

学 位 論 文 題 名

ドコサヘキサエン酸 (DHA) とリノール酸の水系での
酸化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

油脂は食品成分としても生体成分としても非常に重要である。特に油脂の主要成分である脂肪酸は、エネルギー源として重要なだけでなく様々な生体調節機能因子として働くことが知られている。脂肪酸は二重結合を持たない飽和脂肪酸と一つ以上の二重結合を持つ不飽和脂肪酸に分けられるが、このうちメチル基末端より数え六番目の炭素に二重結合が存在する n-6 系と三番目の炭素に二重結合が存在する n-3 系不飽和脂肪酸が特に重要な機能性を備えている。n-6 系の脂肪酸としてはリノール酸がよく知られており、リノール酸が欠乏すると皮膚の鱗片状化、成長阻害、生殖機能障害などが起こる。一方、n-3 系脂肪酸である DHA は、水産物に多く含まれ、脂質代謝改善、抗動脈硬化、抗アレルギー、血液凝固防止、記憶力や視力の改善といった機能性が知られている。

このように多様な生体機能を持つ不飽和脂肪酸だが、分子内に多くの不飽和結合を含むため脂質過酸化反応を受けやすいという欠点がある。酸化された脂質は食品においては戻り臭などの風味劣化の原因となり、食すと悪寒、吐き気、嘔吐、下痢などの毒性を示すことも知られている。さらに生体内では動脈硬化やガンなどの病気の原因になると考えられている。脂質過酸化反応はラジカル連鎖反応で進行し、各高度不飽和脂肪酸の二重結合と二重結合の間にあるメチレン基の水素はエネルギー的に引き抜かれやすい為、空気中ではビスアリル位の多い脂肪酸ほど酸化されやすい。実際に空気中の酸化されやすさはリノール酸<リノレン酸<アラキドン酸<EPA<DHAとなり、それぞれのビスアリル位数は1<2<3<4<5である。

しかし、生体内の高度不飽和脂肪酸は比較的安定である。この理由については抗酸化物質の存在など様々な要因が考えられるが、生体内で脂質が水と共存して存在することも大きく関係しているとされている。実際、水溶液中に高度不飽和脂肪酸をミセルとして分散させると、先に示した空気中での結果と正反対の結果が得られている。本研究ではこのようなエマルジョン中の酸化の特徴を解明するため、リノール酸エチルとDHAエチルを基質に用いてエマルジョンを作成し、水溶性と脂溶性のラジカル発生剤を用いて酸化反応を行った。各脂肪酸エチルの酸化安定性は、複数の方法を用いて評価すると共に、エマルジョン中での抗酸化剤の効果の特徴とその機構解析についても検討した。

第2章ではエマルジョン中でのリノール酸エチルとDHAエチルの酸化安定性に及ぼす基質濃度と粒子径の影響について検討した。その結果、リノール酸エチルの場合は濃度が高いほど粒子径が大きくなり、酸化安定性は向上した。DHAエチルでも濃度が高いほど粒子径は大きくなったが、酸化安定性はリノール酸とは逆に悪くなった。この理由としてはリノール酸エチルの場合、界面からのラジカル攻撃に対して酸化ダメージを受けていると

考えられるので、粒子が細かく表面積が大きくなるほどラジカルによる攻撃を受けやすくなり不安定になると考えられた。しかしDHAは比較的界面では安定な構造をしており、むしろ粒子径が大きくなったときに内部の油脂がラジカル連鎖反応を起こしやすいため酸化安定性が悪くなったものと考えられた。

第3章から第5章では、DHAエチルとリノール酸エチルのマイクロエマルジョンについて、水溶性と脂溶性ラジカルで酸化を誘発させた場合の抗酸化剤の効果について検討した。抗酸化剤としては食品に対して利用されるアスコルビン酸（第3章）、トコフェロール及びトコフェロールの水溶性類似物のトロロックスを使用した（第4、5章）。

リノール酸エチルのエマルジョンでは、水溶性のラジカルで酸化を引き起こした場合ではすべての抗酸化剤が効果を示し、脂溶性のラジカルによる酸化に対しては低濃度のアスコルビン酸以外は抗酸化効果を示した。脂溶性のラジカルに対しては脂溶性の抗酸化剤が、水溶性のラジカルに対しては水溶性の抗酸化剤が高い効果を示す傾向もみられた。一方、DHAエチルの結果では水溶性のラジカルに対して水溶性の抗酸化剤はある程度の抗酸化効果を示したが、脂溶性のラジカルに対してはトロロックスが若干効果を示した程度でそれ以外は効果を示さなかった。特に α -トコフェロールは脂溶性のラジカルに対して全く効果を示さなかった。

