

天然由来共役型脂肪酸の食品栄養学的特性に関する研究

都 築 毅

東北大学大学院農学研究科 准教授

緒 言

天然には、通常の二重結合ではなく共役化した二重結合をもつ共役脂肪酸が存在する。牛肉や乳製品には、リノール酸 (LA, 9Z12Z-18:2) の幾何、位置異性体である共役リノール酸 (CLA) が、含まれている (Fig. 1)。CLA は抗癌作用、脂質代謝改善作用、動脈硬化抑制作用、免疫増強作用、骨代謝改善作用などが認められ、健康補助食品として販売されている。CLA は、天然において非常に少ないため、アルカリ異性化によって化学合成されている。近年、化学合成によって作られた天然にはない異性体に副作用が見出され、その安全性に疑問が持たれている。一方、天然にはCLA 以外にも共役二重結合をもつ脂肪酸が存在する。キリやニガウリなどのある種の植物種子には α -エレオステアリン酸 (α -ESA, 9Z11E13E-18:3) が存在している (Fig. 1)。また、紅藻あるいは緑藻には、さらに長鎖の共役EPAや共役DHAが見出されている。CLA についてはさかんに研究されているが、他の共役脂肪酸は食品成分として摂取している可能性はあるものの、生理活性や栄養的な調査はほとんどされていない。我々は、比較的手に入れることが容易なキリやニガウリの種子に含まれる共役リノレン酸で

ある α -ESAに興味を持ち、CLAにかわる安全な生理活性脂質になりうることを期待して、はじめに α -ESAの分析法を確立し、化学的性質を理解するうえで重要な酸化安定性について検討した。そして、体内動態、脂質代謝への影響や酸化ストレスの有無、抗癌活性試験、抗腫瘍血管新生試験を行い、食品へ応用するために共役脂肪酸の安全性や有用性を検討した。

共役脂肪酸の分析法の確立¹⁾

CLA については分析法が確立されていたが、 α -ESAの分析法は過去に検討されていなかった。共役トリエン構造は共役ジエン構造と比べて不安定であることが考えられ、様々な試験を行ううえで分析法の確立が必要であると考えられた。そこで、異性化を極力防いでガスクロマトグラフ (GC) 分析を行うための最適なメチル化条件を明らかにしようとした。メチル化の方法は、酸触媒法と塩基触媒法に分けることができる。酸触媒法は、脂肪酸がエステル型、遊離型両方ともメチル化が可能な方法ではあるが、条件が厳しく、時間がかかるという欠点がある。塩基触媒法は、温和な条件でメチル化ができて、短時間で処理ができる方法である。しかし、それぞれの方法でメチル化できる脂質の選択性がある。結果、いずれの塩基触媒法でも共役脂肪酸のメチル化を安定に行うことができた (Table 1)。しかしながら、塩基触媒法には脂質選択性があるため、試料が限定される。そこで、塩基触媒法と同程度安定にメチル化を行える酸触媒法も決定する必要があった。その結果、キリ油由来の α -ESAを極力異性化することなくメチル化できたのは、14%BF₃/MeOH法であった (キリ油を弱アルカリ処理して遊離脂肪酸を調製し、室温で30分の処理)。また、遊離脂肪酸に調製した後、塩基触媒法のトリメチルシリルジアゾメタンを使用しても異性化することなくメチル化できた。したがって、 α -ESAを含む試料の場合には、弱アルカリ処理をした後、14%BF₃/MeOH法もしくはトリメチルシリルジアゾメタン法で行うこととした。

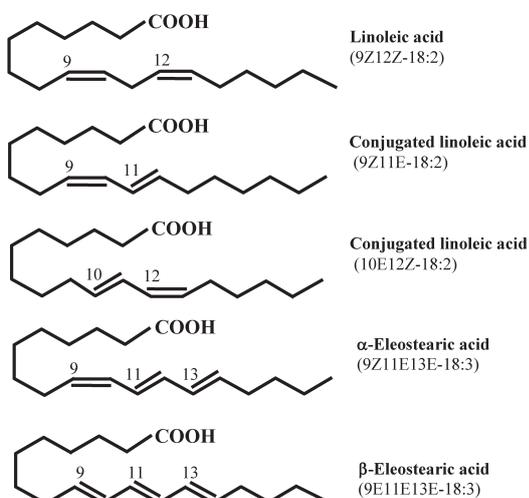


Fig. 1. Chemical structures of fatty acids.

