

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	風 直樹
学位授与の日付	平成28年8月31日	
論文名	<b>Development of analytical and reduction methods of 2- and 3- monochloropropanediol esters in oil products and estimation of their digestion and intestinal absorption</b> （油脂中の MCPD 分析法と低減法の開発および体内消化・吸収の推定に関する研究）	
論文審査委員	主査	北村 進一
	副査	谷森 紳治
	副査	山地 亮一
	副査	乾 博

## 論文要旨

### 第1章 序論

3-モノクロプロパンジオール(3-MCPD)は健康への悪影響が懸念される化合物で、1970年代後半に主にしょうゆなどの調味料の原材料として用いられている酸加水分解植物性たん白から検出され、問題提起された。3-MCPDは、国際がん研究機関(IARC)による発がん性リスクの一覧において「ヒトに対する発癌性が疑われる: Possibly Carcinogenic」に分類され、FAO/WHO 合同食品添加物専門委員会により暫定耐容摂取量が  $2\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{日}$ と規定されている。一方、3-MCPDの位置異性体である2-モノクロプロパンジオール(2-MCPD)は、ヒトの疫学調査あるいは生物学的知見に基づく発癌性リスクを評価する十分な知見が得られておらず、分類がなされていない。

これまでにパーム油をはじめとする精製油脂や油脂加工品から、2-および3-MCPDの脂肪酸エステルが検出されている。またMCPDの類似化合物で、IARCにより「ヒトに対して恐らく発癌性がある」と分類されるグリシドールも、油脂や油脂加工品中からグリシドール脂肪酸エステルとして検出されている。これらのエステル体は摂食後体内で

加水分解を受け、遊離体に変化すると推定されることから健康への悪影響が懸念される。そのため、油脂および油脂加工品中に含まれる MCPD 脂肪酸エステルおよびグリシドール脂肪酸エステル含有量の把握と低減方法の確立が望まれている。

本研究では、従来法より感度や利便性の高い、油脂中の MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの定量法確立と、体内に摂取された MCPD エステルの消化吸收動態の推定に取り組んだ。また、これらの不純物を油脂から削減する方法についても検討した。

## 第2章 第1節 DGF 公定法における 3-MCPD とグリシドールの相互変換

油脂中に含まれる 3-MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの測定法として、GCMS による間接分析法と、LCMS による直接分析法が提唱されている。間接分析法は、油脂中に含まれる 3-MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルを、エステル交換反応により遊離体に変換した後、フェニルホウ酸誘導化を行い、GCMS にて分析する手法である。分析操作が比較的簡便であり、結合している脂肪酸種に関わらず、油脂中の MCPD およびグリシドールエステルの総量を定量できる特徴がある。もっとも古くから利用されてきたドイツ公定法 (DGF standard methods C-III 18 [9]) は、3-MCPD とグリシドールの総量を測定する option A と、酸処理によりグリシドールを除去し 3-MCPD 量のみを測定する option B の 2 つの分析からなり、option A と B の差引きにより、グリシドール量が算出される。

DGF 法により標準物質を既知量添加した油脂の分析を行ったところ、3-MCPD 量が過大評価される、添加した 3-MCPD の回収率が非常に低く感度も低いという 2 つの課題が明らかとなった。

まず、3-MCPD 量の過大評価の原因が option B におけるグリシドールエステルの残存にあると推定し、検証を行った。大豆白絞油に添加したグリシドールエステル標品は、硫酸プロパノールによる加水分解処理 (option B) では完全に除去されず約 10% が残存し、3-MCPD として誤検出されることが明らかとなった。

<sup>13</sup>C-NMR により、DGF 公定法各工程における物質動態を直接観測したところ、3-MCPD とグリシドールの相互変換が確認された。即ち、アルカリ条件下でのエステル交換反応の工程で 3-MCPD の 37% がグリシドールに、続く酸性下で行うフェニルホウ酸誘導化の工程でグリシドールの 74% が 3-MCPD に変換されていた。さらに誘導化の工程では、3-MCPD の大部分がフェニルホウ酸誘導化されておらず、添加した 3-MCPD の回収率が低い要因になっていると推察された。

## 第2章 第2節 DGF 公定法による 3-MCPD 定量精度の改善

DGF 公定法による油脂中の 3-MCPD およびグリシドールの定量分析の下限は、約 1 ppm であった。しかし、天然油脂の 3-MCPD 含量は 1 ppm 未満の場合も多く、検出感度の改善が必須であった。

第 1 章では、DGF 法の誘導化工程でフェニルホウ酸誘導体がほとんど形成されていないことを明らかにした。さらに、誘導化されていない MCPD の大半は、ヘキサン抽出

時の水層に残存しており、これらが添加した 3-MCPD の回収率が低い要因になっていると推察された。そこで、3-MCPD 抽出溶媒を従来のヘキサンから他の溶媒へ置き換え、3-MCPD 誘導体の回収効率の改善を検討した。酢酸エチル、クロロホルムおよび 1-ブタノールにおいて、3-MCPD の回収率が向上した。分析時の取扱いのしやすさから酢酸エチルを選択した結果、DGF 法の抽出効率はおよそ 4 倍に向上し、これによって検出感度は約 0.2 ppm に到達した。

