

Table 6. *In vivo* inhibition of lipase in rat liver by methyl linoleate hydroperoxide.

Group	Lipase activity ($\mu\text{mol}/\text{Prot. N mg}/\text{hr.}$)
Basal diet	0.82
+ Methyl linoleate (1st day)	3.82
(6th day)	1.34
+ Methyl linoleate hydroperoxide (1st day)	1.96
(6th day)	0.56
+ Hydroperoxide + vitamin E acetate (1st day)	2.42
(6th day)	1.02

4. 過酸化脂質投与ラット肝臓におけるリパーゼ活性
 脂質過酸化物が生体内の種々の酵素系を抑制することについては多くの報告^{11,12)}があるが、著者らも過酸化脂質を与えたラットの肝臓にトリグリセリドが蓄積する原因がリパーゼ活性の阻害によるのではないかと考え、つぎの実験を行った。飼料に過酸化ラットに、飼料を保管により1匹当り0.15 mlを強制投与してから1日および6日経過後ネズミを殺し直ちに肝臓を取出してリパーゼ活性を測定した。その結果はTable 6のとおりで、過酸化脂質はリパーゼ活性を低下させ、ビタミンEはこの活性低下を回復させる能力があるものように考えられる。

文 献

- 1) 金田・石井・酒井・原井：東海日本朝報(12), 18 (1955).
- 2) H. S. OLCOTT and A. DOLEY: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 114, 820 (1963).
- 3) R. T. HILMAN and S. I. GREENBERG: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 707 (1958).
- 4) 岡田・加藤・古賀：第118回脂質性ビタミン総合研究委員会発表, 1969年3月29日; ビタミン, 39 (5), 350 (1969).
- 5) J. S. ANDREWS, W. H. GRIFFITH, J. F. MEAD, and R. A. STEIN: *J. Nutr.*, 70, 199 (1960).
- 6) T. NISHIDA and F. A. KUMMEROW: *J. Lipid Res.*, 1, 450 (1960).
- 7) J. GLAVIND and N. TRYDING: *Acta Physiol. Scand.*, 49, 97 (1960).
- 8) P. DUBOULOZ, J. LAURENT and J. DUMAS: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1740 (1951).
- 9) P. DUBOULOZ, J. FONDARAI, and C. LAGARDE: *Biochem. Biophys. Acta*, 3, 371 (1949).
- 10) Y. G. PARTESHKO: *Vopr. Fiziol. 23* (5), 20 (1964).
- 11) 竹内昌昭：原子力平和利用研究成果報告書, 昭和41年度4頁, 昭和42年度2頁, 昭和43年度2頁; ビタミン 36 (2), 187 (1967).
- 12) H. KAUNITS: "Biological Effect of Atherosclerotic Lipids" in *Lipids and Their Oxidation* ed. by H. W. SCHULTZ, 260, The Avi Publ. Co. Inc., Westport (1961).
- 13) E. DECKWITZ and K. LANG: *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 64, 893 (1962).
- 14) F. BERNHEIM, K. M. WILBUR, and C. B. KENASTON: *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 117 (1952).
- 15) A. PIHL and R. LANGE: *J. Biol. Chem.*, 237, 1356 (1962).
- 16) E. SCHAUBENSTEIN: *J. Lipid Res.*, 8, 417 (1967).

討 論

金田尚志(東北大学): 白ネズミ、マウスに酸化油脂を与えた場合、致死率は飼料の種類、精製度などにより異なるとする著者の御意見には賛成である。私も高度不飽和酸、リノール酸などの酸化物を上記動物に与えた場合、たとえPOVが同じであっても、毒性に差があり、これは、二次酸化生成物に起因すると考え

ている。

御意見によると、過酸化脂質はそのまま吸収されるのではなく、二次分解物として吸収されると御考えのようであり、Table 2の結果もこれを裏付けている。しかし、Table 4において、第1日目の排泄物に匹敵する放射性が排泄に見出されているが、これはどのような形のものか、もしも過酸化脂質の形で排泄されるとすると、上記の御意見と矛盾すると思うので、この点を伺いたい。

表巻: 著者の使用した過酸化脂質はリノール酸のカルボキシル基にある炭素をラベルしたものであり、ラベルしたリノール酸メチルヒドロ過酸化脂質であるため、体内より回収した脂質の示す放射性はこの炭素の存在を示している。従ってTable 4の結果も、一旦は過酸化脂質の形でネズミに経口的に与えられた炭素の存在を示している。カルボキシルの炭素が見出されたことを示すに過ぎず、この物質が依然として初めの過酸化脂質の構造を有しているかが不明である。著者もできれば過酸化脂質を調製する際の標識に¹⁴Cを使うことなどを考えてはいるがまだ実験に着手していない。またこうした方法によっても当初過酸化脂質の構造中に組み込まれた炭素の存在が判明だけで、過酸化脂質の構造がそのままで残っている証明にはならない。多くの研究者による報告でも、過酸化脂質の投与後、動物体内より回収した脂質中に炭素ラベルの存在を示した例はほとんどない。これらと著者自身の実験結果から、著者は体内に存在する形は初めの過酸化脂質の構造を有し、過酸化脂質ができてきたときに出来た、共役双結合や、二分子の重合などでできた構造を有し、POVの測定などで証明できるような構造の炭素よりなる過酸化脂質構造を持たない物質例えは高分子のカルボニルなどを想像している。従って、著者自身の実験結果は相互に矛盾するものとは考えないが、毒性の本体が二次分解物であるとい一切には今後の検討が必要であらう。

東 秀雄(駒沢女子大学): Free Eの方がEster型Eよりも過酸化脂質の毒性に対し無効化が有効であることは、Free Eの方が過酸化脂質が強いといわれた。POVが皮下のものに体内に吸収された場合、かかる過酸化脂質をさらに酸化することを防ぐような抗酸化性をEに期待することは少し無理ではないか。Free Eの方が毒性中和力が大であつたとしても、それは抗酸化性以外の毒性中和能力にあるのではないか。抗酸化力が毒性中和力と密接な関係があるのであれば、毒性中和力が α -E, γ -E, δ -Eの順に大となるような実験結果が得られたならば著者のいわれることも有力となると思う。

表巻: 遊離のビタミンEの方が、エステル型ビタミンEよりも、投与した過酸化脂質に対して有効であり、加熱分解物に対しては、いずれも無効なことは、(体内におけるビタミンEの効果以外に、腸管中あるいは腸壁など、外部に近いところでのビタミンEのperoxide decomposer的作用を想定しなければならず、この点著者自身も結果の解釈に苦しんでいる。御提案のように、生物学的効力と抗酸化力を異にするトコフェロールの異性を使用すれば、これらの点の解明に役立つのではないかとと思う。いずれ、こうした実験を行なつた上で、御質問にお答えしたいと思う。

