

<令和4年度助成>

過酸化脂質の体内動態の解明

桐明 絢

(福島大学 食農学類)

1. 背景および目的

脂質を構成する EPA やリノール酸などは多価不飽和脂肪酸 (PUFA) と総称され、中でもエイコサペンタエン酸 (EPA) は、体内で合成される局所ホルモンの出発材料で、サプリメントや健康食品に添加される認知度の高い脂質であり、抗酸化、抗炎症作用、心血管疾患リスクの軽減が報告されている。

しかし、PUFA は構造中に二重結合を有するために酸化されやすく、食品を高温下や光照射下などで保管すると、過酸化脂質 (PUFA 過酸化物、一次酸化生成物) が生成される。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、食中毒を引き起こすと考えられている (図 1)。また、生体内の PUFA も酸化を受けることが知られており、

様々な疾病 (アテローム性動脈硬化症、糖尿病やアルツハイマー病など) に関与していることが示唆されている^{1,2)}。

その一方で、PUFA 過酸化物自体の体内動態に関してはほとんど研究が進んでいない。そのため、食事として摂取した EPA 過酸化物は体内に吸収されるのか、どのように代謝されるのかは未だ分かっていない。

そこで本研究では、食事で摂取した EPA 過酸化物のヒト体内における動態を解明することを目的とし、我々が有している技術を駆使し、本研究においては EPA 過酸化物の体燃焼性を精査した。つまり、安定同位体 (¹³C) でラベル化した 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 ¹³C の

