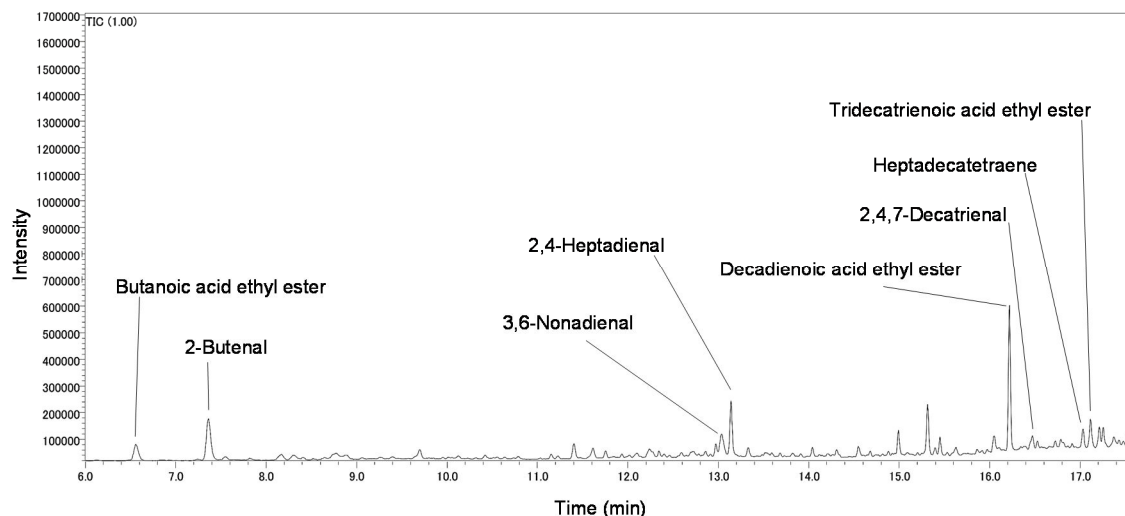


図 4 EPA-EE-OOH 酸分解物の GC-MS クロマトグラム

本研究結果により、EPA-OOH が胃酸で分解され、一部が肝臓での酸化によって摂取後すぐに代謝されている可能性が示唆された。しかしながら、今回の研究ではどのくらいの量の EPA-OOH が分解され、分解物が肝臓で酸化されているのか、分解産物の代謝速度は速いのか、詳細な部分は突き止められなかった。今後は、EPA-OOH が胃でどのくらい分解されるのか、小腸から直接 EPA 過酸化物を吸収した場合の体内動態、EPA 過酸化物が胃で分解された際の分解産物の体内動態などを精査していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takumi Takahashi, Shunji Kato, Junya Ito, Naoki Shimizu, Isabella Supardi Parida, Mayuko Itaya-Takahashi, Masayoshi Sakaino, Jun Imagi, Kazuaki Yoshinaga, Aya Yoshinaga-Kiriake, Naohiro Gotoh, Ikuo Ikeda, Kiyotaka Nakagawa	4. 巻 57
2. 論文標題 Dietary triacylglycerol hydroperoxide is not absorbed, yet it induces the formation of other triacylglycerol hydroperoxides in the gastrointestinal tract	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2022.102471	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 -

1. 著者名 Aya Yoshinaga-Kiriake, Daisuke Takata, Takashi Norito, Masayasu Maki, Shota Mochizuki, and Kazuaki Yoshinaga	4. 巻 71
2. 論文標題 Comparative Evaluation of Fatty Acid Composition, Tocopherols, and Volatile Compounds of Walnut Oil between <i>Juglans mandshurica</i> Maxim. var. <i>sachalinensis</i> (Komatsu) Kitam and <i>J. regia</i> L.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1743-1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess22015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋巧、加藤俊治、伊藤隼哉、吉永和明、桐明絢、後藤直宏、仲川清隆
2. 発表標題 安定同位体標識によるトリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の解明
3. 学会等名 公益社団法人日本農芸化学会2022年度(令和4年度)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐明絢、高田大輔、則藤孝志、牧雅康、望月翔太、吉永 和明
2. 発表標題 オニグルミとペルシャグルミの脂肪酸組成および酸化安定性の比較
3. 学会等名 公益社団法人日本農芸化学会2022年度(令和4年度)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋巧、加藤俊治、伊藤隼哉、吉永和明、桐明絢、後藤直宏、仲川清隆
2. 発表標題 トリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の新仮説検証 ～疾病との関連解明に向けて～
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第31回大会
4. 発表年 2022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