2章で明らかにしたように、3章、4章、5章で作成したエマルジョンは、粒子径が数十ナノメートルからなるマイクロエマルジョンと考えられる。マイクロエマルジョンでは、通常のエマルジョンに比べて、界面に存在する脂質含量が高い。したがって、界面での脂質の酸化安定性が、マイクロエマルジョン全体の酸化安定性に大きく関与する。抗酸化剤も、界面に多く存在しやすいトロロックスが、マイクロエマルジョンではより効果的に働くと考えられる。水溶性酸化開始剤と脂溶性酸化開始剤いずれの酸化誘導に対しても、リノール酸エチルとDHAエチルの酸化に対して、トロロックスの抗酸化作用は効果的に働いたが、これは、本研究で用いたエマルジョンの分散粒子径が小さいため、界面での各エチルエステルの酸化安定性がエマルジョン全体の酸化安定性を左右していることによるものと思われる。

一方、リノール酸エチルとDHAエチルを比較した場合、後者の方が、極性が高く、界面へ移行しやすい。他方、 α -トコフェロールの極性は高くなく、油滴内部に主として存在するものと考えられる。したがって、より極性の低いリノール酸エチルとは共存しやすく、両者で内部油滴を構成できる。その結果、脂質内部からの酸化（脂溶性酸化開始剤による酸化）に対しても抗酸化効果を示すことができたものと考えられた。ところが、DHAエチルは極性が高く、 α -トコフェロールとは共存しにくいいため、 α -トコフェロールとDHAエチルエステルのエマルジョンでは、 α -トコフェロールのみが主として内部油滴を形成する。このため、基質（DHAエチルエステル）と α -トコフェロールに対する脂溶性ラジカル（AMVNラジカル）の攻撃は別々に行われ、その抗酸化効果はリノール酸と比較して弱いものと推測できた。なお、アスコルビン酸は水相に主として存在するため、水溶性のラジカルで酸化を引き起こした場合にはある程度の効果が認められるが、脂溶性酸化開始剤に対してはまったくその作用が得られなかったものと考えられた。

食品中に高度不飽和脂肪酸を含む脂質が含まれている場合、ミセルの様な希薄な溶液の場合は少なく、基質濃度がある程度高いエマルジョンの状態が一般的である。こうした形態であるならばリノール酸のような不飽和度が比較的低い脂肪酸を多く含む植物のエマルジョンは比較的安定であることが本研究より伺えた。一方DHAのような不飽和度の高い多価不飽和脂肪酸の酸化安定性を図るためには抗酸化剤を添加することはもちろんである

が、界面での特徴的な酸化安定性を十分生かすことも必要であると考えられた。これらの結果はDHAエチル、リノール酸エチルなど機能性脂肪酸の食品エマルジョン中での酸化挙動について有益な情報を与えていると考えられた。食品や生体など複合的な状態での高度不飽和脂質の酸化・抗酸化挙動に関して完全に解明されているとは言えないが、本研究はこの分野において大きく寄与できるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 官 下 和 夫

副 査 教 授 板 橋 豊

副 査 准教授 細 川 雅 史

学 位 論 文 題 名

ドコサヘキサエン酸 (DHA) とリノール酸の水系での 酸化機構に関する研究

リノール酸やアラキドン酸などのn-6高度不飽和脂肪酸系とリノレン酸、EPA、DHAなどのn-3系不飽和脂肪酸は、ヒトにとって必須な生理機能を有する。しかし、これらの高度不飽和脂肪酸は、分子内に多くの不飽和結合を含むため脂質過酸化反応を受けやすく、酸化によりその生体機能は消失する。脂質過酸化反応はラジカル連鎖反応で進行し、各高度不飽和脂肪酸の二重結合と二重結合の間にあるメチレン基の水素はエネルギー的に引き抜かれやすい為、空気中ではビスアリル位の多い脂肪酸ほど酸化されやすい。したがって、二重結合を6個有するDHAは極めて酸化されやすいとされている。しかし、生体内のDHAは比較的安定であり、この理由については抗酸化物質の存在など様々な要因が考えられるが、生体内で脂質が水と共存して存在することも大きく関係しているとされている。実際、水溶液中に高度不飽和脂肪酸をミセルとして分散させると、先に示した空気中での結果と正反対の結果が得られている。本研究ではこのようなエマルション中の酸化の特徴を解明するため、リノール酸エチルとDHAエチルを基質に用いてエマルションを作成し、水溶性と脂溶性のラジカル発生剤を用いて酸化反応を行った。各脂肪酸エチルの酸化安定性は、複数の方法を用いて評価すると共に、エマルション中での抗酸化剤の効果の特徴とその機構解析についても検討した。本研究で得られた成果は以下の通りである。

