

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：84421
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25450197
研究課題名(和文) 油脂・食品中のリスク懸念物質のin vitro動態に関する研究

研究課題名(英文) In vitro behaviour of risky compound in oil and foods

研究代表者
渡辺 嘉 (Watanabe, Yomi)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・生物・生活材料研究部・研究主任

研究者番号：60416310
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：3-モノクロロプロパンジオール(MCPD)の異性体、2-MCPDとその脂肪酸エステルを異性体別に合成し、摂食後の体内初期動態をin vitroで推定することを試みた。MCPDエステルは膵リパーゼや小腸分泌酵素の作用により遊離型に分解され、小腸で非選択的、非能動的に拡散吸収されると推定された。異性体間に吸収性の差異は認められなかった。一方、エステル型MCPDの吸収はin vitro吸収性評価では検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：2- monochloropropane diol (MCPD), the isomer of 3-MCPD, and their fatty acyl esters were synthesized and their first stage behavior after the intake were estimated in vitro. MCPD esters were estimated to be hydrolyzed to free form by pancreatic lipase and by enzymes secreted by the small intestine, and to be absorbed non-selectively and passively. Little difference was observed in the intestinal absorption btw the 2- and 3-MCPD isomers. Absorption in MCPD ester form was not observed in vitro.

研究分野：酵素化学

キーワード：モノクロロプロパンジオール

1. 研究開始当初の背景

3-モノクロロプロパンジオール(3-MCPD)は、アジア製のタンパク質加水分解工程を経たアミノ酸液を使用する発酵調味料(醤油)などに含まれる毒性物質と欧州で指摘され、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会はその暫定耐容摂取量を 2 ug/kg/日と規定した。これを受けて国内のアミノ酸液を使用した調味料ではその含量低下が図られてきた。また、天然油脂や油脂加工品中に、ドイツ公定法によって 3-MCPD が検出されたことが公表され、当時油脂加工品として大きな市場を占めていた製品が製造中止に追い込まれるなど、日本の油脂産業界に大きな打撃を与えた。その後、国内外で研究が進み、ドイツ公定法で 3-MCPD として検出され毒性が疑われた物質の主成分は、実際には毒性が未確認のグリシドール脂肪酸エステルであることが明らかにされた。しかし、毒性が懸念されるため、現在世界中で油脂および油脂加工品中の MCPD・グリシドール類の含量低減が進められている。

ドイツ公定法にはグリシドールが 3-MCPD として誤検出される懸念がある旨が当初から記載されていたが、誤検出の原因やその程度は不明であった。我々は、ドイツ公定法の分析操作過程での 3-MCPD とグリシドールの挙動を NMR で直接モニターし、溶液の pH の変化により 3-MCPD とグリシドールが容易に相互変換することが誤定量の主要な原因になっていることを突き止めた(*Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1168-1171, 2011)。ドイツ公定法の検証と改良、新規定量法の確立は世界各国で進められ、ヨーロッパでは MCPD を誘導化して定量する間接法、日米ではグリシドール脂肪酸エステルを LCMS で定量する直接法が主に開発され、活発な検証と議論が欧州および米油化学会を中心に展開してきた。一方、日本では産業界が主として本テーマに取り組んでいるが、残念ながら学術機関や公的機関による検証や科学的データは少ない。

これまでの 3-MCPD・グリシドールに関する研究を発展させ、我々は 3-MCPD の位置異性体である 2-MCPD に着目した。3-MCPD

が示す毒性は、その異性体である 2-MCPD でも同様なのか、生体内での分解性や吸収性、毒性の有無、3-MCPD/2-MCPD 異性体間相互変換は起こるか、そもそもの食品中の含量などは憶測されているものの、科学的検証はほとんどない。その主因はこれまで、2-MCPD 標準品が市販されておらず、信頼性ある合成法の報告もなかったため、同定と定量法が確立されていなかったためである。しかしながら、我々は 2-MCPD の大量合成に世界に先駆けて成功し、2-MCPD が 3-MCPD と一斉定量が可能なことを確認した。また、3-MCPD 脂肪酸エステルと同様に油脂中に含まれている可能性がある 2-MCPD 脂肪酸エステルを合成する見込みもついた。

2. 研究の目的

本研究では、食品中のリスク懸念物質の異性体である 2-MCPD のエステルを新規に合成し、その物質挙動を、ヒト消化管を通過する過程で予測される pH 変化やリパーゼ作用等を考慮しながら、生体内環境下での物質動態を推定する。またこれらの小腸吸収性を、*in vitro*で推定する。