た7~10日間で多くの動物がへい死するような毒性の高
いニゴキシン化した油 (EN, 105~112) ではコウロキヤシ油の
摂取量は未処理油のそれとほぼ同一であった。Rajivら¹¹⁾
は空気存在下で 270°C, 8hr 加熱した落花生生油、コ
ナツ油などをラットに投与したところ、成育低下とと
もに肝の門脈周辺に脂肪沈着が観察された。また加熱落
花生油では肝のビタミンE群の含有量が減少し、血糖、
コレステリンが増加、炭水化物の摂取と吸収とが平行し
なかった。

Kaunizら¹²⁾は綿菜油、オリブ油、ワトリ、牛脂な
どを 60°C, 40hr 通気しながら酸化させ、ラットに投与
したところ、未処理油と比べ死亡率は増加したが腎臓
腫、肝、心臓の構成脂肪酸、肝、脳のコレステリンなど
には著しい差異は認められなかった。しかしながら心臓
障害を発生してへい死したものが多く、とくに綿菜油に
あってはその割合は高かった。しかしながら心臓
くとも、加熱によって脂肪酸を重合させた生成物も同じ
ような毒性を有している¹³⁾。Potreau と Cluzan¹⁴⁾ は三
角料のラットを2ヶ月間飼育して、その作用を調べた。
最も著しい加熱処理を行なった油 (空気不含有, 275°C,
40hr) はやはり毒性が強く、1~2ヶ月ではとんどの動
物がへい死した。未処理油とほかの処理油 (空気存在,
220°C, 40hr; 空気不含有, 同一処理) との比較では、成
育率、摂食率、消化率は低下したが栄養利用率は大差
はなかった。この結果から加熱によって生成した重合物
と原料中の含窒素成分との間で、消化管中において
吸収阻害物質が生成することはないようである。なお
肝、腎の血管の充血により腫大したもののみならず、
高温加熱処理したものでこの阿膠器に對し致死を起こ
させる毒性が観察されたことと述べている。Griem¹⁵⁾はダイ
マー化した脂肪酸を多量添加した飼料でラットを飼育し
たが、32週間で精子形成の障害がみられ、肝のクニベ
ニル細胞や他の組織の網内系細胞に色素の沈着が認めら
れた。この色素は不溶性の鉄含有セッケンであり、恐ら
く採取した脂肪酸と重金属との結合によって生成したも
のと考えられる。

つぎに加熱劣化油の発ガンについてみると、Arfima-
nn¹⁶⁾は従来の発ガン性試験法で適当なものがないので、
迅速なスクリーニング法を開発したため、イモリの尾
部に炭体を注射することを提唱している。発ガン性は
表皮増殖と皮膚の萎縮による生育低下によって示される
もので、加熱劣化油やニゴキシン化した大豆油は毒性で
あったが、過酸化重合油 (P.O.V. 33~409) では弱く、
そして急性毒性を示すリノール酸エチルとドデカノールキ
シド (P.O.V. 750~1500) では明らかに弱性であった。
この結果から過酸化重合油と発ガン作用とは関係があり

部分的水添した綿菜油、大豆油および豚脂などで野菜、
魚介類を揚げたフライ油をラットに2ヶ月間投与した
が、明らかな病状は観察されず、ただ吸収の低下から成
育阻害が一部の動物にみられた程度であるとしている。
最近、deep-frying 中に種々な化学的反應によって生
成する揮発性物質についての報告^{17,18)}もあるが、揚げ
た食品の風味と深い関係があることもさることながら、
これらの多くの化合物について長期投与試験とその毒性
について安全性を定めておくことは、人の健康、とくに
喫煙や吸入によって発生する可能性のある危害につい
て知るために重要な要素である。日常、deep-
frying によって揮発性物質を吸入する人は、たとえ
アクリンがほとんど存在しなくとも、総炭や呼吸系
に慢性の炎症をもたらし危険性もあるといわれている¹⁹⁾。

最近、とくに加工食品中の多価不飽和脂肪酸の消費が
年々増加していることは人の健康保持、栄養補給に望ま
しいことではあるが、一方、調理、加工時における油脂
からの有害生成物について、さらに広く、深く、その特
性を知ることは健全な食生活を営むうえに重要であり、
意義深いものと考えられる。

2 自動酸化劣化油の毒性

油脂を含有した飼料は長期飼育の保藏中にはしばしば自動
酸化を起こすことがある。Carpenter²⁰⁾は、このよう
な飼料を動物に投与して、その安全性を調べた結果、
市販品で元分栄養的に適したものであれば、ビタミンA
やEの損失を最少限にとどめるか、あるいはこれらに
タミンを補充さえすれば、少しも有害なことはないとい
べている。また、市販の飼料に5%酸化劣化油 (P.O.V.
93) を添加したもので、幼ラットを飼育したが、発育に
は阻害作用は認められず、一部に肝のビタミンA含量が
低下したものがあつたが、成育は正常で、とくにビタミン
A, Eの欠乏症は認められなかつた²¹⁾。七面鳥のヒ
ナでは各種条件下で自動酸化したアンチオキソビニール油を1.5
%添加飼料で飼育してもほとんど影響が現われなかつ
た²²⁾。また子ブタでは高い P.O.V. (100 μmol/g) の油
脂を17%添加した飼料で飼育したが成育にわずかながら
低下がみられる程度であつた²³⁾。

以上の結果から、かなり低レベルの酸化劣化油でも、あ
る種のビタミン、とくにAやEの欠乏のしつこく飼育し
た場合は、急速な欠乏症候を呈するようである。
他方、Waravdekar²⁴⁾は酸化劣化油の毒性について異
なった見解をとっている。紫外線照射したリノール酸の
水抽出物をマウスの腹コウ (雄) 内に注射して、肝の萎
化 (萎死、皮膚の炎症、肥厚など) や肝のタンパク量の
増大などを観察している。この照射物質はイオン化放射
線照射したもの²⁵⁾と同様なペルオキシオキソビニール化

合物が含まれているが、はたしてこれらの病変に對し、
これらの化合物が何ほどの作用を及ぼしたかは明確な証
明もない。またこのような手法も毒性を知ることに有
効な手段かもしれないが、この動物実験でただちに劣化
物の生物に對する毒性をうんぬんすることははなはだ危
険であるように思われる。以上種々な報告についてごく
簡単にふれてみたが、つぎに、著者が最接近してま
た自動酸化劣化油の毒性とその性状について紹介してみ
よう。