Table 1 Artificial isomerization of tung oil fatty acids depended on different methylation procedures.

Methods*	Reaction temp. (°C)	Reaction time (min)	α -ESA	β -ESA	9,11,13-LnA	Others
			(% of total conjugated fatty acids)			
AOCS (BF ₃ /MeOH)	100	5	67.6	17.4	10.7	4.3
BF ₃ /MeOH	RT	30	85.2	9.5	1.9	3.4
HCl/MeOH	60	5	81.9	8.3	6.1	3.6
	60	10	72.0	10.6	12.9	4.5
	60	20	62.1	14.1	18.8	5.0
	80	5	54.3	17.0	22.3	6.4
	80	10	26.1	26.0	38.1	9.8
	100	5	40.6	21.6	30.2	7.6
	100	10	12.9	27.9	44.1	15.2
H ₂ SO ₄ /MeOH	60	5	84.6	8.1	3.8	3.5
	60	10	77.6	9.9	8.8	3.7
	60	20	65.5	13.2	15.8	5.5
	80	5	75.4	10.1	9.4	5.1
	80	10	56.2	16.9	21.9	5.0
	100	5	63.2	14.4	16.6	5.8
	100	10	37.6	22.1	31.6	8.8
NaOCH ₃ /MeOH	RT	5	91.8	6.9	ND	1.3
TMG/MeOH	100	5	90.8	6.6	0.4	2.1
TMSN ₂ CH ₃	RT	30	79.7	18.7	0.5	1.1

* Details for the methods see the Materials and Methods section in the text.

The area of each peak of conjugated fatty acid was divided by the sum of all the peaks of conjugated fatty acids to calculate percentages. Unknown artifacts were calculated as "Others." AOCS, American Oil Chemists' Society; ESA, eleostearic acid; LnA, α -linolenic acid; RT, room temperature; TMG, Tetramethylguanidine; TMSN₂CH₃, Trimethylsilyldiazomethane.

共役脂肪酸の酸化安定性²⁾

α -ESAの生理活性試験を行い、食品に応用する場合、安定性に関する情報は必要不可欠である。そこで α -ESAと酸素の反応性を、CLAや非共役脂肪酸と比較しながら評価した。遊離脂肪酸 {LA, 9Z11E-CLA, 10E12Z-CLA, α -リノレン酸 (LnA), α -ESA} の酸化安定性を評価するために、残存脂肪酸量、酸素吸収量、脂質ヒドロペルオキシド量、酸化二次生成物量を測定した。残存脂肪酸量や酸素吸収量の結果から、共役脂肪酸 (CLAと α -ESA) は非共役脂肪酸 (LAとLnA) より酸化されやすかった (Fig. 2)。しかし、脂質ヒドロペルオキシド量やTBARS量は、共役脂肪酸ではほとんど生成しなかった (Fig. 2)。これより、共役脂肪酸と非共役脂肪酸では酸化機構に違いがあると考えられた。また、 α -ESAの酸化速度は、CLAよりはるかに早かった。次に、トリアシルグリセロール (TG) 型で試験した。共役脂肪酸はエステル型になっても、非共役脂肪酸と比べると酸化されやすかった (Fig. 3)。しかし、遊離型のとくと比べると約10倍も酸化安定性が増すことがわかった。また、共役脂肪酸は抗酸化剤である α -トコフェロール添加により、約2倍近く酸化安定性が増した (Fig. 3)。これにより、共役脂肪酸の酸化安定性はエステル体にし、抗