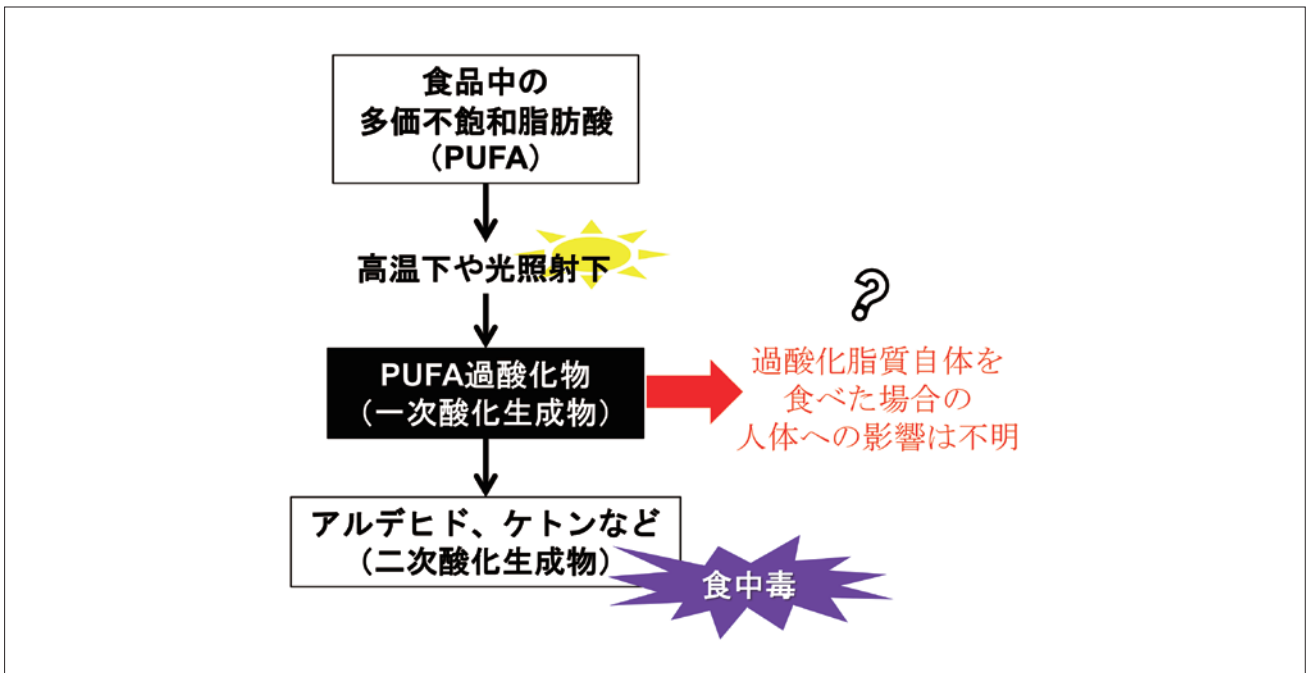


図1 PUFAの酸化による食中毒発生機構

量を測定することで、安定同位体ラベル化 EPA 過酸化物の体燃焼性を、未酸化の EPA と比較し、検討した。さらに、ヒト胃内を想定し、合成した EPA 過酸化物を塩酸で処理した後、分解物の構造をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC/MS) で明らかにした。

2. 研究方法

2-1 安定同位体ラベル化 EPA エチルエステル過酸化物 (*EPA-EE-OOH) の合成

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 EPA エチルエステル (*EPA-EE) を得た。合成した *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°C、24 時間) し光酸化を行った。その後、シリカゲルを用いて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。これを精製し、安定同位体ラベル化 EPA エチルエステル過酸化物 (*EPA-EE-OOH) を合成した。

2-2 マウス呼気による体燃焼性の分析

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、*EPA-EE-OOH の体内燃焼性を精査した。つまり、*EPA-EE-OOH または、コントロールとして *EPA-EE を乳化し、これを 4 週齢 ICR マウス (♂) へ強制経口投与 (16 $\mu\text{mol}/20\text{ g body weight}$) 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、 $^{13}\text{CO}_2$ 発生量を IR-MS で測定した。

2-3 EPA-EE-OOH の酸による分解試験

EPA をエチルエステル化して EPA-EE を合成した後、2-1 と同様の方法で EPA-EE-OOH を合成した。合成した EPA-EE-OOH にヒト胃内を想定して 0.2 M HCl (pH1) 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。

3. 研究成果

3-1 *EPA-EE-OOH の合成

約 1 g の *EPA-EE を合成し、*EPA-EE の照射下における酸化反応によって、0.3 g の *EPA-EE-OOH を得た (図 2、EPA-EE-OOH には構造異性体が存在するため一例を示した)。

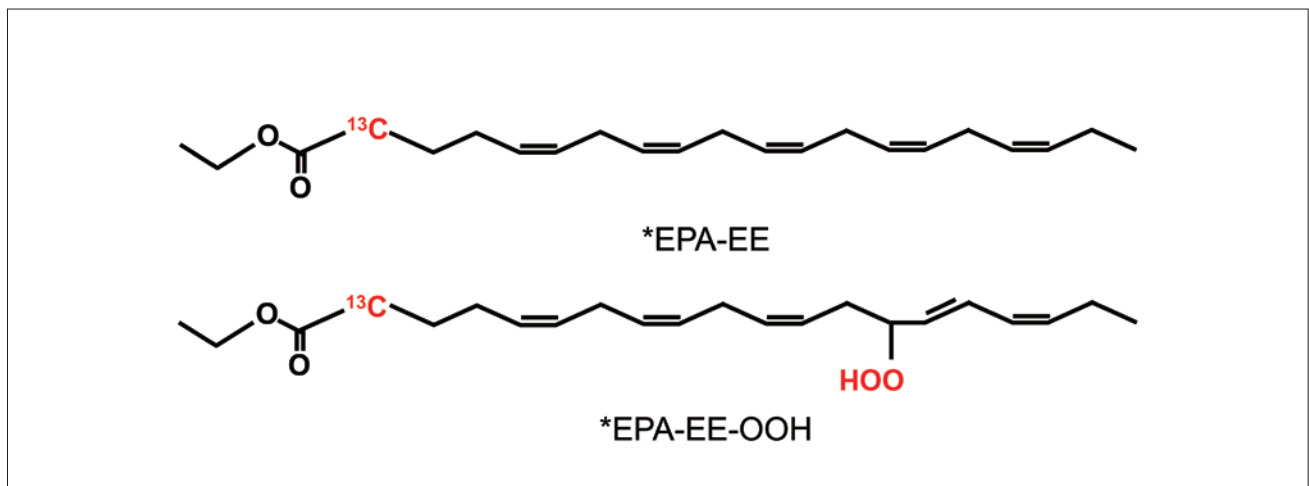


図 2 *EPA-EE および *EPA-EE-OOH の構造 (EPA-EE-OOH には様々な異性体が存在するため、一例として 5Z, 8Z, 11Z, 15E, 17Z-EPA-EE-14OOH を示した)