3 自動酸化劣化油のサルに對する 長期経口投与試験²⁶⁾

著者は脂質過酸化油の慢性毒性に關する研究の一環
として不飽和脂肪酸およびその過酸化物をサル (カンキ
イザル, *Macaca irus*) に對し長期投与して、その慢
性毒性の試験を行なった。飼料のリノール酸誘導体の特
性および投与法は表-1の通りであり、試験動物のカニ
イザル (推定 2~3 オ) はベトナム産の健康なものを
用い、投与量はそれぞれ1日当たり 100mg 相当量を
2~3日おきに連続経口投与して飼育した。この間、過
酸化物群 (AC-32-POR) の雌サル1匹は4ヶ月目で病

表-1 リノール酸誘導体およびその過酸化物の特性和投与法

化 学 名	AC-32 (リノール酸誘導体)	AC-32-POR (リノール酸過酸化物)
投 与 法	I.V. 131~139 P.O.V. 0 A.V. 2~3	127 616~659 2
試 験 動 物	カニイザル (2~3オ)	カニイザル (2~3オ)
投 与 量 (サル/日)	100mg	100mg
試験期間	14ヶ月	12ヶ月

表-2 サルに對する慢性毒性試験・検査項目

A. 血液検査	4. 総蛋白コラーゲン
1. ヘマトクリット	5. 白血球分類 (%)
2. プロトロンビン	
3. 生化学的検査	
1. 血清タンパク	5. 血清 G.O.T.
2. 血清ビリルビン	6. 血清 G.P.T.
3. 血清コレステリン	7. 血液尿酸濃度
4. 血清アルカリホスファターゼ	
C. 体重 (成育率)	
D. 病理、解剖所見	
1. 剖検による慢性毒性所見	
2. 各臓器の病理組織学所見	
腎、肝、心、脾、副腎、大・小腸、胃、膵臓、リン パ節、生殖腺、下垂体、甲状腺、骨髄、脂肪	
E. 尿、コレストリン、血清	

死(病期)したが、ほかは実験終了まで生存した。なお試験期間中毎月1回定期的に採血して、血液一般および定量的検査を行なうとともに実験終了後はすべて尿投与リン性毒薬などの有無に關しては病理組織学的検査などにより観察した(表-2)。

これらの実験結果から、特記すべきことは AC-32、POR 群では投与後8ヶ月目に至り血清中の脂質が平常の3~4倍量に急上昇し、その後終了まで低下をみせなかった。また、病理解剖所見では AC-32 群では肺、心、肝などにおける程度脂質代謝の亢進状態を示したが、とくに病的とはいえないものであった。一方、AC-32、POR 群では両肺の脂質肺炎(lipid pneumonia)、副腎腫瘍、こととに皮質の肥大と脂質の増加、生細胞の機能亢進などがみられ、一般に lipid pneumonia を含む脂質代謝の亢進状態を示していた。このほか、発ガン性やコレステリン性腫瘍はみられなかった。

4 食品含有油脂の劣化とその毒性について

食品中に含有、混和した油脂の酸化変質によつて生成した毒性物質の本体を単純、同定するとともに、その生成機構を追究し、能害の防止とともに後知能を確立し、あわせて急性毒性機構と重量摂取による慢性毒性などを解明するため、本研究を実施してきたのでここに現在までの研究の概要について述べてみよう。

昭和33年秋ころから登場した即席めん類は、今日では年産30数億食といわれ、インスタント食品の代表的なもの一つである。しかし昭和30~40年にかけてその製造工程あるいは保蔵時に充分なる衛生的管理のもとで処理されないうちに質劣化したと思われ、即席めん類によつて、大都市を中心に、その周辺の各地で食中毒が頻発した。そのおもな症状は食後1~3hrで嘔吐、吐、腹痛などに加え、下痢を伴う一過性の急性食中毒であり、その原因物質は揚げめん類に含まれる油脂の酸化変質による生成物であつて、とくに激しい下痢を伴うものには、P.O.V.やA.V.が異常に高く、製造過程もしくは製品管理の面で非衛生的な取組による変質に原因するものと推定された。

著者はたまたま昭和40年3月、神奈川県下で発生したインスタント・スパゲッティによる急性食中毒後体を入手したので、正常体との差異を比較検討した。

4-1 食中毒後体(インスタント・スパゲッティ)の毒性と、その分別

4-1-1 マウスに対する毒性
正常後体ではなんら異常は認められなかったが、中毒後体の飼料投与群では5日目ころより歩行異常、被毛粗剛、体重の減少、および下痢を呈し、6~7日目まで全動物がへい死した。これらの前後所見では全例に栄養状態が

悪く、脾の黄血および萎縮がみられ、また小腸および胃腸の肥厚や結腸の肥厚などが認められた。さらにこの中草後体から含有油脂を抽出して、1回の投与量と、この中草後体を観察したところ、投与後24hrで激しい被毛粗剛および下痢を呈し、48hr以内に全動物がへい死した。前後所見では中草後体そのものを飼料として投与したものと同様、主要な病変は腸管にみられ、全般にわたつて内腔は拡張し、内容物は水溶性であった。また、組織学的所見では腸の病変は小腸性腸炎が認められた。小腸の粘膜上皮は腫大し、胞体内に空ホウがみられ、核が淡明となり腫大し、ときには核破壊も認められた。また上皮細胞の酸性ハグ腫もみられ、ジュウ(核)毛は短く、充血と水腫がみられ、細胞浸潤も程度ではあるが認められた。その他、腸壁筋層や神経叢の炎症も軽度認められた。他方、大腸では上皮細胞の核染色が著しく、粘液染色によつて明瞭にカルシウム性腸炎を認めた。小腸の病変におけると同様にカルシウム性腸炎を認めた。脾臓は赤脾臓の洞内にほとんど赤血球を認めず、わずかに内皮細胞の腫大と増数がみられたほか、肝臓および脾臓の肥厚が認められたが白脾臓についてはまったく変化を認めなかった。

4-1-2 毒性物質の分別
以上の上記に、スパゲッティに含まれる酸化変質油脂の毒性は、とくに腸管の粘膜に直接作用して、急性のカルシウム性腸炎をきたしたものと推定された。