3. 研究の方法

初めに、2-MCPD、および 3-MCPD とそのエステルを異性体別に合成する。これらの化合物の物質挙動を、ヒト消化管を通過する過程で予測される pH 変化やリパーゼ作用等を考慮しながら、生体内疑似環境下で NMR を用いて直接モニタリングし、生体内環境下での物質動態を推定する。2-MCPD エステルおよびその代謝物の腸管吸収性や細胞毒性を、3-MCPD やグリシドール(エステル)を対照として、動物培養細胞を用いた *in vitro* 実験系にて評価する。

4. 研究成果

初めに、日本薬局方に記載される空腹時胃酸模擬液(pH 2)にグリシドールを溶解させた。グリシドールは経時的にエポキシドが開環してグリセロールに変換され、MCPD 類の生成は殆どないことが確認された。本解毒効果は満腹時空腹時胃酸模擬液(pH 7)中では認められなかった。

体内分泌酵素による分解性や小腸吸収性

その他の *in vitro* 評価試験は 37 で実施される。過去の研究では、MCPD エステルの体内動態を推定する目的で、パルミチン酸など飽和脂肪酸エステルが合成され、評価されてきた。しかし、パルミチン酸エステルは融点が高く、37 での評価試験中、固体であれば正しく分解性や吸収性が評価されない懸念がある。そこで、本研究では、37 で液体の 2-および 3-MCPD ジオレート を合成し、膵リパーゼとパンクレアチンによる加水分解評価に供した。

加水分解産物と *in vitro* 透過性試験溶液は、荷電化粒子検出器 (CAD) を接続した HPLC で分析し、アシル基結合位置の異なる MCPD モノエステル異性体を分離、定量した。膵リパーゼやパンクレアチンによる加水分解試験では、3-MCPD ジオレートから 3-MCPD-2-オレートが主に生じ、遊離 3-MCPD はほとんど検出されなかった。一方、2-MCPD ジオレートから一定量の 2-MCPD-1-オレートが検出され、時間の経過に応じ遊離 2-MCPD が増加した。従って、体内に摂取された 3-MCPD ジエステルは 3-MCPD-2-アシル-モノエステル体で、2-MCPD ジエステルは速やかに分解され主に 2-MCPD 遊離体で小腸に到達すると推定された。

次に、遊離体をヒト小腸上皮モデルとして汎用される Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 透過試験に供した。2-および 3-MCPD はほぼ同様の速度で上皮側溶液に出現し、その輸送機序は単純拡散による透過と推測された。一方、腸管側に添加した MCPD エステル体は上皮細胞様膜を透過せず、上皮側溶液から検出されなかった。また、モノエステル体の一部は遊離体へと分解され上皮側溶液から検出された。従って、体内に摂取された MCPD ジエステルは膵リパーゼにより遊離体およびモノエステル体へと分解され、生じたモノエステル体の一部はさらに小腸上皮細胞にて遊離体に分解され吸収されるが、エステル体での吸収は起こらないと推察された。

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 11 件)

K. Koyama, K. Miyazaki, K. Abe, Y. Egawa, H. Kido, T. Kitta, T. Miyashita, T. Nezu, H. Nohara, T. Sano, Y. Takahashi, H. Taniguchi, H. Yada, K. Yamazaki, Y. Watanabe, Collaborative study of an indirect enzymatic method for the simultaneous analysis of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in edible oils. *J. Oleo Sci.*, 65(7), 557-568, (2016). 査読有

Naoki Kaze, Yomi Watanabe, Hirofumi Sato, Kaeko Murota, Miyako Kotaniguchi, Hiroshi Yamamoto, Hiroshi Inui, Shinichi Kitamura. Estimation of the intestinal absorption and metabolism behaviors of 2- and 3-monochloropropanediol esters. *Lipids*. 51(8), 913-922 (2016) 査読有

R. Hori, T. Sano, J. Imagi, Y. Watanabe, Effects of minor components of crude vegetable oil on the enzymatic method to analyze positional fatty acid distributions in triacylglycerols with *Candida antarctica* lipase B. *J. Oleo Sci.*, 65(11), 923-928 (2016). 査読有

K. Yoshinaga, S. Sato, R. Sasaki, M. Asada, R. Hori, J. Imagi, Y. Miyazaki, T. Nagai, K. Saito, T. Sano, A. Sasaki, C. Sato, Y. Tsukahara, A. Yamashita, S. Watanabe, Yomi Watanabe. The collaborative study on the enzymatic analysis of positional distribution of short- and medium chain fatty acids in milk fat using immobilized *Candida antarctica* lipase B. *J. Oleo Sci.*, 65(4), 291-302, (2016). 査読有

R. Sasaki, M. Umezawa, S. Tsukahara, T. Ishiguro, S. Sato, Y. Watanabe. Assignment of milk fat fatty acid propyl esters by GC-FID analysis with the fractionation of esters using Ag-ion solid phase extraction. *J. Oleo Sci.*, 64(12), 1251-1258, (2015). 査読有

