

論文の内容の要旨

論文題目

2-/3-MCPD脂肪酸エステル類、グリシドール脂肪酸エステル類の酵素的間接分析法の開発

氏名 宮崎（中村）絹子

1. 緒論

3-クロロ-1,2-プロパンジオール脂肪酸エステル類 (3-MCPD-Es) 及びグリシドール脂肪酸エステル類 (G-Es) は、油脂の精製（主に脱臭工程）で生成することが近年明らかとなった新たなリスク物質である。リスク管理措置の必要性を検討するための基礎データを得るには、食用油脂中の3-MCPD-Es及びG-Esの分析法が必須であった。2007～2009年、ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）が3-MCPD-EsとG-Esの健康影響評価を公表した当初、油脂中の3-MCPD-Es、G-Esの主要な分析法として、ドイツ脂質科学会（DGF）標準法C-III 18 (09)が用いられていた。しかし、この方法は分析精度に問題があることや、分析中に分析種間の意図しない変換が生じることが指摘されたため、2010年以降には各国で、食用油脂を対象とした精度の高い分析法の開発が進められてきた。分析法は、直接分析法と間接分析法の2つに大別される。3-MCPD-EsやG-Esは結合する脂肪酸の種類、結合位置・数により、数十の類縁化合物が存在する。直接分析法は、各物質を区別して定量することができる。一方の間接分析法は、単一の物質に分解後、誘導体化してガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）にて分析する。脂肪酸の種類や結合位置・数に関わらず、3-MCPD-EsとG-Esを同時に定量出来るため、必要な標準試薬の種類も少なく、簡便である。現在、間接分析法はスクリーニング分析や品質保証に用いられている。

間接分析法のエステル型分析種の分解手法として、通常は酸性やアルカリ性条件下のメタノリシスが使われるが、3-MCPD-EsとG-Esは類似構造であり、pHの変化により容易に分析種間の意図しない変換が生じることが報告されていた。そのため、分析法開発の最重要課題は、3-MCPD-EsとG-Es間の意図しない変換を防いだ分解手法の確立であった。当時報告された間接分析法の多くは、意図しない変換を生じさせない穏やかなメタノリシス条件を見いだすことで、この課題を解決していた。2013年に米国油化学会（AOCS） Official Methodに登録されたCd29aは希硫酸、Cd29bは低濃度のアルカリ、かつ低温（-22～-28℃）と、穏やかな条件下において16時間かけてメタノリシスを行うため、GC-MS検液の調製に2日間を要する分析法であった。

本研究では、3-MCPD-EsとG-Esの分解手法としてリパーゼに着目し、食用油脂（植物油脂、動物油脂）及び脂質含有食品中の3-MCPD-Es、3-MCPD-Esの位置異性体である2-クロロ-1,3-プロパンジオール脂肪

酸エステル類（2-MCPD-Es）、G-Esを精度良く、迅速に同時定量できる酵素的間接分析法の開発を目的として、研究を行った。さらに、国内に流通する食品の品質管理に活用できる方法とするため、複数機関による合同試験を実施し、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録を目指した。

2. 酵素的間接分析法の開発

食用油脂中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの分析法の開発において、リパーゼによる加水分解手法を用いることで、精製・分析中の分析種間の意図しない変換を抑制し、かつGC-MS検液の調製が迅速である、酵素的間接分析法を開発することができた。3-MCPD-Es、G-Esは類似構造であるため、酸性、アルカリ性pHでは分析種間の意図しない変換が容易に生じることが報告されていた。本研究では、2つの理由からリパーゼを用いた加水分解に着目し、間接分析法の開発に着手した。1つ目は、リパーゼの多くは最適pHが中性付近にあり、極端な酸性、アルカリ性pHにせずつとも3-MCPD-Es、G-Esの分解を行うことができ、pH変化による分析種間の意図しない変換を抑制できることである。2つ目は、分解の迅速化である。リパーゼはその由来や反応条件によって、脂肪酸の種類と結合位置、等に対する反応特異性を有するため、基質に適したリパーゼの種類、反応条件を見いだすことは容易ではない。一方で、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esに対して分解特異性の高いリパーゼ及び適した加水分解条件を選定できれば、分解を迅速に完了できると考えた。検討の結果、油脂試料をイソオクタンに溶解し、*Candida cylindracea*（または、*C. rugosa*）由来のリパーゼ含有臭化ナトリウム（NaBr）水溶液（pH 5.0）中で室温、30分間振とうすることで、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esをそれぞれ3-MCPD、2-MCPD、グリシドールに加水分解する手法を見いだした。また、分解後のリパーゼ含有NaBr水溶液を80℃、10分間加温することで、構造的に不安定なグリシドールを3-ブromo-1,2-プロパンジオール（3-MBPD）へと臭素化し、次いで、各遊離型分析種のフェニルボロン酸（PBA）誘導体化物をGC-MS分析することで、各分析種を同時に定量可能な酵素的間接分析法を開発した。

AOCS Official Method Cd29a、Cd29bのメタノリシスは、3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Esの分解に16時間を要するのに対し、本分析法の加水分解は0.5時間で完了する。さらに、油種や油脂の物性、脂肪酸組成に関わらず、幅広い食用油脂（魚油を除く）に適用できることを明らかにした [Miyazaki, K et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **89**, 1403-1407 (2012), Koyama, K.; Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **64**, 1057-1064 (2015)]。

3. 合同試験

市場に流通する食品の品質保証や、国内の含有実態調査に、迅速、かつ簡便な酵素的間接分析法を活用してもらうため、日本油化学会 基準油脂分析試験法への登録を目指した。登録の必要条件の1つであ