1. エマルション中でのリノール酸エチルとDHAエチルの酸化安定性に及ぼす基質濃度と粒子径の影響について検討したところ、リノール酸エチルの場合は濃度が高いほど粒子径が大きくなり、酸化安定性は向上することを明らかにした。一方、DHAエチルでも濃度が高いほど粒子径は大きくなったが、酸化安定性はリノール酸とは逆に悪くなることを見出した。この理由として、リノール酸エチルの場合、界面からのラジカル攻撃に対して脆弱なため、粒子が細かく表面積が大きくなるほどラジカルによる攻撃を受けやすくなり不安定になるが、DHAは比較的界面では安定であり、むしろ粒子径が大きくなったときに内部の油脂がラジカル連鎖反応を起こしやすいため酸化安定性が悪くなることを明らかにした。

2. DHAエチルとリノール酸エチルのマイクロエマルジョンについて、水溶性と脂溶性ラジカルで酸化を誘発させた場合の抗酸化剤の効果について検討した。なお、抗酸化剤としては食品に対して利用されるアスコルビン酸、トコフェロール及びトコフェロールの水溶性類似物のトロロックスを使用した。その結果、リノール酸エチルのエマルジョンでは、水溶性のラジカルで酸化を引き起こした場合ではすべての抗酸化剤が効果を示し、脂溶性のラジカルによる酸化に対しては低濃度のアスコルビン酸以外は抗酸化効果を示すことを見出した。脂溶性のラジカルに対しては脂溶性の抗酸化剤が、水溶性のラジカルに対しては水溶性の抗酸化剤が高い効果を示す傾向も明らかにした。一方、DHAエチルの結果では水溶性のラジカルに対して水溶性の抗酸化剤はある程度の抗酸化効果を示したが、脂溶性のラジカルに対してはトロロックスが若干効果を示した程度でそれ以外は効果を示さないことを示した。

3. 本研究で作成したエマルジョンは、粒子径が数十ナノメートルからなるマイクロエマルジョンである。マイクロエマルジョンでは、通常のエマルジョンに比べて、界面に存在する脂質含量が高い。したがって、界面での脂質の酸化安定性が、マイクロエマルジョン全体の酸化安定性に大きく関与する。本研究により、界面に多く存在しやすいトロロックスが、マイクロエマルジョンではより、効果的に働くことが明らかにされた。

4. リノール酸エチルとDHAエチルを比較した場合、後者の方が、極性が高く、界面へ移行しやすい。他方、 α -トコフェロールの極性は高くなく、油滴内部に主として存在する。したがって、 α -トコフェロールはより極性の低いリノール酸エチルとは共存しやすく、両者で内部油滴を構成できる。その結果、脂質内部からの酸化（脂溶性酸化開始剤による酸化）に対しても抗酸化効果を示すことができたと考えられた。ところが、DHAエチルは極性が高く、 α -トコフェロールとは共存しにくいいため、 α -トコフェロールとDHAエチルエステルのエマルジョンでは、 α -トコフェロールのみが主として内部油滴を形成する。このため、基質（DHAエチルエステル）と α -トコフェロールに対する脂溶性ラジカル（AMVNラジカル）の攻撃は別々に行われ、その抗酸化効果はリノール酸と比較して弱いことが本研究により明らかにされた。

以上、本研究により、水産物中に多く含まれる機能性脂肪酸であるDHAの水系での特徴的な安定性と抗酸化剤の作用機構について、論理的な説明が可能となった。これらの結果はDHAエチル、リノール酸エチルなど機能性脂肪酸の食品エマルジョン中での酸化挙動について有益な情報を与えていると考えられた。食品や生体など複合的な状態での高度不飽和脂質の酸化・抗酸化挙動に関して完全に解明されているとは言えないが、本研究はこの分野において大きく寄与できるものといえる。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。