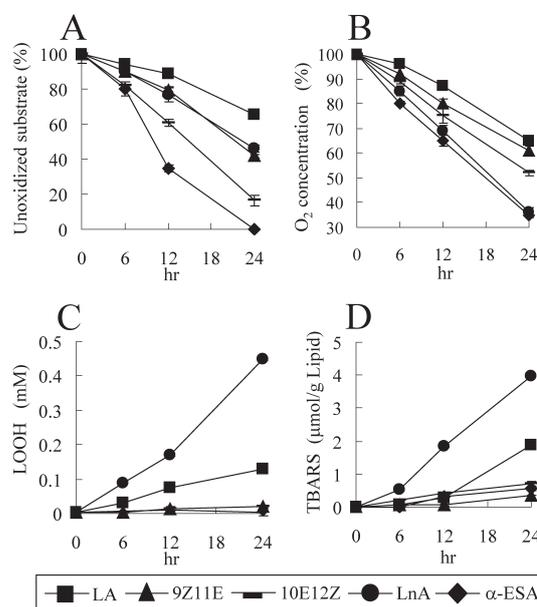


Fig. 2. Thin film oxidation of fatty acids (LA, 9Z11E-CLA, 10E12Z-CLA, LnA, and α -ESA) in an air atmosphere (0.5 mg/10 ml-test tube) at 37°C for 0–24 h. Changes in unoxidized fatty acids (A), oxygen absorption (B), lipid hydroperoxide (LOOH) formation (C) and TBARS (D) are shown. Values are means \pm SD ($n=6$).

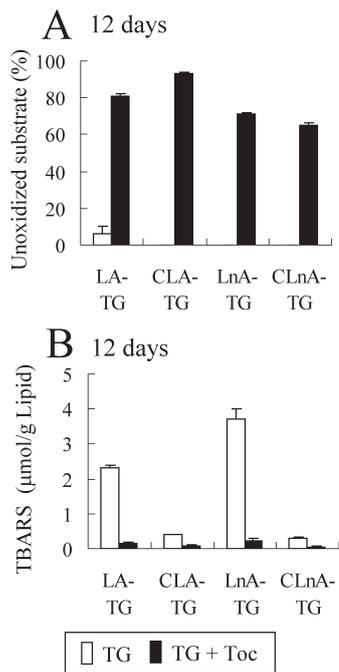


Fig. 3. Oxidation of triacylglycerol samples (0.5 mg/10 ml-test tube) in the presence of α -tocopherol. 0.1% α -tocopherol was added to the triacylglycerol samples and the mixtures were left to stand in an air atmosphere at 37°C for 12 d. The changes in unoxidized fatty acids after 12 d (A), and TBARS after 12 d (B), are given. Values are means \pm SD ($n=6$).

酸化剤を添加することによって飛躍的に安定性が増し、食品などに応用できることが明らかになった。また、非共役脂肪酸と比較して、抗酸化剤の影響をより強く受けることが明らかとなった。

共役リノレン酸の脂質代謝および生体内脂質過酸化の影響と吸収代謝³⁻⁹⁾

共役脂肪酸は非共役脂肪酸と比較して酸化されやすいことがわかった。したがって、共役脂肪酸の摂取は体内で酸化ストレスを促進する可能性が考えられた。また、摂取した α -ESAが吸収されているかなど体内動態を扱った報告はない。 α -ESAを食品に応用するためにも生体への安全性と体内動態を明らかにする必要がある。そこで、 α -ESAについてラットでの吸収と代謝、体内脂質過酸化に与える影響を明らかにしようとした。ラットにLA、CLA、LnA、 α -ESAをそれぞれ摂取させ、4週間飼育した。血漿と肝臓の脂質組成と酸化ストレス指標に4群で有意差はなかった。このことは、共役脂肪酸が、生体に対し悪影響を及ぼさないことを示している。 α -ESA食ラットの血漿と肝臓の総脂質構成脂肪

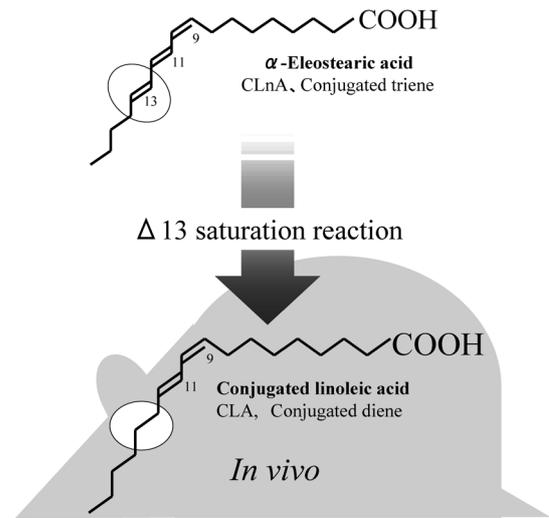


Fig. 4. Significant occurrence of 9Z11E-CLA in the liver and plasma lipids of rats fed α -ESA-supplemented diet.