4-1-2 毒性物質の分別
上述毒性抽出油について、毒性物質の分別と、その毒性について検討を試みた。

まず抽出油(P.O.V. 430 meq/kg; A.V. 23)を各級別、カラマシロマトにより分別し、F-I-Xの9分画を得たが、CHCl₃:EtOH(1:1)によつて溶出してくるF-III(P.O.V. 125 meq/kg)に毒性が認められ、これはマウスに対し0.4mlの投与量でも激しい下痢を伴い5~6hr後にへい死した。さらにこの区分を脱脂処理後、メタノールシシして再びカラマシロマトグラフによつて分別して、F-A-Cの3分画を得たが、クロホルムおよびエーテルによつて溶出されるF-B(0.2ml投与、2hr以内にへい死)のみに毒性が認められた。この区分は未だ数種類の混合物であるので再度カラマシロマトにより精製を繰り返して、ベンゼン、クロホルム、エーテル、メタノールおよびメタノールで溶出してF-a-d区分に分画したが、とくにベンゼン-クロホルムおよびクロホルムで溶出されるF-bは毒性が最も激しく、また酢酸臭を有する赤カサ色粘着性油でP.O.V.はむしろ低かった。IR, TLCおよびGLCなどによる定量的試験からいふと単品としてとらえられないが、極性が高く、水酸基が特徴的であつて、カルボニルおよびtrans-二重結合の存在が認められた。またこの毒性は、マウスに対する1回の投与量(0.05ml)で、

30 min 後には運動機構となり、1~1.5hrで歩行の異常が認められた。さらに2~2.5hrで歩行不能となり、3hr後にはへい死した。前後では上述同様におもな病変は腸管にみられ、小腸では全腸管あるいは中部位にわたつて認められた。腸管の肥厚はあまりなく、灰白色の赤も認められ、まれに粘膜面に赤色斑点が認められた。そのほか一部に脾臓の腫大、胃の拡張、腎臓の異常などが認められた。また組織学的所見では、とくに小腸のうろち十二指腸の絨毛は全体として太く、低くなり異常を呈していた。結腸の固有層には明らかに水腫が認められたが、上皮細胞にはほとんど異常は認められなかった。なお空腸、および回腸の両者では粘膜炎層に十二指腸同様にも水腫が認められたが、ジュウ毛、上皮細胞には変化がみられなかった。以上共通的なものとしては慢性カタル性腸炎を発生する以前に死の経過をたどる結果、病理組織学的には、なお致死性毒性については不明の点が多いようである。

4-2 光線照射による即席めん類(揚げめん)中の油脂の劣化と、その毒性

揚げめん類のような油脂食品にあつては、製造あるいは保蔵管理に非衛生的な取組方をすると油脂が酸化変質して悪臭や食中毒事故を発生したり、人の健康に危害を及ぼすことが、われわれは市場における実用上の留意点も含めて、油脂食品の劣化機構とその毒性を究明すべく、光線照射によつて油脂の自動酸化とその毒性についてたまたま再現しうるものか否かをモデル実験によつて追究してみた。

4-2-1 直射日光照射による油脂の劣化と、その毒性

市販の正常揚げめんとその揚げ油、煎菜油(本菜なら使用過度のため廃棄すべき揚げ油)および煎菜油(煎菜油をさらに至温で2~3ヵ月放置した揚げ油)でそれぞれ製造した揚げめんとその揚げ油を直射日光下に500~600hr照射し、その間、経時的に試料を採取して、化学特性和その毒性を後述した。

4-2-1-1 正常揚げめんとその揚げ油

通融後体は照射時間に伴つて急激な上昇がみられ、300hr(P.O.V. 549)で最高値を示した。またI.V.は150hrまでは比較的ゆるやかな減少を示したが、それ以上経過すると以前に比してやや急激に減少する傾向がみられた。他方、A.V.はP.O.V.と類似した傾向がみられ、125hr以後、著しい増加を示した。マウスに対する毒性(1.0ml/マウス/1回投与)は揚げめん抽出油および

揚げ油とともに、250hr程度の照射ではまったく毒性は認められなかったが、抽出油では300hr(P.O.V. 549, A.V. 15), 揚げ油では413hr(P.O.V. 350, A.V. 16)ころより毒性が現われ、体重の減少、被毛粗剛、下痢および歩行異常などの諸症状が観察された。しかし、これらの症状は投与後5日目ころより漸次回復し、へい死したものはまったくみられなかった。

4-2-1-2 煎菜油揚げめんとその揚げ油

P.O.V.は時間とともに急上昇し、抽出油では実験終了時の600hrまで上昇を続け、その値は最高の565に達した。また揚げ油では450hr(481)まで上昇し、その後は下降した。A.V.は両者いずれも経時的に上昇し、600hrにおいては抽出油12.2、揚げ油8.7の最高値を示したが、前者の方が高い値であつた。毒性は450hrころより現われ、さらに600hrではその激しさを増した。その症状は投与後数hrから24~48hrくらゐで続き、被毛粗剛、歩行の異常が認められ、回復までに4~5日を要したが、へい死するものはなかった。この毒性は揚げ油に比して抽出油の方が激しかった。

4-2-1-3 煎菜油揚げめんとその揚げ油

煎菜油群同様P.O.V.は照射に平行して急上昇した。抽出油では、短時間で最高値(300hr, 549)に達し、それ以後は下降した。また揚げ油では煎菜油と同じように上昇(450hr, 442)、下降線をたどつた。A.V.は煎菜油と同様に両者とも時間に従つて上昇し、抽出油では600hr(52.0)、揚げ油は450hr(10.8)でそれぞれ最高値を示したが、前者の方がはるかに高い値を示し、いずれも煎菜油より高いA.V.であつた。毒性においては照射300hrですでに毒性が認められ、600hrではさらにその激しさを増した。症状は下痢が数日続き体重の減少、被毛粗剛および歩行異常などが観察され、7日目ころから漸次回復を示したが、中にはへい死するものがみられた。毒性も前記同様揚げ油よりも抽出油の方が強いようであつた。

前後および組織学的所見では毒性を示した照射正常揚げめん、煎菜油および煎菜油群との間では、おもな病変には大きな差異は認められなかったが、照射群に比べ明らかに変化が認められ、上述インスタント・スパゲッティ一枚体の所見と酷似したものが観察された。

以上、これらの毒性は外観的には下痢、被毛粗剛、体重の減少、歩行異常などの症状を呈し、また剖検組織学的所見では急性カタル性腸炎が認められるなど、インスタント・スパゲッティのそれとほとんど同一の症状が所見が観察され、そのうえ、P.O.V.の最高値よりも、さらに酸化が進みP.O.V.が下降するに準つて、その毒性は激しさを増すことから推して、二過性の激しい下痢を伴うこの種の食中毒事例の毒性物質も、本実験により得られた毒性物質に類似した生成物と推定され

取が強く現われた。また各分画とも IR および TLC での定性反応からニロキシンドは検出されなかった。毒性を有する分画 (f-2~f-7) は直接アセチル化によってその毒性は減弱したが、アセチル化の前後、いずれの分画においても、P.O.V. や C.V. が低く、揮性の高い分画ほど毒性が強いこと、また粘度が高いことなどから重合体による影響も関係しているのではないかと考えられる。

