

## 学位論文題名

## 高度不飽和脂質の水溶液中での酸化安定性に関する研究

## 学位論文内容の要旨

脂質は三大栄養素のひとつで、効率的なカロリー源として重要なだけでなく、脂質を構成する脂肪酸には、それぞれ特有の生理機能がある事が知られている。特に、Eicosapentaenoic acid (EPA) や Docosahexaenoic acid (DHA) は、学習能向上、網膜反射能向上、血圧降下作用などを有することから大変注目されている。しかし、EPA や DHA は分子中に多くの二重結合を有するため、空気中では極めて酸化されやすく、この酸化されやすさが EPA や DHA を食品、あるいは薬品に利用する際の最大の問題となってきた。一方、このような著しい酸化安定性の低さにもかかわらず、EPA や DHA は各種生物中に広く分布しており、それ程酸化されることなくその機能を発揮している。生体内脂質過酸化に対する効果的な防御機構としては、ビタミン E などの抗酸化物質や、生じた過酸化物に対する分解、還元酵素などの働きが知られているが、このような防御系のみで EPA や DHA の酸化が完全に抑制されているとは考え難く、生体内では EPA や DHA などに特異的な酸化防御機構の存在が予想できる。そこで本研究では、生体における、EPA や DHA に特異的な酸化防御機構の解明を目的として、以下の検討を行った。

① 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の水溶液中での酸化安定性：まず始めに、PUFA が、通常、生体内で水を媒体として他の様々な成分と共存している事に着目し、水系での PUFA の酸化安定性の特徴を検討した。その結果、代表的な 6 種類の PUFA の Tween 20 含有緩衝溶液中での酸化安定性は、空気中とは全く異なり、DHA (22:6n-3) > EPA (20:5n-3) > アラキドン酸

(20:4<sub>n-6</sub>) > α-リノレン酸(18:3<sub>n-3</sub>) > γ-リノレン酸

(18:3<sub>n-6</sub>) > リノール酸(18:2<sub>n-6</sub>) の順となることを初めて明らかにした。この順序は、水系では不飽和度の高いもの程酸化されにくく、また、n-3系不飽和脂肪酸の方がn-6系のそれより安定である事を示していた。

②水溶液中でのPUFAの分散形態とその酸化安定性との関係：次に、このようなPUFAの水溶液中での独特な酸化挙動についてさらに詳しく探るため、形成される分散粒子の大きさが異なる4種類の乳化剤を用いてDHAとリノール酸の水溶液中での酸化安定性について検討するとともに、NMRを用いてこれら脂肪酸の水溶液中とクロロホルム中での、酸化にかかわる水素(ビスアリル水素とオレフィン水素)のケミカルシフトについて分析を行った。その結果、DHAでは分散粒子が小さい程酸化安定性が向上するのに対して、リノール酸では分散粒子が大きい程酸化されにくくなることが明らかとなった。また、リノール酸(n-6系、二重結合：2個)は重クロロホルム中と重水中で、ビスアリル水素とオレフィン水素のケミカルシフトの位置に全く変化は認められなかったが、DHA(n-3系、二重結合：6個)では重水中のケミカルシフトの位置がいずれの水素とも高磁場側へシフトした。この結果から、DHAは水溶液中で、これらの水素同士が水素結合などの何らかの相互作用によって会合していることが推測された。以上より、水溶液中でPUFAの酸化安定性が空気中と異なった理由として以下のように考えられた。すなわち、水溶液中ではPUFAはミセルのような一定の規則正しい分子配列をとって分散するが、特にDHAでは、プロトンNMRで示されたように、酸化に関係するビスアリル水素やオレフィン水素が何らかの相互作用によって会合し、その結果、二重結合を外にさらさないような、よりコンパクトな構造をとっているものと考察された。このような相互作用は、二重結合数が多いn-3系PUFA程強くなり、またこの作用によって形成される構造は、酸化を引き起こすラジカルや酸素の攻撃を受けにくいため、DHAは水溶液中では非常に酸化されにくくなるものと推測した。