K. Koyama, K. Miyazaki, K. Abe, K. Ikuta, Y. Egawa, T. Kitta, H. Kido, T. Sano, Y. Takahashi, T. Nezu, T. Nohara, T. Miyashita, H. Yada, K. Yamazaki, Y. Watanabe. Optimization of an Indirect Enzymatic Method for the Simultaneous Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and Glycidyl Esters in Edible Oils. *J. Oleo Sci.* 64(10), 1057-1064, (2015). 査読有

Yoshinaga, K.; Kawamura, Y.; Kitayama, Takashi; Nagai, Toshiharu; Mizobe, Hoyo; Kojima, Koichi; Watanabe, Yomi; Sato, Shinichi; Beppu, Fumiaki; Gotoh, Naohiro. Regiospecific distribution of trans-octadecenoic acid positional isomers in triacylglycerols of partially

hydrogenated vegetable oil and ruminant fat. *J. Oleo Sci.*, 64(6), 617-624, (2015). 査読有

Yomi Watanabe, Shinichi Sato, Mihoko Asada, Toshiharu Arishima, Yasuhiro Iida, Jun Imagi, Katsuyoshi Saito, Takashi Sano, Akiko Sasaki, Ryo Sasaki, Chiemi Sato, Tadahisa Shibuya, Yuki Tsukahara, Toshiharu Nagai, Toru Fukazawa, Ryuji Hori, Rika Homma, Yosuke Miyazaki, Atsushi Yamashita, Kazuaki Yoshinaga, Shimpei Watanabe. Enzymatic analysis of positional fatty acid distributions in triacylglycerols by 1(3)-selective transesterification with *Candida antarctica* lipase B: a collaborative study. *J. Oleo Sci.*, 64, 1193-1205, (2015). 査読有

Nakazawa, Masami; Andoh, Hiroko; Koyama, Keiichiro; Watanabe, Yomi; Nakai, Takeo; Ueda, Mitsuhiro; Sakamoto, Tatsuji; Inui, Hiroshi; Nakano, Yoshihisa; Miyatake, Kazutaka. Alteration of Wax Ester Content and Composition in *Euglena gracilis* with Gene Silencing of 3-ketoacyl-CoA Thiolase Isozymes. *Lipids*, 50(5), 483-492, (2015). 査読有

Watanabe, Yomi; Sato, Shinichi; Sera, Saiko; Sato, Chiemi; Yoshinaga, Kazuaki; Nagai, Toshiharu; Sato, Ryota; Iwasaka, Hiroaki; Aki, Tsunehiro. Enzymatic Analysis of Positional Distribution of Fatty Acids in Solid Fat by 1,3-Selective Transesterification with *Candida antarctica* Lipase B. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91(8), 1323-1330 (2014). 査読有

Sato, Hirofumi; Kaze, Naoki; Yamamoto, Hiroshi; Watanabe, Yomi. 2-Monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) Dynamics in DGF Standard Methods and Quantification of 2-MCPD. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 90(8), 1121-1130, (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

Naoki Kaze, Hirofumi Sato, Taro Kiso, Motohiro Shizuma, Kaeko Murota, Miyako Kotaniguchi, Shinichi Kitamura, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Estimation of digestion and intestinal absorbability of 2-, and 3-monochloropropane diol esters. The 18th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology. Kyoto, Japan. 15 Sep. 2015

Naoki Kaze, Hirofumi Sato, Kaeko Murota, Syun Kumamoto, Miyako Kotaniguchi, Shinichi Kitamura, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Identification of hydrolysates of 2-, and 3-MCPD esters by pancreas lipase and

estimation of their intestinal absorbability. 10th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Taichung, Taiwan, 30. Oct. 2014

Hirofumi Sato, Naoki Kaze, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Bidirectional conversion of monochloropropanediols (MCPDs) and glycidol in the course of indirect MCPD quantification method. 9th International symposium on biocatalysis and agricultural biotechnology. Piestany, Slovakia, 14 Oct. 2013.

Hirofumi Sato, Naoki Kaze, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Current status of MCPD/glycidol analysis in fats and oils. 17th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology. Hamburg, Germany. 27 July, 2013.

Yomi Watanabe, Sayuri Norito, Tsunehiro Aki, Araki Masuyama. Enzymatic PUFA concentration in single cell oil from *Aurantiocytium* sp. 12th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Hong Kong, Hong Kong, 7 Oct. 2016. (Invited)

Y. Watanabe, R. Hori, Y. Miyazaki, T. Nagai, K. Saito, T. Sano, A. Sasaki, R. Sasaki, S. Sato, C. Sato, T. Shibuya, Y. Tsukahara, A. Yamashita, K. Yoshinaga, S. Watanabe, R. Homma, J. Imagi, M. Asada. Applicability of a novel enzymatic method to the analysis of positional FA distribution in milk fat, 106th AOCs Annual Meeting and Industry Showcases, Orlando, USA, 5 May 2015.