さらに毒性の強かった f-6 および f-7 の TMSi 誘導体は GLC により数個の大きなピークを認めたが、こ

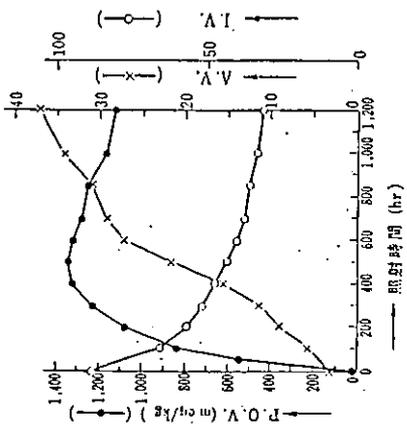


図4 紫外線照射による P.O.V., A.V. および C.V. の経時変化 (オレイン酸メチル)

NO=1,000 (50g. および 50g. 試料に 50cc. 酢酸エチルを添加)
 P.O.V. 1,374, A.V. 34, I.V. 33
 カラム: シリカゲル
 (Silicic acid 10%, 5x57cm)
 (1) ベンゼン: 石油エーテル (80:20 vol/vol)
 (II) シニオールエーテル
 F-1 (21.0g)
 P.O.V.: 325
 A.V.: 1.22
 Tax. (0.3ml)
 Yield: 42%
 1-4 4
 15% 58%

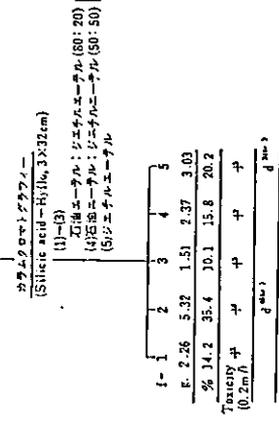


図5 MO-1,000 の分別と誘導

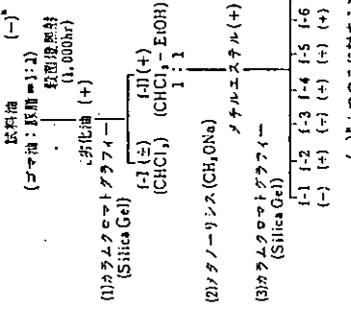


図2 照射油抽出物の分別と毒性

から加熱によって P.O.V. が低下しても毒性は消失しなかった。また NaBH₄ 処理によっても P.O.V. や C.V. (carbonyl value) が低下してもなお毒性が存在するが、これをさらにアセチル化することによって毒性は著しく低減した。さらに直接アセチル化した場合にも、マウスに対し 0.3 ml 投与ではヘイ死 (未処理のものより生存時間は長い) したが、0.2 ml 投与では、あらかじめ NaBH₄ 処理したものには比べ、体重の減少は大きい。ヘイ死したものはなかった。これらの理由から処理過程中の複雑な副反応の影響も考えられるので、連続しかねるが NaBH₄ 処理後にアセチル化したものが最も毒性を低減させたことから、ヒドロペルオキシド、カルボニルおよび水酸基などいずれも毒性作用に関係があるものと思われる。

つぎに前述の CHCl₃-EtOH 抽出区分メチルエステルをさらにカラムクロマトによって f-1~f-7 分画し、その P.O.V., C.V. および毒性との関係を検討した。各分画の IR は、毒性のまったく認められなかった f-1 を除いては、いずれも水酸基、カルボニル、*trans* 結合による吸収が特徴的で、揮性が高くなるにつれて、水酸基の吸

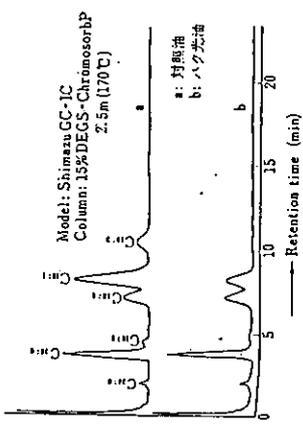


図3 ラーメン抽出物の GLC, 日光照射の影響

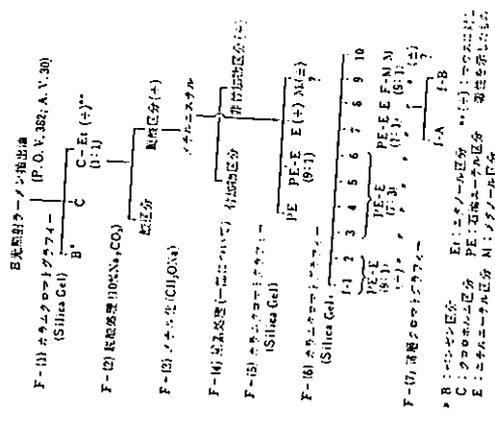


図1 日光照射抽出物の分別と毒性

著明な毒性を有し、0.1 ml 投与で 6 hr. 0.2 ml で 2.5 hr でそれぞれヘイ死した。この区分の IR はシリノールエステルと近似的なパターンを示すが、C-H に対する水酸基の吸収の割合はより強く、TLC の R_f との結果から 2 種以上の水酸基の存在が推定される。さらに TLC を用いて f-A と f-B に分画した結果、f-A に対する物質移行は行なえなかった。また TLC で f-A および f-B は微量の混合物が認められたが、インスタン・スポットテスター等区分 f-B にも、これに相当したスポットが検出された。f-A および f-B についての質量分析では、これらはいずれも 2 個以上の水酸基とカルボニルを有するアルキル側鎖のない長鎖脂肪酸と推定される。

4-2-2 人工光線照射による油脂の劣化と、その毒性
 実験的に一定条件下で連続照射が可能なことや市場における実用上のことを含めて、人工光線 (紫外線、赤外線など) による照射を行ない、油脂の劣化とその毒性および理化学的性状について検討した。

4-2-2-1 殺菌照射
 油脂 (ゴマ油: 既述 1:1) 混合物に殺菌燈を用い、20°C の室温で 1,000 hr 連続照射して劣化した油脂の毒性と酸化生成物中のラジカルとの関係を究明するため加熱処理やいくつかの化学的処理を施し、その毒性への影響を検討した (図-2)。すなわち照射油のシリカゲルクロマトによる CHCl₃-EtOH (1:1) 抽出区分をメタノールシンスしたものについて、(i) 加熱処理 (70°C, 25 min), (ii) NaBH₄ 処理, (iii) NaBH₄ 処理後にアセチル化, (iv) 直接アセチル化などを実施して、その毒性と化学構造との関係を追究した。これらの結果

