

学 位 論 文 題 名

共役脂肪酸の天然物中での存在と
その機能性並びに利用に関する研究

学位論文内容の要旨

共役脂肪酸は分子内に共役二重結合を有する脂肪酸の総称であり、特に共役リノール酸(CLA)に関しては、その特異的な生理作用から様々な研究が行われている。CLAはその名称の通り、リノール酸(LA)と同様炭素数 18 個で二重結合を 2 個有する脂肪酸であるが、二重結合の位置およびその幾何異性により複数の異性体が存在する。CLAは反芻胃を有する家畜由来の乳製品中や肉製品中に最も多く見いだされており、その含量は総脂肪酸中~1%程度である。天然物中の CLA の主な異性体は、*cis9, trans11-octadecadienoic acid (c9,t11-18:2)*と *t10,c12-18:2* であり、その生理作用としては、抗がん作用、脂肪蓄積抑制作用、動脈硬化抑制作用、抗アレルギー作用などが明らかになっている。一方、天然には CLA 以外の共役脂肪酸の存在も報告されている。例えば、食用に供されているニガウリ、ザクロ、キササゲなどの植物種子油中にはリノレン酸(LN)の異性体である共役 LN(CLN)が 30~70%含有されている。一方、海藻脂質中からはイコサペンタエン酸(IPA)の異性体である共役 IPA(CIPA)が見出されている。二重結合を多数持つ CLA 以外の共役脂肪酸には、CLA よりもさらに多種多様な異性体の存在が推定でき、これらの天然物中における存在や異性体ごとの詳細な生理機能についての解明は非常に興味深い。しかし、現在のところ CLA 以外の共役脂肪酸の研究例はほとんどない。そこで本研究では、特に CLA 以外の共役脂肪酸について、その分析法の確立と天然物中での存在について検討を行った。また、これら共役脂肪酸の生理作用とその酸化安定性および抗酸化についても検討を行った。

まず、一般に脂肪酸の定量分析に汎用されるガスクロマトグラフィー(GC)を用いて標品の共役脂肪酸について分析したところ、CLAとCLNはGCにより定量できたが、CDHAはカラム内への吸着に加え、熱分解あるいは重合を受けたためピークが検出

されなかった。次に、熱分解が起こらない高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて共役脂肪酸の分析を行った。共役脂肪酸にはその共役二重結合構造に由来する特徴的な紫外(UV)吸収帯が存在する。そこで UV 検出器を備えた HPLC を用いて CDHA の分析を行った。その結果、235 nm の検出波長を用いることで CDHA の検出が可能となった。さらに、複数の UV 吸収波長を同時に分析できるフォトダイオードアレイ検出器を用いて天然物中での共役脂肪酸の探索を行ったところ、マグロ眼窩油中に共役ジエン構造あるいは共役トリエン構造を有する複数の共役脂肪酸の存在が示された。ただし、この方法は、感度の点、特異性の点で不十分であった。そこで、共役二重結合に直接付加する蛍光試薬(DMEQ-TAD)を用い、蛍光検出器を備えた HPLC 分析による共役脂肪酸の高感度検出を試みた。その結果、各種動植物油脂中に相当量の CLA と CLN が検出された。また動物油脂の方が植物油より共役脂肪酸量が多いことも分かった。さらに、水産物油中では、一般の食用植物油や CLA を多く含むと考えられている反芻動物油脂よりも、多量の共役脂肪酸(共役トリエン脂肪酸など)を含むことが明らかとなった。