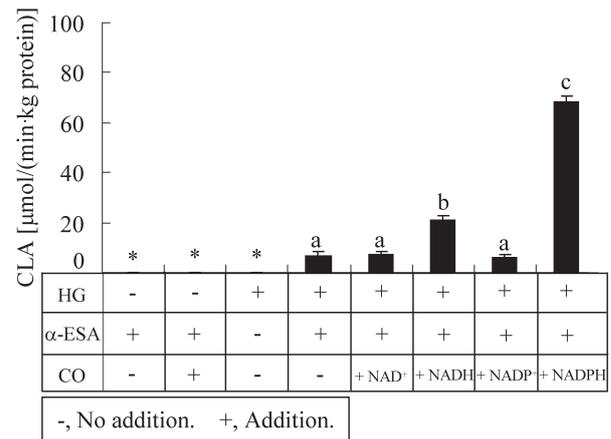


Fig. 5. 9Z11E-CLA concentration in liver homogenate (HG) of male SD rats aged 5 weeks. α -ESA and coenzyme (CO) were added to liver homogenate. The reaction was stopped after 10 min, and the 9Z11E-CLA concentration was analyzed by GC. * Not detected. Values are mean \pm SEM, $n=6$. Values not sharing the same superscript letter (* is excluded) in each tissues are significantly different, $p<0.05$.

酸にCLAと保持時間が同一の未同定の脂肪酸が検出された。これをAg⁺-HPLCにて単離し、GC-EI/MS分析と¹³C-NMR分析により、この脂肪酸は9Z11E-CLAと決定された (Fig. 4)。この興味深い代謝機構を詳細に検討した。同様の試験を無菌ラットで行ったところ、体内において9Z11E-CLAが検出されたことから、この代謝反応はラット体内で起こることが明らかとなった。正常ラットに α -ESAを経口投与すると、3時間という短時間で各部位 (血漿、肝臓、腎臓、小腸粘膜、盲腸内容物)

にCLAが検出されたこと、 α -ESA摂取により生成するCLAが9Z11E-CLAのみであることから、この反応は酵素反応であると考えられた。ラット肝臓ホモジネイトと α -ESAに補酵素を加えて反応させたところ、NADPHで9Z11E-CLAの生成が促進された (Fig. 5)。よって、 α -ESAは、NADPH依存性の酵素により Δ 13位が飽和化され9Z11E-CLAに代謝されることが明らかとなった。肝臓ばかりでなく、腎臓や小腸粘膜ホモジネイトでも Δ 13飽和化反応が確認されたこと、ラットの種 (SDとWister) が違っても Δ 13飽和化反応が確認されたことから、この反応は、様々な種の組織や細胞で起こることが示唆された。

共役リノレン酸の抗癌作用¹⁰⁻¹³⁾

α -ESAがラット体内でCLAに転換されることを見出した。これより、 α -ESAはCLA同様に抗癌作用など有益な生理活性を持つ可能性が考えられた。そこで、 α -ESAの抗癌作用を検討した。ヌードマウスの背部皮下にヒト大腸癌細胞であるDLD-1を移植し、LA、9Z11E-CLA、10E12Z-CLA、 α -ESAを32日間、強制経口投与した。試験の結果、 α -ESAはCLAと比較して強い癌増殖抑制効果が見出された (Fig. 6)。また、 α -ESAは正常組織である肝臓に対しては何ら影響を与えていなかった。先の試験でも α -ESA食ラットの血漿や肝臓で脂質組成や酸化ストレスに有意な差は見られなかった。