る。過酸化物の毒性については、すでに多くの報告があり松尾ら、金田ら¹⁾は酸化油の毒性の本体は過酸化物であることを認めている。しかるに一方、採取された過酸化物は腸管内でただちに分解され²⁾、そして腸リンパには吸収できなさいといわれている³⁾。また Kaunitz ら⁴⁾はオレイン酸過酸化物の投与では毒性が認められなかったが、油脂の過酸化物を連続加熱して分解させたものにおいては、明らかに毒性を示した事実から、過酸化物自身には一般に毒性がないものと結論している。したがって、能率的に過酸化物の毒性は使用油脂の種類に依存するかも知れない。

われわれの今回の実験結果においては、上述のように P.O.V. が上昇した段階で毒性が強く現われることから、Kaunitz らの意見のように過酸化物の二次的分解産物が毒性に大きく関係しているものではないかと考えている。

4-2-1-4 照射揚げの人の毒性抽出物の分別とその性質

正常揚げめんと直射日光にさらし、P.O.V. が最高値から徐々に低下、下降期にはいってからマウスに対する毒性が一段と著しくなる 450~850 hr 照射の抽出油を混合して、これを原料とし、毒性物質の分別を試みた。この抽出油 (P.O.V. 382; A.V. 30) は特有の酸敗臭をもち、TLC では非照射油に比べ triglyceride が著明に減少し、より揮性の高い成分の分解産物が認められた。また IR では二重結合の減少とともに *cis* 型から *trans* 型への異性化、水酸基、カルボニル化合物による吸収の増加が認められ、GLC よりオレイン酸、リノール酸などの不飽和脂肪酸の減少が著明であった。さらに従来より自動酸化劣化油の毒性物質として問題になっているヒドロペルオキシドの毒性を後述するため、ヨウ化カリウムにより還元した結果、その毒性には変化なく、むしろ促進される傾向が認められ、毒性の本体はヒドロペルオキシドからの二次的分解産物によるものであらうと推定した。

つぎにこの劣化油の毒性物質の単離を目的に、動物実験を平行させてマウスに対する毒性区分を行なった (図-1)。各区分に伴ってマウスに対する毒性は強まり、F-(6) の各区分では、抽出油 (1.0 ml/マウス) の 1/5~1/10 量で毒性を示し、ヘイ死するものもあった。この f-1~10 区分はいずれも TLC により、未だいくつかの成分の混入したものであるが、水酸基 1 個持つリノール酸メチルに比べ R_f は低く、より揮性の高いこと、2,4-ジニトロフェニルヒドロジンやヨウ化カリウム-酢酸によりカルボニルやヒドロペルオキシドの存在することが認められた。これらはいずれもマウスに対し、毒性を示したが、その強さは一様でなく、とくに F-(6)-8 は最も

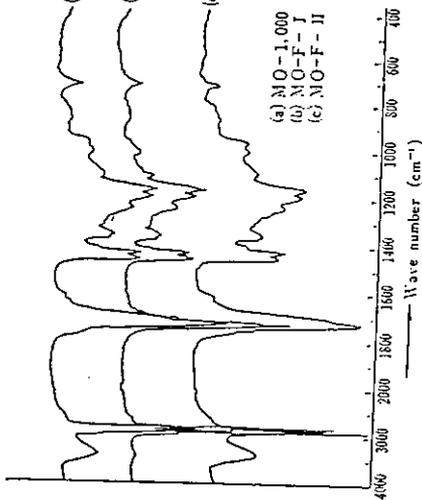


図-6 NO-1,000, F-I, および F-II の IR スペクトル

これらの構造については追記中である。

以上、これらの結果は毒性を含めて上述の日光照射を行なった揚げめん抽出油に認められたものと同様であり、さらに GLC によっても同一の保持時間を有する共通したピークが認められることなどから、両者とも本質的には同一の構造により、毒性化が起ころうと思われる。

4.2.2.2 ポレイン酸メチルの紫外線照射

卵黄の中の油脂の劣化と構成脂肪酸の揮発的消長および毒性との関係についてみると、とくに不飽和脂肪酸の減少が著しく認められたので(図-3)、これらに用いられる油脂中に多く含まれるオレイン酸を選び、紫外線照射して揮発的変化の化学的変化と毒性を検討し、あわせて毒性区分の分類を行なった。

化学的変化の経時的変化は図-4に示した。またマウス(0.5 ml/経口投与)に対する毒性は、200 hr 以降にみられ上述と共通した諸症状を呈し、P.O.V. が最高値に達した500 hr 以降には5匹中4匹がへい死した。さらにP.O.V. の下降とともに毒性は漸まり、1,000 hr 時間の照射時には0.5 ml/投与で90 min, 0.4 ml/24 hr 以内にそれぞれへい死した。これらの毒性が認められたものには、一般に光線照射場めん抽出油などのものと非常に酷い所見が観察された。

つぎに毒性が高く認められた1,000 hr 照射のオレイン酸メチル(NO-1,000)を用い、毒性区分の分類を図-5に示して行なった。F-I では対照同様にまったく毒性は認められなかったが、F-II (0.3 ml/投与)は投与後3 hr でへい死した。これらの分画のIRは図-6に示したように毒性を示したNO-1,000 および F-II はいずれも水基基、カルボニル、およびtrans二重結合の吸収

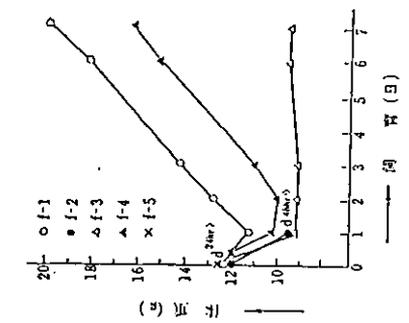


図-7 NO-1,000, F-1, および F-5 のマウスに対する毒性 (mg/0.2 ml)

が増大し、これまた特徴的なパターンを示している。さらにF-IIをカラムコロマトによって分別しF-1~F-5を得た。この各分画のTLCではそれぞれ赤い単品としてとらえられないが、その毒性の強さは図-7に示すようにF-5, -2, -3, -4, -1の順であり、F-4の主成分はリンゴールメチルよりもわずかに毒性が高いた油状物であるが、F-5はさらに毒性が高く、淡黄色粘乎乎油状物であった。したがってこれらの二つの分画の毒性物質は同一物ではないとあり、あるいはF-5の毒性物質はF-4の重合物とも考えられるが、さらに純化して同定を試みたいと思っている。

また、これらの同定によって、その急性毒性機構を追究するとともに、P.O.V.の上昇期にあってもこの種の毒性物質の生成も考えられるので、微量採取による急性毒性についても検討したいと考えている。