本研究により海洋動物中に共役トリエン脂肪酸などの共役脂肪酸が存在することが明らかとなったが、共役トリエン脂肪酸の生理作用についての報告はこれまでにほとんどなかった。そこで、共役トリエン構造を有する共役 DHA(CDHA)の抗腫瘍効果について培養系細胞を用いて検討を行った。この際、天然物中の CDHA 含量は低いと、DHA からアルカリ異性化法で CDHA を調製し実験に供した。その結果、CDHA は低濃度で腫瘍細胞のみに致死活性を示すことが分かった。アルカリ異性化法で得られた CDHA は、共役ジエン酸、共役トリエン酸、共役テトラエン酸および未反応の DHA を含有するが、DHA や共役ジエン酸である CLA では致死活性がなく、また CDHA に含まれる共役テトラエン酸含量はごく微量であったことから、CDHA が示した致死活性は共役トリエン酸に起因すると考えられた。また、ある種の植物種子油中には特定の CLN 異性体が多量に含まれることから、こうした CLN を用いて共役トリエン酸の二重結合の位置あるいは幾何異性の違いが抗腫瘍効果におよぼす影響について検討した。その結果、9 位、11 位および 13 位に二重結合を有し、9 位にシス型構造、11 位にトランス型構造を持つ CLN の致死活性が強いことが示唆された。

次に、CLN(c9,t11,t13-18:3)を多量に含むニガウリ種子油が、ラット大腸発がんにおよぼす影響について検討した。その結果、大腸前がん病変の一つである異型腺

窩巢の発現がニガウリ種子油投与により濃度依存的に抑えられた。また、ニガウリ種子油投与により、前がん病変部のアポトーシス誘導と増殖細胞核抗原標識率の抑制も観察できた。さらに、ラット肝臓脂質中に CLN ではなく CLA(c9,t11-18:2)が検出されたことから、この CLA が活性本体の 1 つとも考えられた。

機能性脂肪酸の生理作用や食品などへの応用を考える上で、その酸化と抗酸化は非常に大きな問題である。そこで、海洋動物油やある種の植物種子油に存在する共役トリエン酸の酸化安定性について LA を主要成分とする大豆油、CLA を含む CLA 油、LN を主要成分とするエゴマ油、CLN を含むニガウリ種子油を用いて比較検討した。その結果、バルク系、エマルション系いずれにおいても、ニガウリ種子油の酸化安定性が最も低く、ついでエゴマ油、CLA 油、大豆油の順となることが分かった。また、共役型油脂の酸化生成物としては、過酸化物よりも重合物が主として生成することが示された。共役型油脂は対応する非共役型油脂よりも酸化されやすいことが分かったが、Tocopherol や Trolox といった抗酸化剤を添加すると、共役型油脂の酸化安定性は上昇し、その酸化安定性は対応する非共役型油脂より高くなった。したがって、適当な抗酸化剤を用いることで共役トリエン酸のような不安定な共役型油脂の食品などへの利用も可能となることが明らかとなった。

以上本研究により、水産物油中などに DHA あるいは IPA 由来の共役トリエン酸の存在が明らかとなった。また、共役トリエン酸は強い抗がん活性を有することも示された。したがって、水産物油あるいは植物種子油に存在する共役トリエン酸は新しい機能性成分としての活用が期待される。ただし、共役トリエン酸の酸化安定性は低いいため、その利用にあたっては酸化防止に関して充分留意する必要がある。本研究で明らかにした共役脂肪酸に対する抗酸化剤の特徴は、こうした効果的な酸化防止法について極めて有益な知見を与えているものとする。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 教 授 板 橋 豊
副 査 教 授 高 橋 是太郎
副 査 助教授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