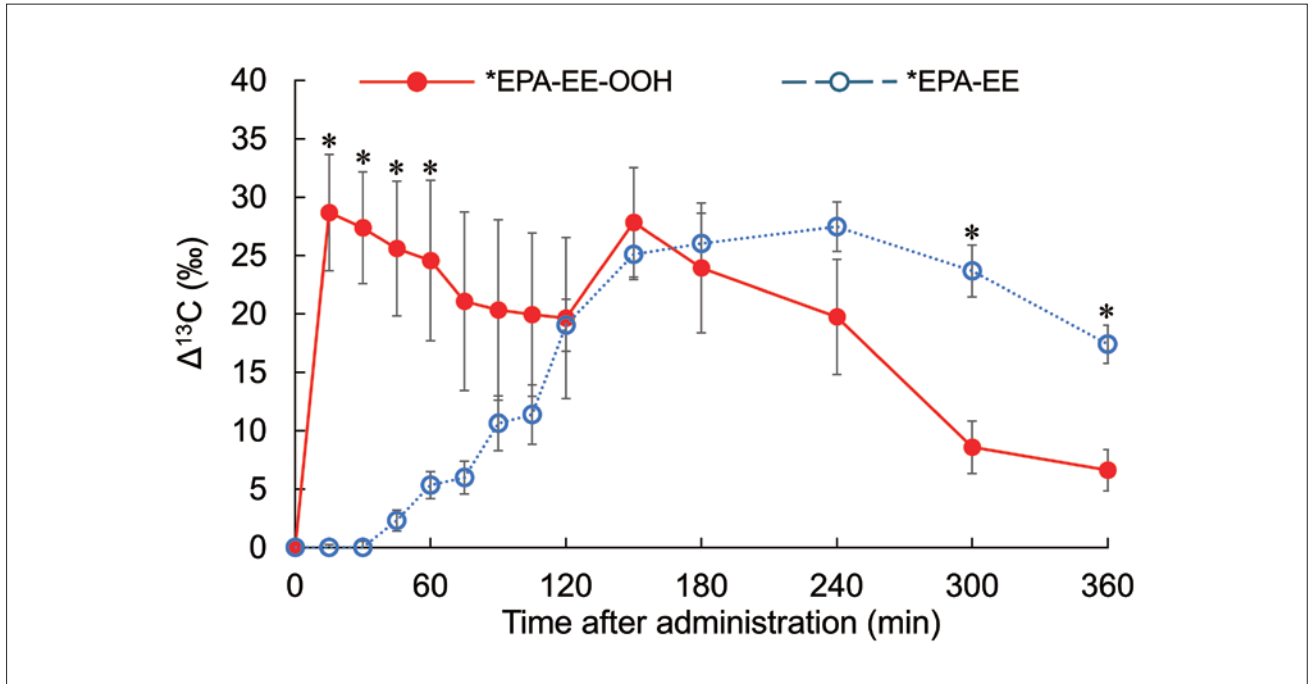


図3 *EPA-EE-OOH および *EPA-EE 投与後に呼気中に排出された $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) の値の比較
n=6 で測定した。*は有意差 ($p < 0.05$) を示す。

