

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20179

研究課題名(和文) ラベル化同位体を用いた多価不飽和脂肪酸過酸化物の体内動態視覚化技術の開発

研究課題名(英文) Development of the visualization technique of isotope labeled PUFA hydroperoxides distribution and metabolism in the mouse body

研究代表者

吉永 絢(桐明絢)(Yoshinaga (Kiriake), Aya)

福島大学・食農学類・客員准教授

研究者番号：20794845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多価不飽和脂肪酸(PUFA)は酸化され易く、PUFA過酸化物となり、食中毒原因となる二次酸化物を生成する。しかし、PUFA過酸化物自体を摂取した際の人体への影響は不明なため、PUFAのうち、リノール酸過酸化物の体内動態視覚化を目指し、まずは体燃焼性を調べた。合成した安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステル(*LAEE)を光酸化し、*LAEE過酸化物(*LAEE-OOH)を合成した。これを、マウスに投与、呼吸を回収し、*LAEE-OOHと*LAEEの体燃焼性を比較した。その結果、*LAEE-OOHは*LAEEより体燃焼性が高く、*LAEE-OOHが胃で分解されて酸化されると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、リノール酸過酸化物の体内動態の一部を明らかにすることができ、リノール酸過酸化物は、胃で分解をされた後に酸化されること、未酸化物より体内に蓄積されにくいことが示唆された。本研究のように、PUFA過酸化物の体内動態を解明する一連の研究が推進されれば、どの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、悪影響を及ぼす過酸化物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)：Polyunsaturated fatty acid (PUFA) hydroperoxides are produced by automatic oxidation and photo-oxidation of PUFA, and are oxidized to secondary oxides causing food poisoning. However, the effects of ingestion of PUFA hydroperoxides in human body are unknown. We aimed to develop the visualization technique of isotope labeled PUFA hydroperoxides distribution and metabolism in the mouse body. In this study, the catabolic rates of synthesized ¹³C-labeled ethyl linoleate hydroperoxides (*LAEE-OOH) and ethyl linoleate (*LAEE) in the mouse were compared using isotope ratio mass spectrometry to elucidate the metabolism of linoleic acid (LA) hydroperoxide. The catabolic rate of *LAEE-OOH was significantly higher than that of *LAEE in the mouse. The results suggested that LA hydroperoxide could be hydrolyzed by the gastric acid, and then -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 リノール酸 リノール酸過酸化物 呼吸 体内動態 同位体比質量分析計 体燃焼性

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

(1) 食品に含まれる多価不飽和脂肪酸の酸化による食中毒

脂質を構成する多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は酸化を受けやすい。そのため、食品を高温下や光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)。1965 年・夏に日本全国で発生した大規模な即席めん食中毒事件は、小売販売店の軒先で展示されていた即席めん中の PUFA が酸化し、多量の脂質酸化物が即席めん中に蓄積したことに起因している。食品衛生法では、即席めん の規格に過酸化価値 : 30 meq/kg 以下という規格が設定されている。

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ている。例えば、4-ヒドロキシ-2-ノネナルや 4-ヒドロペルオキシ-2-ノネナルが脂質酸化に起因する食中毒の原因物質として報告されている。これらの物質は、ヒト体内においてリジンのアミノ残基とシッフ塩基を容易に形成する。この反応により、体内の各種タンパク質の高次構造が破壊され、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も知られている。

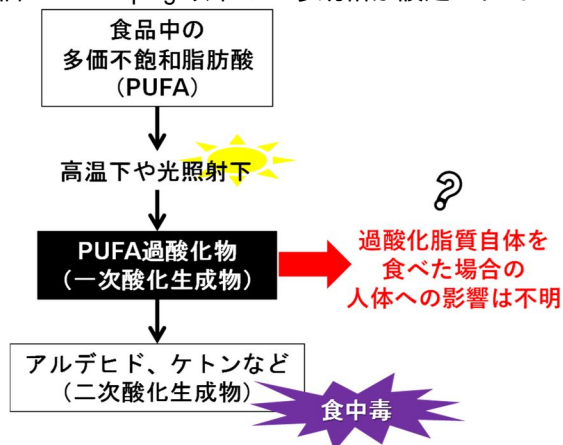


図 1 PUFA の酸化による食中毒発生機構

(2) PUFA 過酸化物の体内動態

その一方で、PUFA 過酸化物の体内動態に関してはほとんど研究が進んでいない。過酸化物は食品中に少なからず含まれるが、それを摂取しても、体内に存在する還元酵素により脂質アルコール化物へ変換されるため、生体にとって大きな問題はないと考えられている。実は、PUFA 過酸化物の摂取後の体内代謝に関しては、アルコール化物への変換まではよく知られているが、