③ リン脂質の水溶液中での酸化安定性：一般に生体内において、PUFAは主にリン脂質のアシル基に組み込まれて存在する事が多い。特に、リン脂質は生体膜を形成する主たる構成成分であり、PUFAは生体膜脂質の主要構成脂肪酸として膜機能の発現に関与している。また、リン脂質は食品に広く用いられているレシチン中に多量に含まれているだけでなく、DHA含有リン脂質の形態が生体に対して様々な特有の活性を有する事が知られており、薬品としての利用も期待されている。したがって、リン脂質の水系での酸化安定性は生体内脂質過酸化を論ずる上で、あるいは食品や薬品へのこれらリン脂質の利用を考える上で重要である。そこで、DHAやリノール酸などのPUFAを主要構成脂肪酸とする3種類のPhosphatidylcholine (PC)の水系(ミセルとリポソーム)での酸化安定性について検討した。その結果、ミセルではDHAやEPAを多く含むサケ卵PCが最も酸化されにくく、次いで鶏卵PC、大豆PCの順となった。一方、生体膜モデルであるリポソームでは、リノール酸を主要構成脂肪酸とする大豆PCが最も酸化されやすい点ではミセルと同じであったが、鶏卵PCとサケ卵PCで酸化安定性に差は認められなかった。ミセルでは遊離脂肪酸の場合と同じように、DHAやEPAを多く含むPC程、酸化されにくい立体構造をとって分散しているために、サケ卵PCの酸化安定性がミセルでは最も高くなったものと考察された。また、サケ卵PCや鶏卵PCの主要分子種は

1-16:0, 2-PUFAs-PCと考えられるが、このような分子種は大豆PCで主要な1, 2-di18:2n-6(LA)-PCよりも、非常に密で隙間の無い立体構造をとるため、リポソームではサケ卵PCや鶏卵PCは大豆PCよりも酸化されにくかったものと推測された。このような考えはアシル基位置が既知の、1-16:0, 2-LA-PC、

1-16:0, 2-DHA-PC、1, 2-diLA-PC、1, 2-diDHA-PCを用いた酸化安定性の検討結果からも支持された。

④ リポソームの酸化安定性向上とその利用：次にPCリポソームの酸化に対する各種成分の影響について検討した。その結果、鶏卵アルブミンと大豆タンパク質を添加することによって、各リポ

ソームの酸化が抑制されたが、これらタンパク質のリポソームに対する酸化抑制効果には基質特異性が認められ、鶏卵アルブミンは鶏卵PCの、大豆タンパクは大豆PCの酸化をより効果的に抑制することがわかった。これは、各種タンパク質のリポソームへの吸着能力の差によるものと考察された。また、リポソームの酸化安定性は、コレステロールや電荷剤の添加、リポソームの形態やトコフェロール及びタンパク質濃度によっても影響を受けることが明らかとなった。さらに、リポソーム中にDHA含有トリグリセリド(TG)を封入した場合、サケ卵PCリポソームを用いた時にTG及びPCの酸化安定性が最も高くなることもわかり、リポソーム素材としてのサケ卵PC利用の可能性が示された。

本研究で初めて明らかにされた水系での各PUFAの酸化安定性に関する特性は、限られた実験条件下での結果ではあるが、少なくとも水系ではPUFAの酸化挙動が空気中でのそれと大きく異なる事は確かであり、このような結果は生体内脂質過酸化を考察する上で重要な知見となるものである。また、本研究で得られた成果は、EPAやDHAを含む食品あるいは薬品の酸化安定性向上を図る上で有益であり、適切な乳化剤や脂質の分散形態及び酸化防止剤を選択することで、EPAやDHAに特異的で新たな酸化防止法の確立が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 太 田 亨  
副 査 教 授 高 間 浩 蔵  
副 査 助 教 授 宮 下 和 夫