## 第2章 第3節 DGF 公定法による 2-MCPD の動態とその定量法

2011 年当時、2-MCPD は DGF 法で検出されることが示唆されていたが、標準物質は市販されておらず、定量法も確立されていなかった。一方、2-MCPD の合成法は 40 年以上前に報告されているが、最終生成物が 3-MCPD との混合物で、純粋な 2-MCPD を十分量得られなかった。そこで本研究では、まず 2-MCPD の単一合成法を新たに確立した。

さらに合成した 2-MCPD 標品を用いて、DGF 法による 3-MCPD との同時定量法の確立を試みた。内部標準物質として使用する安定同位体標識化合物 2-MCPD- $d_5$  が市販されていなかったため、入手可能な 3-MCPD- $d_5$  を用いて 2-MCPD を定量することにした。DGF 法による GCMS 分析では、2-MCPD は 3-MCPD より長い保持時間に検出され、内標 3-MCPD- $d_5$  添加量に対して直線性を示すことから、定量可能と判断された。また 2-MCPD 誘導体はフラグメントイオンを生成せず、内標に対する見かけの検出感度が 3-MCPD よりも高いこと、3-MCPD に対する 2-MCPD の検出感度が GCMS 機器によらず一定であることを見出した。これに基づいた補正係数を求め、従来の内部標準である 3-MCPD- $d_5$  のみを用いて、高額な 2-MCPD- $d_5$  および分析都度ごとの 2-MCPD 検量線作成を必要としない、2-MCPD 定量法が確立できた。

## 第3章 2-および 3-MCPD エステルの代謝動態と腸管吸収性の推定

3-MCPD は動物実験の高濃度投与において発ガン性が認められているが、その異性体である 2-MCPD は最近まで市販品がなく、毒性や生体への影響も不明である。しかし、一部の油脂や油脂加工品からは 2-MCPD 脂肪酸エステルが微量検出されるため、生体内での挙動の解明が急がれる。本研究では、2-および 3-MCPD ジオレートを合成し、膵リパーゼとパンクレアチンによる加水分解産物をモニターした。また、ヒト小腸上皮モデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 透過性試験により、小腸での吸収性を推定した。

加水分解産物および Caco-2 透過性試験溶液は、荷電化粒子検出器 (CAD) を接続した HPLC で分析し、アシル基結合位置の異なる MCPD モノエステル異性体を分離、定量した。膵リパーゼおよびパンクレアチンによる加水分解の結果、3-MCPD ジオレートからは、3-MCPD-2-オレートが主な分解産物として蓄積し、遊離 3-MCPD はほとんど検出されなかった。一方、2-MCPD ジオレートからは、わずかに 2-MCPD-1-オレートが検出され、時間と共に遊離 2-MCPD が増加した。従って、体内に摂取された 3-MCPD ジエステルは 3-MCPD-2-アシル-モノエステルとして、2-MCPD ジエステルは速やかに分

解され主に遊離 2-MCPD として小腸に到達すると推定された。

さらに、遊離体を用いて Caco-2 細胞における透過性を評価したところ、腸管側に添加した 2-および 3-MCPD はほぼ同様の速度で上皮側溶液に出現し、その輸送機序は単純拡散による透過と推測された。一方、腸管側に添加した MCPD エステルは Caco-2 細胞を透過せず、上皮側溶液から検出されなかった。また、モノエステルの一部は遊離体へと分解され上皮側溶液から検出された。従って、体内に摂取された MCPD ジエステルは腸リパーゼにより遊離体およびモノエステルへと分解され、生じたモノエステルの一部はさらに小腸上皮細胞にて遊離体に分解され吸収されるが、エステル体での吸収は起こらないと推察された。

#### 第4章 食用油脂からの MCPD およびグリシドール類低減法の開発

一般的な油脂は、原料油脂から、脱酸、脱色、脱臭などの精製工程を経て最終製品となる。これまで、油脂の脱臭工程において MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルが増加し、原料に含まれるモノ、およびジアシルグリセロール (MAG、DAG) などの部分グリセリドと塩素化合物がその生成原因であると報告されている。しかし、これらの原因物質を取り除き、MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルを低減させる効果は検証されていない。

そこで本研究では、MAG および DAG をナタネ油に強制添加し、脱臭操作を行った。MAG 添加量に応じた MCPD/グリシドール類の生成量の増加が確認され、10%添加油では、脱臭操作で 60 ppm 生成した。一方、DAG の強制添加は MAG に比べてその影響は小さく、20%添加油でも、MCPD/グリシドール類の生成は 3 ppm に留まった。従って、油脂脱臭工程における MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの生成抑制には、油脂中の MAG を低減する前処理が有効であることが明らかになった。

実際、分子蒸留によりパーム粗油中の MAG を 0.1% 以下、DAG を 2.0% 以下に低減させることで、脱臭操作 (230~250°C、1 時間) 後に生じる MCPD/グリシドール類を 1.8 ppm から 0.8 ppm に抑制することに成功した。