文 献

- 1) R.H. Barnes, W.O. Lundberg, H.T. Hanson, G.O. Burr, *J. Biol. Chem.*, 148, 313 (1943)
- 2) F.W. Quackenbush, *Oil & Soap*, 22, 335 (1945)
- 3) E.W. Crampson, R.H. Commo, F.A. Farmer, A.F. Wells, D. Crawford, *J. Nutr.*, 49, 333 (1953)
- 4) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, R.H. Johnson, H.B. Knight, D.H. Saunders, D.Swern, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 33, 630 (1956)
- 5) O.C. Johnson, E. Perkins, M. Luzzi, F.A. Kummrow, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 34, 594 (1957)
- 6) M.R. Sahasrabudhe, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 763 (1965)
- 7) 松尾: 油化学, 11, 13 (1963)
- 8) E.C. Perkins, *Food Technol.*, 14, 508 (1960)
- 9) H.W. Schultz, E.A. Day, R.D. Simhuber, Ed., (1962), "Lipids & Their Oxidation" Avi Publ. Co., Westport, Conn.
- 10) C.H. Lea, *Chem. Ind.*, 1955, 244

- 11) H. Kaunitz, *Food Technol.*, 21, 278 (1967)
- 12) K. Lang, A. Enicker, *Z. Lebensmittelunters. u. Forsch.*, 123, 290 (1964)
- 13) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, R.H. Johnson, H.B. Knight, D.H. Saunders, D. Swern, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 35, 611 (1958), *Metab. Clin. & Exp.*, 9, 59 (1960)
- 14) N.V. Raju, M. Narayana, Rao, R. Rajagopalou, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41, 774 (1965)
- 15) H. Kaunitz, R.E. Johnson, L. Pegus, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 770 (1965)
- 16) G. Cook, W. Grien, W. Kieckebusch, K.H. Bessler, *K. Lang: Z. Ernähr. Wiss.*, 5, 80 (1964)
- 17) B. Potteau, R. Cluzan, *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 8, 47 (1966)
- 18) W. Grien, *Z. Ernähr. Wiss.*, 1, 30 (1966)
- 19) E. Arfmann, *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 61, 161 (1964)
- 20) A.C. Fraser, *Chem. Indust.*, 1961, 417
- 21) H. Kaunitz, D.C. Mahins, D.G. McNay, *J. Exp. Med.*, 115, 1127 (1962)
- 22) J. Raolin, *Ann. Nutr. Aliment.*, 21, 105 (1967)
- 23) P.J. O'Brien, A.C. Fraser, *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 9 (1966)
- 24) M.G. Koksatur, J.G. Bergan, H.H. Draper, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 123, 254 (1966)
- 25) *Brit. Med. J.*, 1, 167 (1968)
- 26) E.G. Perkins, L.A. Van Alkeren, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 782 (1965)
- 27) G.A. Nolen, J.C. Alexander, N.R. Artman, *J. Nutr.*, 93, 337 (1967)
- 28) R.G. Krishnamurthy, T. Kawada, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 878 (1965)
- 29) T. Kawada, R.G. Krishnamurthy, B.D. Moolberjee, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 44, 131 (1967)
- 30) R.G. Krishnamurthy, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 44, 136 (1967)
- 31) K.J. Carpenter et al., *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 25 (1966)
- 32) C.H. Lea, L.J. Parr, *Brit. J. Nutr.*, 18, 369 (1964)
- 33) C.H. Lea, L.J. Parr, *Brit. J. Nutr.*, 20, 123 (1966)
- 34) V.S. Waravdekar, L.D. Saslaw, W.A. Jones, *Am. J. Path.*, 45, 889 (1964)
- 35) J.R. Chipault, R. Mizuno, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41, 468 (1964)
- 36) K. Matano, K. Miyaki, S. Honjo, T. Fujiwara, S. Otaki; Symposium on Chloramide, Hakone, Aug. 16 (1967)
- 37) 稲垣, 食品衛生研究, 15, 72 (1966); 厚生省食品衛生課資料, 3月 (1965)
- 38) 三浦, 武藤, 保野, 宮本, 食糧誌, 7, 67 (1966)
- 39) 三浦, 武藤, 保野, 宮本, 油化学会昭和42年度油化学研究発表会, 昭和42年10月, 名古屋
- 40) 三浦, 工藤, 土田, 保野, 宮本, 油化学, 18, 726 (1959)
- 41) T. Kaneda, H. Sakurai, S. Ishii, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 20, 50, 658 (1954)
- 42) P. Debouloz, J. Foodari, C. Legasde, *Biochem. Biophys. Acta.*, 3, 371 (1949)
- 43) J.S. Andrews, W.H. Griffiths, J.F. Mead, R.A. Stein, *J. Nutr.*, 70, 199 (1960)
- 44) 土田, 保野, 武藤, 宮本, 油化学会昭和43年度油化学研究発表会, 昭和43年10月, 東京
- 45) 土田, 三浦, 保野, 油化学会第8回油化学研究発表会, 昭和44年11月, 大阪
- 46) 保野, 土田, 三浦, 武藤, 宮本, 油化学会第8回油化学研究発表会, 昭和44年11月, 大阪

油の毒性作用

自動酸化油脂の毒性に関する研究 (第2報)

自動酸化油脂の酵素に及ぼす影響

吉 岡 隆 子・鈴 木 勝 久・金 田 尚 志

東北大学理学部化学科 (仙台市青葉区)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. II. The Effects of Autoxidized Oils on the Enzymic Activities

Masako YOSHIOKA, Kazuhisa SUZUKI and Takashi KANEEDA Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University (Tsuwamibori, Aomoriya, Sendai)

In the previous paper authors reported that the toxicity of autoxidized methyl linolate on mice was likely to be more dependant on the secondary products than on hydroperoxides and that the longer the ester was autoxidized, the more toxic it became. This paper aims at investigation of the effects of autoxidized safflower oil on enzymes in connection with the toxicity on mice. Autoxidized safflower oil at various stages of autooxidation was incubated with lipase, pepsin, papain and cytochrome c. After incubation, the activities of enzymes were determined. It was found that the activities of enzymes decreased with the prolonged autooxidation, time of safflower oil except for pepsin. This finding turned out to be similar to the toxicity on mice. In order to clarify what compound is responsible for inactivation of enzymes, autoxidized safflower oil was fractionated into low molecular weight compounds (Fr. I), free fatty acids (Fr. II) and other monomeric and polymeric compound (Fr. III) according to the method described in a previous paper. These fractions were incubated with the above-mentioned enzymes and activities were determined. Fr. I was found to be the most dominant fraction which inactivated the enzymes.

Authors have noticed that this fraction showed the most toxic effect on mice. From these results, authors conclude that the toxicity of autoxidized oils on mice is closely related to the inactivation of enzymes in vitro.