## 学位論文題名

### 高度不飽和脂質の水溶液中での酸化安定性に関する研究

ヒトにとって重要な生理作用を有するエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの海洋脂質成分は、空気中では極めて酸化されやすいが、生体中ではそれほど酸化されることなくその機能を発揮している。生体内脂質過酸化に対する防御機構としては、ビタミンEなどの抗酸化物質や、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素の働きが知られているが、このような防御系のみでEPAやDHAの酸化が完全に抑制されているとは考え難い。したがって、生体内では、EPAやDHAに特異的な、これまで明らかにされていない酸化防御機構の存在が予想される。本研究では、高度不飽和脂質が生体中で通常水を媒体として他の様々な成分と共存している点に着目し、水溶液中での高度不飽和脂質の酸化安定性について検討することにより、EPAやDHAを始めとする各種不飽和脂質の生体内での酸化安定性を明らかにしようとしたものであり、得られた主な成果は以下のように要約される。

1. 水溶液中での高度不飽和脂肪酸の酸化安定性は空気中とは全く逆に、不飽和度の高いものほど安定となることを初めて明らかにした。また、n-3系不飽和脂肪酸はn-6系不飽和脂肪酸よりも酸化されにくいことも示した。したがって代表的な6種高度不飽和脂肪酸の水溶液中での酸化安定性は、DHA (22:6n-3) > EPA (20:5n-3) > アラキドン酸 (20:4n-6) >  $\alpha$ -リノレン酸 (18:3n-3) >  $\gamma$ -リノレン酸 (18:3n-6) > リノール酸 (18:2n-6) の順となり、二重結合を6個有するn-3系高度不飽和脂肪酸であるDHAは水溶液中では極めて酸化されにくいことを明らかにした。
2. 水溶液中では、DHA分子中の二重結合が何らかの相互作用によって、DHA同士あるいは乳化剤などと会合し、酸化を引き起こすラジカルや酸素が攻撃しにくい立体構造をとることを明らかにした。リノール酸ではDHAのような相互作用は見られず、水溶液中でのDHAの

高い酸化安定性は、その特徴的な立体構造に起因することを示した。また、DHAの水溶液中での酸化安定性は、分散粒子の大きさによる影響をあまり受けないが、リノール酸では分散粒子が大きくなるほどその酸化安定性は向上することも示した。

3. 生体膜脂質であるリン脂質においても、水溶液中での酸化安定性は空気中とは全く異なり、EPAやDHAを多量に含むサケ卵リン脂質は、リノール酸をその主要構成脂肪酸とする大豆リン脂質よりも酸化されにくいことを明らかにした。また、生体膜モデルであるリポソムの酸化安定性を左右する因子は、高度不飽和脂肪酸のアシル基分布であることも示し、サケ卵リン脂質のように、EPAやDHAなどの高度不飽和脂肪酸をsn-2位に有し、sn-1位には飽和脂肪酸やモノエン脂肪酸を含む分子種は酸化されにくいことを明らかにした。これについては、アシル基位置が既知の合成不飽和リン脂質を用いた実験によっても確認した。さらに、コレステロールやタンパク質といった様々な生体成分も、リン脂質膜の酸化安定性に大きく影響することを見出した。ただしその作用については各生体成分で異なり、例えばタンパク質は、リポソムの外側に吸着し、水層で発生したラジカルなどからリポソムを保護するが、この吸着能はリポソムを構成するリン脂質によって異なること、またコレステロールの酸化防止能は二分子膜の安定化効果によることなどを明らかにした。
4. EPAやDHAを多量に含有するリポソムの利用法を図ることを目的として、サケ卵リン脂質から調製したリポソムの酸化安定性に関わる因子について検討したところ、タンパク質やコレステロールの添加の他、電荷剤や低濃度のビタミンEをリポソムに加えることや、リポソムの形態をより小さくすることなどにより、その酸化を効果的に抑制できることを明らかにした。また、こうした条件で調製したリポソム中に機能性の脂質成分を安定に封入できる可能性も示した。

以上の結果は、化学構造的に非常に不安定なEPAやDHAが、水溶液中では酸化されにくいことを初めて明らかにしたものであり、EPAやDHAの生体中での酸化安定性について考察する上で重要な知見となるものである。また、本研究で得られた成果は、EPAやDHAの生理機能の解明や食品及び薬品への利用を図る上でも極めて有益であり、今後この領域の飛躍的な発展に寄与するものとして高く評価される。よって審査員一同は本論文が博士（水産学）の学位を授与するのに十分な内容を有するものと認定した。