3-2 マウス呼気による *EPA-EE-OOH の体燃焼性の検討

*EPA-EE-OOH または、コントロールとして *EPA-EE 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 *EPA-EE 投与群と比較して、*EPA-EE-OOH 投与群では投与後 30～60 分まで呼気中の $\Delta^{13}\text{C}$ の値が有意に高くなった (図 3) 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、*EPA-EE-OOH と *EPA-EE 投与群どちらの場合でも、呼気中の $\Delta^{13}\text{C}$ 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 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) の値を積分した曲線下面積 (Area under the curve、図 4) においては、燃焼量に差はみられなかった。曲線下面積をみると、EPA-EE-OOH と EPA-EE 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、*EPA-EE-OOH 投与群の 30～60 分において呼気中の $\Delta^{13}\text{C}$ 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 β 酸化を受けて代謝されていると推測できる。

*EPA-EE-OOH 投与群では投与後 30～60 分まで

呼気中の $\Delta^{13}\text{C}$ 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 (オクタン酸やデカン酸など) となって肝臓で β 酸化されている可能性が考えられる。過去の研究において摂取したオレイン酸過酸化物が

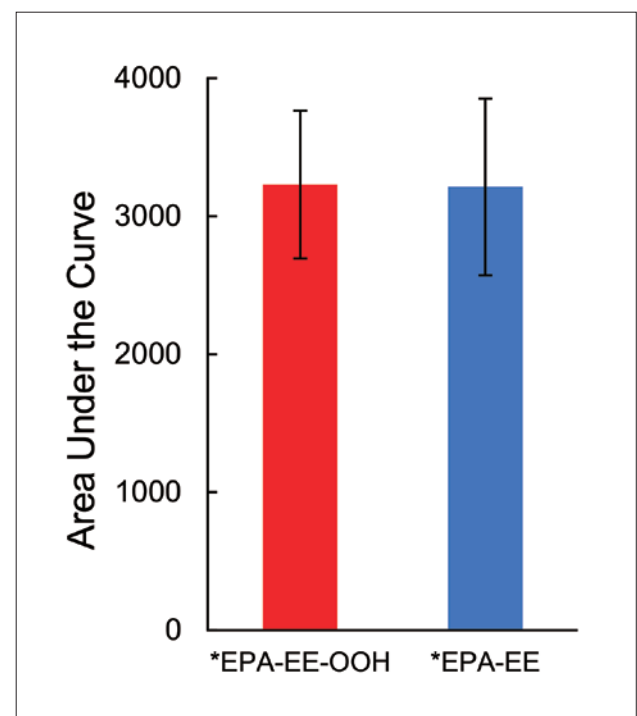


図4 図3から算出した *EPA-EE-OOH および *EPA-EE の曲線下面積の比較

結合したトリアシルグリセロールは、過酸化脂質としては腸管から吸収されないことが示唆されている¹⁾。また、中鎖脂肪酸であるオクタン酸は、長鎖脂肪酸であるパルミチン酸より代謝(β酸化)が早いことが報告されている³⁾。これらの報告を加味すると、過酸化脂質は胃液で分解され、中鎖脂肪酸やアルデヒドとして代謝されていると予測される。そ

こで、胃酸を想定した塩酸による EPA-EE-OOH の分解試験を行った。

3-3 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 5 のように Butanoic acid ethyl ester、Decadienoic acid ethyl