- ・過酸化物やアルコールが体内のどの臓器・組織に蓄積するのか、
- ・もしくは再び PUFA の形に戻されて体内で PUFA として臓器・組織に蓄積されるのか、
- ・通常の PUFA と同じように体内で代謝 (体燃焼) されるのか、

などの知見は全く得られていない。

2. 研究の目的

これまで、PUFA 過酸化物は食品中に存在する二次酸化生成物の出発物質として、よく理解されてきた。しかし、PUFA 過酸化物自体の体内動態を精査した研究は存在せず、PUFA 過酸化物を摂取した際の人体への影響は不明である。よって本研究では、各種 PUFA 過酸化物の体内動態を視覚化することを研究の目的とした。

そこで本研究では、PUFA 過酸化物の体内での動きと、その裏側に位置する PUFA 過酸化物の体燃焼性の二面より投与した PUFA 過酸化物の動きを観察することとした。投与した PUFA 過酸化物を内在性 (もともと体内に存在) のものと区別するために、本研究では安定同位体でラベル化された PUFA を用いることとした。安定同位体でラベル化された PUFA は、天然に存在する PUFA と構造は同じだが、分子量が異なる。例えば、図 2 に記したリノール酸は、安定同位体で 3ヶ所が置換されていることから、天然のリノール酸より分子量が 3 つ大きく、質量分析計で区別することが可能である。よって、安定同位体でラベル化された PUFA 過酸化物をマウスへ投与すれば、各種臓器・組織における PUFA 過酸化物の存在を、さらに呼気中に出現した安定同位体ラベル化二酸化炭素量を測定することで体燃焼性を質量分析計で定性・定量的に確認可能となる。

本研究では、合成を予定していた PUFA のうち、比較的安価で入手しやすいリノール酸を安定同位体 (^{13}C) でラベルし、酸化させることで、安定同位体ラベル化リノール酸過酸化物を合成した。そして最初にこれをマウスに経口投与し、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リノール酸過酸化物と安定同位体ラベル化リノール酸の体燃焼性を比較・検討した。



※通常、リノールの構造を表す際に「H」や「 ^{13}C 」のような記し方をしないが、安定同位体ラベル化リノール酸との違いが分かるよう、この図中では記した。

図 2 安定同位体ラベル化リノール酸およびリノール酸過酸化物の構造

3. 研究の方法

(1) 安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステルの合成

リノール酸を 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リノール酸エチルエステル ($^1\text{LAEE}$) を得た。

(2) 安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステル過酸化物の合成

加熱による酸化

合成した $^1\text{LAEE}$ をエタノールに溶解させ、そこに 1% となるように α -トコフェロールを添加し、60 で酸化し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) に供し、酸化物の確認を行った。

光酸化

合成した $^1\text{LAEE}$ 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ろ過することで、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リノール酸エチルエステル過酸化物 ($^1\text{LAEE-OOH}$) を合成した。

(3) マウス呼気による体燃焼性の分析

最初に、PUFA 過酸化物の体燃焼性に関する研究を実施した。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 ($^{13}\text{CO}_2$) が発生する。この $^{13}\text{CO}_2$ の発生量を測定することにより、リノール酸過酸化物の体内燃焼性を精査した。つまり、 $^1\text{LAEE-OOH}$ または、コントロールとして $^1\text{LAEE}$ を乳化し、これを 4 週齢 ICR マウス () へ強制経口投与 (1 日 2 回、10 mL/kg body) 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、 $^{13}\text{CO}_2$ 発生量を IR-MS で測定した。

4. 研究成果

(1) 安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステル ($^1\text{LAEE}$) の合成

約 1 g の $^1\text{LAEE}$ を合成した。

(2) 安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステル過酸化物 ($^1\text{LAEE-OOH}$) の合成