Naoki Kaze, Hirofumi Sato, Kaeko Murota, Syun Kumamoto, Miyako Kotaniguchi, Hiroshi Inui, Shinichi Kitamura, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Digestion of 2-, and 3-MCPD esters by pancreas lipase and estimation of their intestinal absorbability 106th AOCs Annual Meeting and Industry Showcases, Orlando, USA, 4 May 2015.

Y. Watanabe, M. Asada, J. Imagi, K. Saito, A. Sasaki, R. Sasaki, S. Sato, C. Sato, T. Sano, T. Shibuya, T. Nagai, Yuki Tsukahara, R. Hori, R. Homma, Y. Miyazaki, A. Yamashita, K. Yoshinaga, S. Watanabe. Analysis of positional distribution of fatty acid in milk fat using a novel enzymatic method. Active Enzyme Molecule 2014, Toyama, Japan, 18, Dec. 2014.

Y. Watanabe, M. Asada, T. Arishima, Y. Iida, J. Imagi, K. Saito, R. Sasaki, S. Sato, C. Sato, T. Sano, T. Shibuya, T. Nagai, Y. Tsukahara, T. Fukazawa, R. Homma, Yo. Miyazaki, A. Yamashita, K. Yoshinaga, S. Watanabe. Results of the

collaborative study on the new enzymatic method analyzing FA composition at sn-2 of triacylglycerols. 1st Asian Conference on Oleo Science. Sapporo, Japan. 9. Sep. 2014.

M. Umezawa, R. Sasaki, T. Ishiguro, S. Sato, Y. Watanabe. Assignment of fatty acid propyl ester of milk fat using Ag-Ion SPE. 1st Asian Conference on Oleo Science. Sapporo, Japan. 8. Sep. 2014.

Yomi Watanabe, Mihoko Asada, Toshiharu Arishima, Yasuhiro Iida, Jun Imagi, Katsuyoshi Saito, Ryo Sasaki, Shinichi Sato, Chiemi Sato, Takashi Sano, Tadahisa Shibuya, Toshiharu Nagai, Yuki Tsukahara, Toru Fukazawa, Rika Homma, Yosuke Miyazaki, Atsushi Yamashita, Kazuaki Yoshinaga, Shimpei Watanabe. New enzymatic method to determine FA composition at sn-2 of triglycerides. Results of the collaborative study. 105th AOCS Annual Meeting and Expo. San Antonio, USA. 7 May 2014.

Naoki Kaze, Hirofumi Sato, Hiroshi Yamamoto, *Yomi Watanabe. Hydrolysis of 2-MCPD di-esters by porcine pancreas lipase. 105th AOCS Annual Meeting and Expo. San Antonio, USA. 6 May 2014.

Yomi Watanabe, Toshiharu Nagai, Shinichi Sato, Saiko Sera, Chiemi Sato, Ryota Sato, Tsunehiro Aki. Regiospecific analysis of solid fats by a novel enzymatic method. 104th AOCS Annual Meeting and Expo. Montreal, Canada, 1. May, 2013.

Hirofumi Sato, Naoki Kaze, Hiroshi Yamamoto, Daisuke Ono, Motohiro Shizuma, Yomi Watanabe. Interconversion Between Monochloropropanediol and Glycidol in the Course of DGF Standard Method C-VI 18 104th AOCS Annual Meeting and Expo. Montreal, Canada, 30. Apr. 2013.

室田佳恵子、平野明伽音、渡辺嘉、大久保剛。食事性リン脂質の構成脂肪酸が腸管吸収過程における消化性に及ぼす影響 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 19 日(京都)

渡辺嘉、風直樹、佐藤博文、室田佳恵子 MCPD 脂肪酸エステルの分解・吸収性の推定 日本油化学会第 55 回年会 2016 年 9 月 7 日(奈良)

風直樹・渡辺嘉・室田佳恵子・熊本舜・佐藤博文・小谷口美也子・山本浩志・乾博・北村進一 隣りパーゼによる 2-および 3-MCPD エステルの分解産物の同定と吸収性 第 53 回日本油化学会年会 2014 年 9 月 9 日(札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 嘉 (WATANBE, Yomi)
(地独)大阪市立工業研究所
生物・生活材料研究部 研究主任
研究者番号：60416310

(2) 研究分担者

佐藤 博文 (SATO, Hirofumi)
(地独)大阪市立工業研究所
生物・生活材料研究部 研究員
研究者番号：70443546

室田 佳恵子 (MUROTA, Kaeko)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号：40294681

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

風直樹 (KAZE, Naoki)
植田製油株式会社