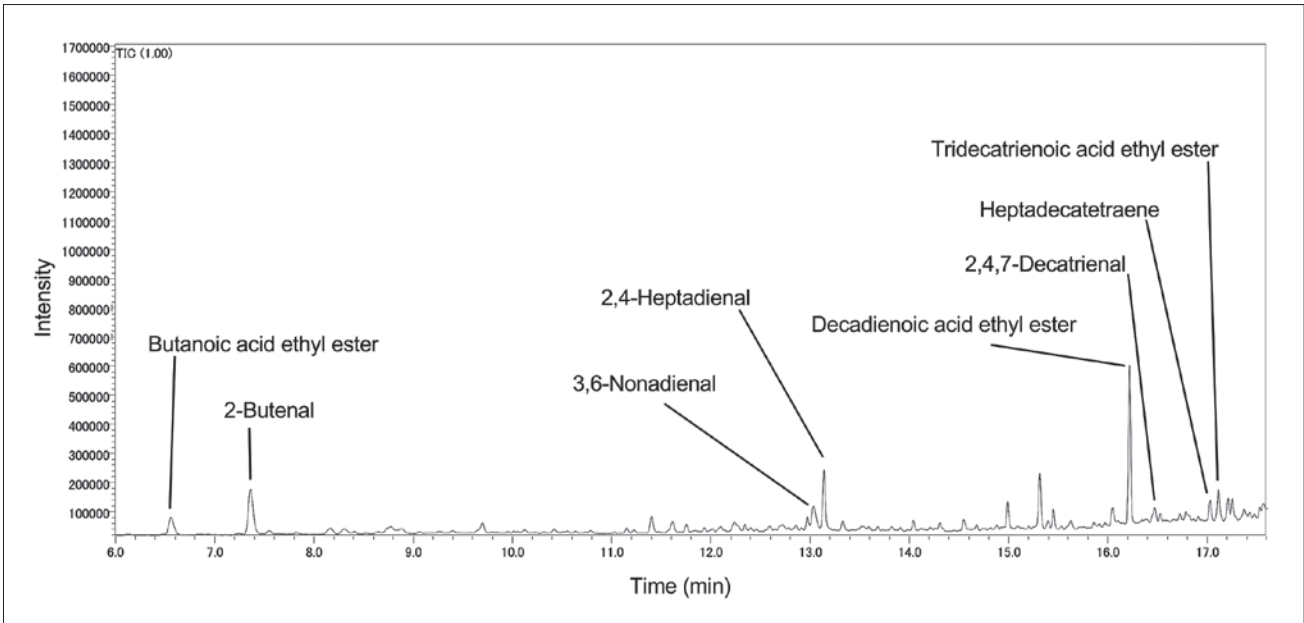


図 5 EPA-EE-OOH 酸分解物の GC-MS クロマトグラム

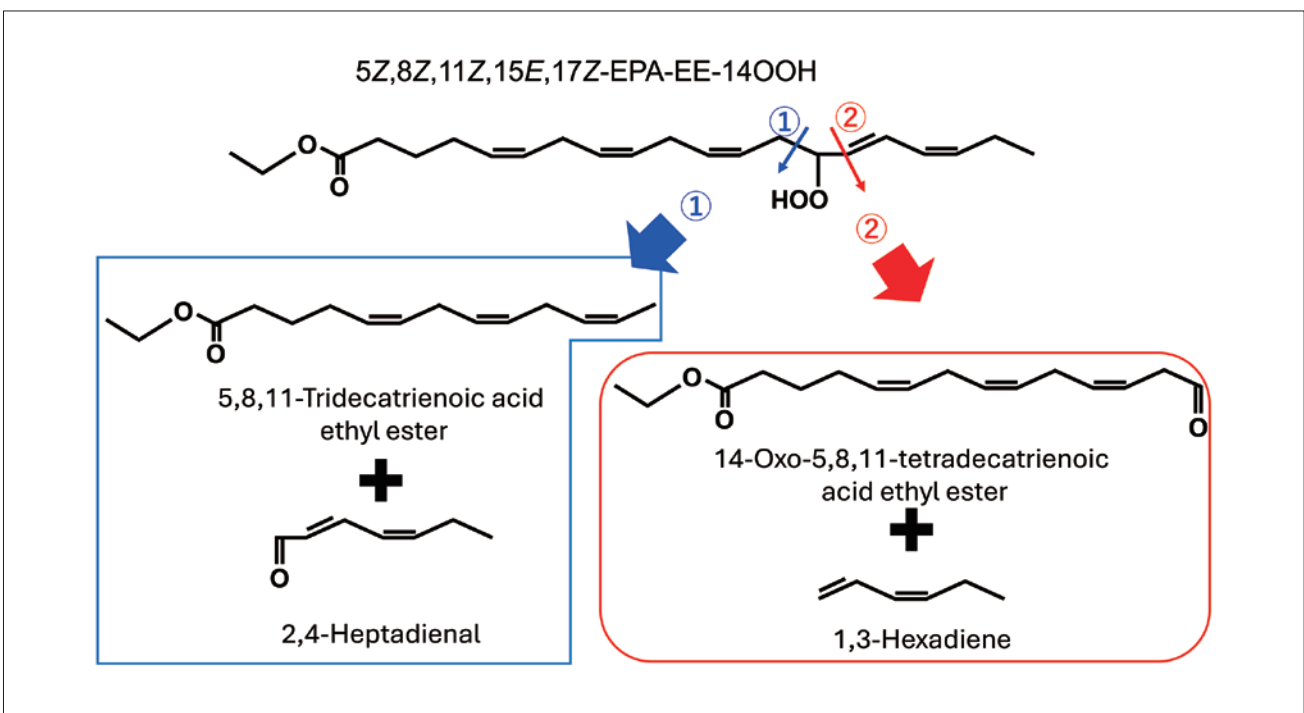


図 6 EPA-EE-OOH の酸分解によって得られる分解物の一例

ester、Tridecatrienoic 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（例えば図 6 のように①と②の位置で分解される）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、*EPA-EE-OOH 投与群で投与後 30 ～ 60 分まで呼気中の $\Delta^{13}\text{C}$ の値が有意に高くなった可能性が示唆された。

4 まとめ

本研究結果により、EPA-EE-OOH が胃酸で分解され、一部が肝臓での β 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-EE-OOH が分解され、分解物が肝臓で β 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-EE-OOH が胃でどのくらい分解されるのか、小腸から直接 EPA-EE-OOH を吸収した場合の体内動態、EPA-EE-OOH 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。また、多価不飽和脂肪酸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、どの脂質過酸化物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。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Takahashi et al., Dietary triacylglycerol hydroperoxide is not absorbed, yet it induces the formation of other triacylglycerol hydroperoxides in the gastrointestinal tract. *Redox Biology* 57, 102471 (2022).
- 2) Negre-Salvayre et al., Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 44, 1125–1171 (2010).
- 3) Shibata et al., Comparison of catabolism rate of fatty acids to carbon dioxide in mice. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 1340–1344 (2012).

Elucidation of the pharmacokinetics of fatty acid hydroperoxide

Aya YOSHINAGA-KIRIAKE

Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University