る、「実用に供しうる室間再現精度を有すること」を確認するため、全13機関にて合同試験を実施した。合同試験用の油脂試料として、3-MCPD、2-MCPD、グリシドール相当濃度 0.61~4.64 mg/kgを含むパーム液体油、パーム固体脂、なたね油3種、米ぬか油を調製し、参加機関に配布した。本合同試験では、併行精度の相対標準偏差 (RSD_r) は1.8~8.4%、室間再現精度の相対標準偏差 (RSD_R) は5.0~18.1%であり、酵素的間接分析法は十分な室間再現精度を有することが確認できた。さらに、2013年にAOCSが実施したOfficial Method 3法の合同試験において、遊離型相当濃度 1~11 mg/kgのパーム油を油脂試料として用いた場合の RSD_r は3.5~9.9%、 RSD_R は6.4~31.8%であったため、酵素的間接分析法はAOCSの合同試験結果と比べて同等以上であることが示された。合同試験結果により、酵素的間接分析法は十分な室間再現精度を有することを認められたため、2016年6月に日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法 2.4.14-2016として登録された [Koyama, K.; Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **65**, 557-568 (2016)]。

4. 魚油を対象とした酵素的間接分析法の改良

酵素的間接分析法の特徴である、*C. cylindracea*由来リパーゼを用いた2-/3-MCPD-Es、G-Esの加水分解は、他法と比べて迅速に完了する。一方で、*C. cylindracea*由来リパーゼはドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタン酸 (EPA) に対する分解特異性が低いため、DHAが結合した3-MCPD、グリシドールの分解には不向きである。そのため、基準油脂分析試験法 基準法2.4.14-2016の適用範囲は、植物油脂と『魚油を除く』動物油脂である。DHAが結合した3-MCPD、グリシドールの分解に適したリパーゼの種類及び加水分解条件を検討した結果、①*Burckholderia cepacia*由来リパーゼの選定、②NaBrの添加を加水分解前から分解後に変更することにより、魚油を対象とした改良法を確立した。この方法は、日本油化学会 基準油脂分析試験法 奨7-2017 (推奨法)として登録された [Miyazaki, K. et al., *J. Oleo Sci.* **66**, 1085-1093 (2017)]。

5. 酵素的間接分析法の油脂含有食品への適用

食用油脂を原料とした食品の製造・家庭調理中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態、油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの濃度を把握するためには、分析法の適用範囲を食用油脂から油脂含有食品にまで広げる必要がある。初めに、食用油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できる油脂含有食品群を確認した。油脂含有食品のうち、マヨネーズ、マーガリン、ファットスプレッド等の高脂質食品は酵素的間接分析法をそのまま適用できた。AOCSは、食用油脂を対象とするAOCS Cd29aに、前処理であるCd30-15を追加した分析法を報告した。高脂質食品14種を、酵素的間接分析法と、Cd30-15を追加したAOCS Cd 29aを用いて分析し、得られた分析値を比較したところ、同等であることが示された。一方、

調製粉乳やルウのように、脂質濃度が比較的低く、副原料の多い食品は、酵素的間接分析法の精製では不十分であったことから、簡易な前処理法を追加した後、酵素的間接分析法で分析した。前処理の追加により、水溶性の食品成分を除去することができ、調製粉乳中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを分析できることを確認した。これらの結果より、高脂質食品の分析には、脂質抽出等を必要とせず、油脂を対象とした酵素的間接分析法をそのまま適用できること、副原料の多い食品の分析には、酵素的間接分析法に簡易な前処理を追加することで適用できることを明らかとした [Miyazaki, K et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **93**, 885-893 (2016)]。

まとめ

本研究では、2-/3-MCPD-Es、G-Esの加水分解に*C. cylindracea*由来リパーゼを用いることにより、食用油脂（魚油を除く）及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esを精度良く、かつ迅速に定量できる酵素的間接分析法を確立した。また、*C. cylindracea*のDHA、EPA等に対する分解特異性の低さにより、酵素的間接分析法の適用範囲外であった魚油に対しても、*Burkholderia cepacia*由来リパーゼを用いた改良法を確立できた。同時期に報告されたAOCS Official Method 3法のうち、Cd29a、Cd29bはメタノリシスのみに16時間を要する。Cd29cは、3-MCPD-EsとG-Esを同時分析できず、1試料につき2つの方法で分析する。酵素的間接分析法の加水分解は0.5時間で完了するため迅速であり、分析の補正には遊離型分析種-*d*₃を用いるため、検量線用の標準試料は誘導体化以降の操作のみで済み、簡便である。そのため、作業効率が良く、食用油脂中の安全性評価等に用いる分析法として適した方法であると考えられる。複数機関による合同試験においては、油脂の物性や油脂中の2-/3-MCPD-Es、G-Es濃度の高低に関わらず、実用に供しうる室間再現精度を有することが認められたため、日本油化学会 基準油脂分析試験法 基準法として登録された。魚油を対象とした改良法は、基準油脂分析試験法の推奨法として登録された。油脂含有食品に関しては、さらに幅広い食品群を対象とした酵素的間接分析法の性能評価を今後実施し、未だ不明点が多い油脂含有食品の加熱（製造、家庭調理）による2-/3-MCPD-Es、G-Esの動態把握の研究を行っていきたい。

今後も、食用油脂及び油脂含有食品中の2-/3-MCPD-Es、G-Esの含有実態調査、有害性の評価が進められるだろう。食品業界でも、自主的に、原料や製品中の3-MCPD-Es、2-MCPD-Es、G-Es濃度の把握、低減策の開発の取り組みがされると推測する。酵素的間接分析法が市場に流通する食品の品質管理に活用されることを期待する。