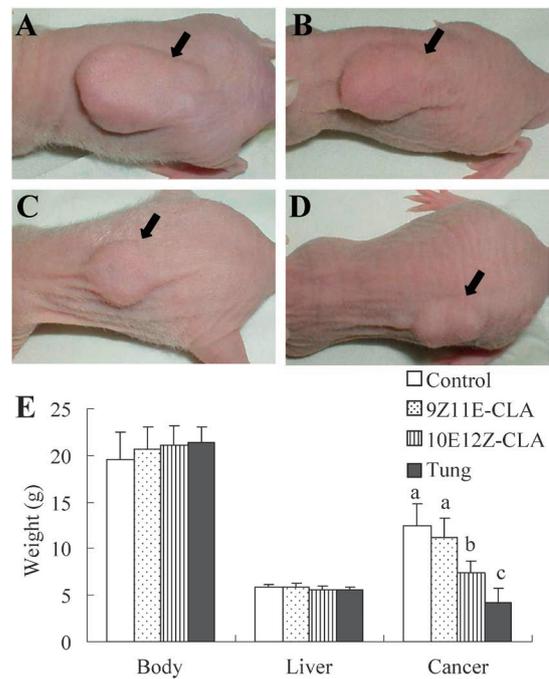


Fig. 6. The back of nude mice transplanted with DLD-1 cells that received forcible fatty acid medication for 32 d. A, Transplanted mice fed the control (safflower oil fatty acid) diet; B, Transplanted mice fed the 9Z11E-CLA diet; C, Transplanted mice fed the 10E12Z-CLA diet; D, Transplanted mice fed the tung (tung oil fatty acid) diet. E, Tumor weight, body weight, and liver weight of mice transplanted with DLD-1 cells that were fed a control, 9Z11E-CLA, 10E12Z-CLA, or tung diet. Values are shown as the mean \pm SD ($n=10$). a, b, c; values with different superscripts are significantly different at $p<0.05$.

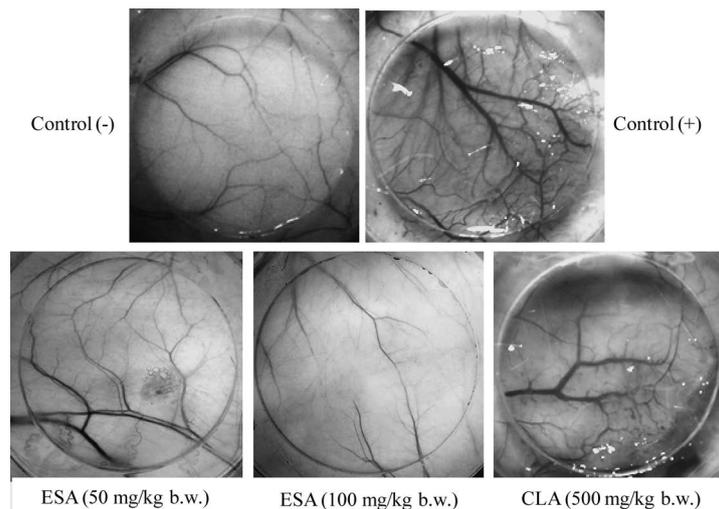


Fig. 7. Inhibitory effect of ESA on *in vivo* angiogenesis (DAS assay). Chambers filled with a suspension of DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells were implanted subcutaneously in ICR mice. After 7 d of feeding with ESA (50 or 100 mg/kg b.w.) or CLA (500 mg/kg b.w.), the chambers were excised and the distribution of vessels around them was photographed. Distribution of blood vessels in chambers filled with PBS and DLD-1 cell suspension in ESA- or CLA-treated mice. Control mice (-) or (+) received chambers containing PBS (-) or DLD-1 cells (+) and were administered corn oil (vehicle). b.w., body weight of mouse. -, no addition; +, addition.

これより、 α -ESAは癌細胞に選択的に細胞死を誘導することが考えられた。次に、細胞培養試験にて癌抑制メカニズムの詳細な検討を行った。はじめに細胞生存試験を行い、 α -ESAがCLAより強い殺癌細胞効果を示すことを明らかにした。その後、細胞よりDNAを抽出し、DNA断片化率を求め、アポトーシス実行因子であるCaspase3, 8, 9の活性およびmRNAの発現量を測定し、 α -ESAによりアポトーシスが誘導されることを見出した。また、 α -ESAが癌細胞に酸化ストレスを与えていることを、過酸化リン脂質量とTBARS量を測定することで明らかにし、抗酸化物質である α -トコフェロール添加によりアポトーシス誘導がキャンセルされたことから、 α -ESAは癌細胞特異的に、脂質過酸化を介したアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