#### 審査結果の要旨

3-モノクロロ-1,2-プロパンジオール (3-MCPD) は、国際がん研究機関による発がん性リスクの一覧において「ヒトに対する発がん性が疑われる」と分類されている。また 3-MCPD の類似化合物であるグリシドールも、「ヒトに対して恐らく発がん性がある」と分類されている。3-MCPD やグリシドールは、油脂や油脂加工品中から脂肪酸エステルとして検出されている。また、3-MCPD とともに、3-MCPD の位置異性体である 2-モノクロロ-1,3-プロパンジオール (2-MCPD) も検出されているが、その定量法は確立されていない

い。これらのエステル体は摂食後体内で加水分解を受け、遊離体に変化すると推定されることから健康への悪影響が懸念される。そのため、油脂および油脂加工品中に含まれる MCPD 脂肪酸エステルおよびグリシドール脂肪酸エステル定量法と低減方法の確立が望まれている。

本研究では、従来法より感度や利便性の高い、油脂中の MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの定量法の確立と、体内に摂取された MCPD エステルの消化吸収に関する知見を得ることを目的としている。また、これらの不純物を油脂から低減する方法についても検討している。

第2章では、油脂中に含まれる 3-MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの測定法であるドイツ公定法(DGF法)の問題点を明らかにし、その改良に取り組んでいる。まず、DGF法におけるグリシドールエステルの分解工程において、グリシドールエステル標準品が残存し、3-MCPD として誤検出されることを明らかにした。さらに、<sup>13</sup>C-NMRによりDGF法各工程における物質動態を直接観測したところ、3-MCPDとグリシドールの相互変換が確認された。これらがDGF法において分析誤差を生じる要因であると結論した。また、DGF法では、MCPDの大半は誘導化されず、ヘキサン抽出時の水層に残存しており、検出感度が低い要因になっていると推察された。そこで、3-MCPD抽出溶媒を従来のヘキサンから酢酸エチルに置き換えた結果、抽出効率はおよそ4倍に向上し、これによって検出感度は約0.2 ppmに向上した。

さらに、新たに合成した2-MCPD標品を用いて、DGF法による3-MCPDと2-MCPDの同時定量法について検討をしている。DGF法によるGC-MS分析では、2-MCPD量は内部標準である3-MCPD-d<sub>5</sub>の添加量に対して直線的に増加を示すことから、定量可能と判断された。また2-MCPD誘導体はフラグメントイオンを生成しないので、GC-MS機器に依存しない補正係数を求め、従来の内部標準である3-MCPD-d<sub>5</sub>のみを用いた3-MCPDと2-MCPDの同時定量法を確立した。

第3章では、2-および3-MCPDエステルの代謝動態と腸管吸収性の検討が行われている。2-および3-MCPDオレイン酸ジエステルを合成し、膵臓リパーゼとパンクレアチンによる加水分解産物を同定、定量した。膵臓リパーゼおよびパンクレアチンによる加水分解の結果、3-MCPDオレイン酸ジエステルからは3-MCPD-2-オレイン酸モノエステルが、2-MCPDオレイン酸ジエステルからは遊離の2-MCPDが主な分解産物として検出された。従って、体内に摂取された3-MCPDジアシルエステルは、3-MCPD-2-アシルエステルとして、2-MCPDジエステルは、速やかに分解され主に遊離の2-MCPDとして小腸に到達すると推定された。

さらに、ヒト小腸上皮モデルであるCaco-2細胞膜を用いた透過性試験により、小腸での吸収性を推定した。腸管側に添加した2-および3-MCPDはほぼ同様の速度で基底側溶液に溶出されることが示された。一方、MCPDモノエステルはCaco-2細胞膜を透過せず、その一部は遊離体へと分解された後、基底側溶液から検出された。従って、体内に摂取されたMCPDジエステルは膵臓リパーゼにより遊離体およびモノエステルへと分解され、生じたモノエステルの一部はさらに小腸上皮細胞にて遊離体に分解され吸収されるが、エステル体での吸収は起こらないと推察された。

第4章では、食用油脂からのMCPDおよびグリシドール類低減法の開発について検

討している。その結果、油脂中のモノアシルグリセライド(MAG)を低減する前処理が、脱臭工程により生成する MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルを抑制に有効であることを明らかにした。実際、分子蒸留によりパーム粗油中の MAG を 0.1%以下に低減することで、脱臭操作により生じる 3-MCPD の生成量を 1.8 ppm から 0.8 ppm に、2-MCPD 量を 0.4 ppm から 0.2 ppm に抑制することに成功した。

本研究の成果は、油脂中の MCPD およびグリシドールの脂肪酸エステルの定量法を確立したことと、体内に摂取された MCPD エステルの消化吸収動態について明らかにしたことである。また、これらの不純物を油脂から低減する方法についても検討して具体的な油脂加工法の改良について示したことも、高く評価できる。これらの成果は、応用生命科学特に、食品分析化学や農産製造学などの分野の発展に寄与するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。