共役脂肪酸の天然物中での存在と その機能性並びに利用に関する研究

共役脂肪酸は分子内に共役二重結合を有する脂肪酸の総称であり、特に共役リノール酸(CLA)に関しては、その特異的な生理作用から様々な研究が行われている。CLAは分子内に共役ジエン構造を有する共役脂肪酸であり、抗がん作用、脂肪蓄積抑制作用、動脈硬化抑制作用、抗アレルギー作用などの生理作用を示すことが明らかになっている。一方、天然物中にはCLA以外の共役脂肪酸の存在も報告されている。例えば、食用に供されているニガウリやザクロ、あるいは、漢方薬の原料となるキササゲなどの植物種子油中にはリノレン酸(LN)由来の共役トリエン酸(CLN)が30～70%含有されている。また、海藻脂質中からはイコサペンタエン酸(IPA)由来の共役トリエン酸(CIPA)が見いだされている。二重結合を多数有するこれらの共役トリエン酸には、CLAよりもさらに多種多様な異性体の存在が推定でき、その天然物中における存在や異性体ごとの詳細な生理機能についての解明は非常に興味深い。しかし、現在のところCLA以外の共役脂肪酸の研究例はほとんどない。そこで本研究では、特にCLA以外の共役脂肪酸に着目し、水産物中におけるこれら共役脂肪酸の存在、生理作用、食品等に利用する際重要となる酸化安定性および抗酸化等について検討を行い、以下のような成果を得た。

1. 共役脂肪酸の分析法の確立と水産物中での存在：フォトダイオードアレイ検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、水産物中での共役脂肪酸の探索を行った。その結果、マグロ眼窩油中に共役トリエン構造を有する共役脂肪酸が存在することを始めて明らかにした。さらに、共役二重結合に直接付加する蛍光試薬(DMEQ-TAD)を用い、蛍光検出器を備えたHPLC分析による共役脂肪酸の高感度検出を試みた。その結果、水産物油中には、一般の食用植物油やCLAを多く含むと考えられている反芻動物油脂よりも、多量の共役脂肪酸(共役トリエン脂肪酸など)を含むことを明らかにし

た。

2. 共役トリエン酸の抗腫瘍活性：共役トリエン構造を有するDHAをアルカリ異性化法により調製し、その抗腫瘍効果について培養系細胞を用いた検討を行った。その結果、CDHAは低濃度で腫瘍細胞のみに増殖抑制作用を示すことを見いだした。ただし、共役ジエン構造を有するDHAや非共役のDHAにはこうした活性がなく、分子内に共役トリエン構造を有することが細胞に対して強い増殖抑制作用を示す原因であることを明らかにした。また、CLNを用いて共役トリエン酸の二重結合の位置あるいは幾何異性の違いが増殖抑制作用におよぼす影響について検討し、9位、11位および13位に二重結合を有し、9位にシス型構造、11位にトランス型構造を持つCLNの活性が強いことを示した。

3. 共役トリエン酸のラット大腸癌抑制効果：共役トリエン酸の一つであるCLN(c9,t11,t13-18:3)を多量に含むニガウリ種子油のラット大腸発がんにおよぼす影響について検討した。その結果、大腸前がん病変の一つである異型腺窩巢の発現がニガウリ種子油投与により濃度依存的に抑えられること、その活性は0.006%という低濃度でも発揮することなどを見いだした。また、ニガウリ種子油投与により、前がん病変部のアポトーシス誘導と増殖細胞核抗原標識率の抑制が起こることも示した。これらの結果より、共役トリエン酸が強い抗癌活性を有することを始めて明らかにした。

4. 共役トリエン酸の酸化と抗酸化：機能性脂肪酸の生理作用や食品などへの応用を考える上で、その酸化と抗酸化は非常に大きな問題である。そこで、共役トリエン酸の酸化安定性について検討し、共役トリエン酸の酸化安定性が非常に低いことを明らかにした。ただし、トコフェロールやトロロックスといった抗酸化剤添加により、共役型油脂の酸化安定性は飛躍的に上昇し、その酸化安定性是对応する非共役型油脂より高くなることも示した。

このように、本研究では、水産物を始めとする天然物中にDHA、IPAあるいはリノレン酸由来の共役トリエン酸が存在すること、また、共役トリエン酸は強い抗がん活性を有することを明らかにした。さらに、共役トリエン酸の酸化安定性は非常に低い、適当な抗酸化剤を用いることでその食品などへの利用が可能となることも示した。本研究で得られた成果は、水産物などに含まれる共役トリエン酸の栄養機能性と利用について始めて明らかにしたものであり、水産物を積極的に活用する上で有益な知見を与えるものと高く評価される。よって審査員一同は本研究の申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。