また、共役リノレン酸以外の共役脂肪酸である共役EPAや共役DHAについても、抗癌活性を見出した¹⁴⁻¹⁸⁾。

共役リノレン酸の抗血管新生作用¹⁹⁾

α -ESAにCLAより強い癌抑制効果があることを見出した。その時、 α -ESAを投与したマウスの癌組織では、内部が変色し、壊死を起こしていた。これは癌組織内部にまで栄養が行き届いていない状態であり、栄養を運ぶ血管が新生されていないと考えられた。よって、 α -ESAに血管新生を抑制する可能性が考えられた。癌の発生と進展には、血管系がさまざまな形で密接に関係している。癌が増殖するときには、宿主から癌組織に向かう血管の新生が重要なステップになる。現在、癌治療の目的で血管新生を抑制する成分が注目されている。そこで、 α -ESAの血管新生抑制効果を*in vivo*と*in vitro*で試験し、その作用機構を遺伝子発現レベルで検討した。マウス背部皮下法にて*in vivo*で検討し、ヒト内皮細胞(HUVEC)を用いて、血管新生の重要なステップである細胞の増殖、遊走、管腔形成を評価した。また、定量RT-PCR法にて、血管新生に関与する分子のタンパク質量とmRNA量の動向を追った。その結果、 α -ESAは*in vivo*で血管新生を強力に阻害した(Fig. 7)。そしてHUVECの管腔形成や細胞増殖、細胞遊走を抑制した。 α -ESAの血管新生阻害メカニズムは、血管内皮細胞増殖因子であるVEGFの受容体発現を阻害すること、PPAR γ を活性化することを明らかにした。よって、 α -ESAの生理機能として、強い血管新生抑制作用が新たに見出された。

また、 α -ESA以外の共役脂肪酸である共役EPAや共

役DHAについても、抗血管新生作用を見出した^{20, 21)}。

さらに、血管新生は肥満の進展にかかわっている。これに関して、共役脂肪酸である共役EPAや共役DHAについて、抗肥満効果を見出した^{22, 23)}。

まとめ

本研究は、従来不明であった分子内に共役二重結合を有する脂肪酸について、その栄養生理作用を試験管試験から細胞培養試験、動物試験まで幅広く検討を行い、食品への応用を目指した。はじめに食品や生体試料中の共役脂肪酸の定量法を確立し、さらにその酸化安定性がグリセリド構造をとることにより向上すること、抗酸化物質としてビタミンEの使用が有効であることを明らかにした。そして、動物試験で共役脂肪酸の体内動態と脂質代謝への影響を検討し、脂肪酸にこれまでは報告されていない独特な代謝経路を発見した。また、本研究により、共役脂肪酸による抗癌作用、腫瘍血管新生抑制作用、抗肥満作用を新たに見出した。

謝 辞

このたびは大変栄誉ある三島海雲学術賞を授与していただき、公益財団法人三島海雲記念財団関係者の方々をはじめ、選考委員の先生方、また本賞にご推薦頂きました日本栄養・食糧学会に厚く御礼申し上げます。本研究は、東北大学大学院農学研究科で行われたものです。ご指導いただいた宮澤陽夫先生(東北大学教授)ならびに研究に協力して下さった学生ならびに共同研究者の方々に深く感謝致します。

文 献

- 1) M. Igarashi, et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **50**, 121-128, 2004.
- 2) T. Tsuzuki, et al.: *Lipids*, **39**, 475-480, 2004.
- 3) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **49**, 195-200, 2003.
- 4) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr.*, **134**, 2634-2639, 2004.
- 5) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr.*, **136**, 2153-2159, 2006.
- 6) T. Tsuzuki, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2034-2040, 2007.
- 7) K. Sato, et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **57**, 364-371, 2011.
- 8) N. Shinohara, et al.: *J. Oleo Sci.*, **61**, 433-441, 2012.
- 9) R. Kijima, et al.: *J. Oleo Sci.*, **62**, 305-312, 2013.
- 10) T. Tsuzuki, et al.: *Carcinogenesis*, **25**, 1417-1425, 2004.
- 11) Y. Mizushina, et al.: *Lipids*, **39**, 977-983, 2004.
- 12) T. Tsuzuki, et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**, 20-30, 2007.
- 13) N. Shinohara, et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1821**, 980-988, 2012.

- 14) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr.*, **134**, 1162–1166, 2004.
- 15) T. Tsuzuki, et al.: *Lipids*, **40**, 147–154, 2005.
- 16) Y. Yonezawa, et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 453–460, 2005.
- 17) Y. Yonezawa, et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **435**, 197–206, 2005.
- 18) Y. Yonezawa, et al.: *Int. J. Oncol.*, **30**, 1197–1204, 2007.
- 19) T. Tsuzuki, Y. Kawakami: *Carcinogenesis*, **29**, 797–806, 2008.
- 20) T. Tsuzuki, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1902–1910, 2007.
- 21) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr.*, **137**, 641–646, 2007.
- 22) T. Tsuzuki, et al.: *Lipids*, **40**, 1117–1123, 2005.
- 23) T. Tsuzuki, et al.: *J. Nutr. Biochem.*, **17**, 518–524, 2006.