Unsaturated fatty acids, such as linoleic acids, linolenic acid, and eicosapentaenoic acid (EPA) are easily oxidized by exposure to temperature and light in the presence of air to form unsaturated fatty acid hydroperoxides as primary oxidation products. However, the catabolic rates of unsaturated fatty acid hydroperoxides in the human body remain unknown. In this study, to elucidate the effects of ingestion of lipid hydroperoxides in the human body, ethyl esters of ^{13}C -labeled EPA (*EPA-EE) and their hydroperoxides (*EPA-EE-OOH), prepared via photo-oxidation of *EPA-EE, were administered to mice and their catabolic rates were determined by measuring the expired $^{13}\text{CO}_2$ levels using isotope-ratio mass spectrometry.

Although the catabolic rate of *EPA-EE-OOH was faster than that of *EPA-EE in the mouse, there were no significant differences in the total amount of catabolism between *EPA-EE-OOH and *EPA-EE. In particular, the rapid β -oxidation of *EPA-EE-OOH was similar to that of medium-chain fatty acids, such as octanoic acid. Afterwards, the degradation products of EPA-EE-OOH were analyzed under gastric conditions via gas chromatography/mass spectrometry. It was shown that EPA-EE-OOH was decomposed into medium-chain fatty acids and aldehydes via treatment with hydrogen chloride, indicating that EPA-EE-OOH isomers formed during photo-oxidation were decomposed under acidic conditions.

These findings support previous reports that dietary lipid hydroperoxides are not absorbed in the intestine as lipid hydroperoxides, but as degradation products. This is an important study that suggests that dietary lipid hydroperoxides are decomposed during gastric digestion, to form medium-chain compounds that are directly absorbed into the liver via the portal vein and rapidly catabolized via β -oxidation.