加熱による酸化

まずは、加熱による $^1\text{LAEE-OOH}$ の合成を検討したが、目的物を得ることができなかった。60 で加熱したために、酸化反応が進み過ぎて、 $^1\text{LAEE}$ が 2 次酸化生成物になってしまったと推測した。

光酸化

続いて、照射下における酸化反応によって、 $^1\text{LAEE-OOH}$ を合成する方法を検討した。その結果、0.15 g の $^1\text{LAEE-OOH}$ を得ることができた。

(3) マウス呼気による安定同位体ラベル化リノール酸エチルエステル過酸化物 ($^1\text{LAEE-OOH}$) の体燃焼性の検討

$^1\text{LAEE-OOH}$ または、コントロールとして $^1\text{LAEE}$ をマウスに強制経口投与し、呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 発生量を比較した。その結果、コントロールである $^1\text{LAEE}$ 投与群と比較して、 $^1\text{LAEE-OOH}$ 投与群では投与 105 分後まで ^{13}C の値が有意に高くなった (図 3)。

また、投与後 6 時間の間に得られた ^{13}C (%) の値を積分した曲線下面積 (Area under the curve) を図 4 に示した。リノール酸過酸化物は、リノール酸に比べて燃焼量が有意に多かった。

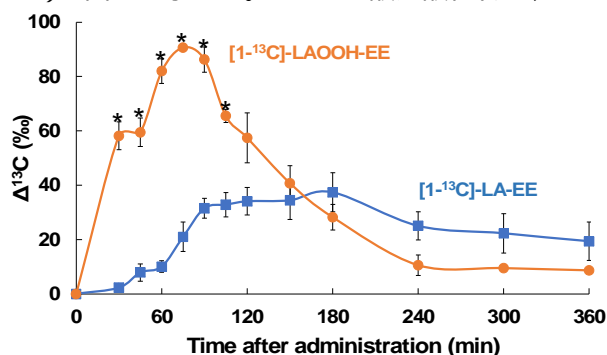


図 3 安定同位体ラベル化リノール酸およびリノール酸過酸化物投与後、呼気中に排出された ^{13}C (%) の値

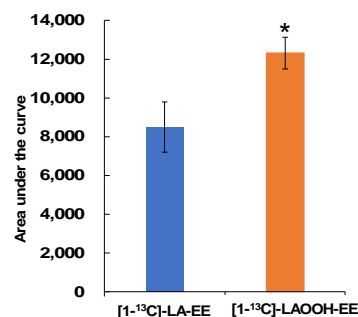


図 4 Area under the curve

これらの結果から、リノール酸過酸化物は胃酸によって加水分解され、カルボキシル基側の側鎖が酸化されたと推測される (図 5)。口から体内に取り込まれたリノール酸過酸化物はリノール酸より体内に蓄積されにくいことが示唆された。

本研究結果により、リノール酸過酸化物の体内動態の一部を明らかにすることができ、体内に蓄積されにくいことが示唆された。本研究のように、安定同位体ラベル化 PUFA 過酸化物を自ら合成し、さらに質量分析機器を用いて体内動態を精査する研究を実施可能な研究者は、国内外に存在しないことから、非常に独自性が高い研究であると言える。また、本研究によって PUFA 過酸化物の体内動態を解明する一連の研究が推進されれば、どの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。

今後は、リノール酸過酸化物が胃または腸から吸収された後の体内動態を検討し、イメージング質量分析計にて可視化していく。また、リノール酸過酸化物だけでなく、DHA や EPA といった他の PUFA 過酸化物の体内動態解明にも着手していく予定である。

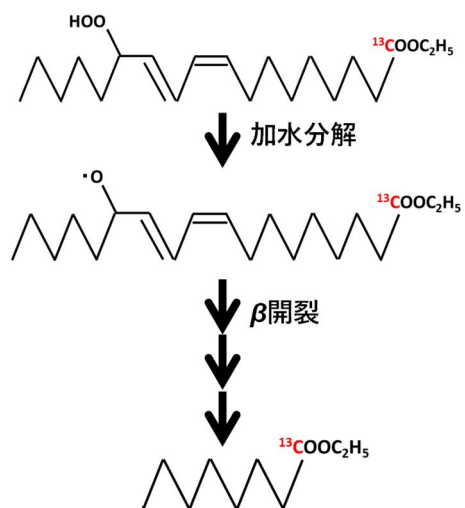


図 5 推定分解経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------