1 緒 言

前者には前報において自動酸化油脂に生成する有毒成分中、ヒドロペルオキシド不飽和アルデヒドの毒性が最も強いことを報告した。また酸化油脂の毒性は酸化程度により、酸化生成物およびその成分比が異なるため、一語に論じがたいこと、すなわち酸化程度を知ることには、有機成分を決めがたいことを指摘した。このように、自動酸化油脂の毒性を調べる上で、酸化程度を知ることは必要の条件である。本報では、酸化程度を知る手段として、P.O.V., C.O.V., T.B.A.V. などの化学検査を測定する以外に、酸化脂質と酵素をインキュベートし、インキュベーション後の酵素活性を測定する方法が妥当であるかを明らかにしようとした。現在までに、酸化脂質による種々の酵素の不活性化、タンパク質の変化などに關しては数多くの報告がある。しかし、こ

れらは脂質酸化生成物、おもにヒドロペルオキシドおよびアルデヒドなどの示す毒性の発生機構を明らかにしようとしたものが多い。これらの報告を分類すると、(1) 酵素不活性化の程度、(2) 脂質とタンパク質の複合ポリマー形成などのタンパク質の化学変化に關する研究(3,4)、(3) 脂質酸化生成物による酵素不活性化の反応速度論的研究(5) および反応速度に及ぼす温度、pH、抗酸化剤、酸化促進剤の濃度などの諸条件の研究(6,7) などに分けられる。本研究は酵素と酸化脂質のインキュベーション後の酵素活性を知ることにあり、油類の毒性程度を知ることができるとは、ヒドロペルオキシド、マロンアルデヒドに際らず、種々の酸化生成物が酵素活性に及ぼす影響の強弱を比較し、さらに、この方法がペルオキシドに対する毒性の程度と並行するものであるかどうか、すなわち毒性を調べる方法として通常用いられているマウスによる試験法に代用できる

94) G. Englert, A. Sauppe, Z. Naturforsch., 19, 172 (1964)

95) G. Englert, A. Sauppe, Mol. Crystall Liquid Cryst. 1, 503 (1956)

96) G.R. Luckhurst, Osterreich. Chem.-Ztg., 68, 113 (1967)

97) A.D. Buckingham, K.A. McLouchlan, Progress in NMR Spectroscopy, Bd 2, Pergamon Press, New York (1967)

98) G.R. Luckhurst, Quart. Revs., 22, 179 (1968)

99) A. Sauppe, Abstr. Chem., 80, 59 (1968)

100) L.C. Snyder, S. Meinboom, J. Chem. Phys., 47, 1489 (1967)

101) W. Meier, G. Englert, Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 64, 689 (1960)

102) G.P. Casar, H.B. Gray, J. Amer. Chem. Soc., 91, 773 (1969)

103) H. Kelbert, Vortrag zur 76 Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft, Hannover, (1967)

104) A. Bismstein, N. Kitagawa, E. Ishanstein, Mol. Crystall Liquid Crystals, 12, 255 (1967)

105) E. Sackmann, J. Amer. Chem. Soc., 90, 3507 (1968)

106) E. Sackmann, D. Kelm, Chem. Phys. Letters, 4, 337 (1970)

107) H.R. Falle, G.R. Luckhurst, H. Lemaire, V. Merzbach, A. Fasset, P. Rey, Molecular Phys., 11, 49 (1966)

108) P. Ferruti, D. Gill, M.A. Harpold, M.P. Klein, J. Chem. Phys., 50, 4544 (1969)

109) G. Harvach, P. Ferruti, D. Gill, M.P. Klein, J. Amer. Chem. Soc., 91, 7535 (1969)

110) G. Heppke, F. Schmeibler, Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 75, 61 (1971)

111) G. S. Selwyn, H.S. Selwyn, J.F. Holland, Mol. Crystall Liquid Crystals, 1, 405 (1966)

112) J.L. Ferguson, N.N. Goldberg, R.J. Naddalin, Mol. Crystall Liquid Crystals, 399 (1966)

113) J.L. Ferguson, Appl. Optics, 7, 1729 (1968)

114) W.E. Woodmansee, Mater. Evaluation, 548 (1966)

115) E. Bollinger, D. Gross, E. Mundry, Materialprufung, 11, 156 (1969)

116) E.J. Klein, Astronautics & Aeronautics, July, 1968, 70

117) C.S. 2, 114, 238 (Westinghouse)

118) J.L. Ferguson, Brit. J. Appl. Phys., 11, 77 (1964)

119) U.S. 3, 408, 404 (Westinghouse)

120) U.S. 3, 438, 525 (Boeing)

121) Brit. 1, 126, 590 (NCR)

122) Brit. 1, 161, 038 (NCR)

123) Deutsche Offenlegungsschrift, 2, 034, 969 (Hoffmann-LaRoche)

124) G.V. Lukianoff, Proc. Intern. Liquid Crystall. Conf., 7, 222 (1968)

125) U.S. 3, 440, 882 (Westinghouse)

126) Deutsche Offenlegungsschrift, 2, 012, 403 (Liquid Crystall. st. Ind.)

127) Deutsche Offenlegungsschrift, 2, 028, 730 (Bio-Medical Sci.)

128) J.T. Crissey, E. Gandy, J.L. Ferguson, K.F. Lynch, J. Invest. Dermat. (Baltimore), 43, 59 (1969)

129) M. Gauthier, J. Physique Radium, C-4, 30, 122 (1969)

130) O.S. Selwyn, H.S. Selwyn, J.F. Holland, Mol. Crystall Liquid Crystals, 1, 405 (1966)

131) J.L. Ferguson, N.N. Goldberg, R.J. Naddalin, Mol. Crystall Liquid Crystals, 399 (1966)

132) W.E. Woodmansee, Mater. Evaluation, 548 (1966)

133) E. Bollinger, D. Gross, E. Mundry, Materialprufung, 11, 156 (1969)

134) E.J. Klein, Astronautics & Aeronautics, July, 1968, 70

135) C.S. 2, 114, 238 (Westinghouse)

Table-9 Effects of the fractionated compounds on lipase activity at different concentrations.

Table with 3 main columns: Fractions, Concentration of fractionated compds. (5x10^-4, 1x10^-3, 2.5x10^-2), and Lipase activity (%).

Incubated at 37°C for an hour

2-2-2-1 各分画区分のリパーゼ活性に及ぼす影響... Table-9の結果を得た。Table-8より、インキニベーション時間 0 min. 60 min. のいずれにおいても、I区分、II区分の酵素活性に及ぼす影響が最大であった。

2-2-2-2 各分画区分のペプシン活性に及ぼす影響... Table-10の結果を得た。すなわち、II区分の酵素活性に及ぼす影響が最大であった。

Table-10 Effects of the fractionated compounds on pepsin activity at different concentrations.

Table with 3 main columns: Fraction, Concentration of fractionated compds. (5x10^-4, 2x10^-3, 1x10^-1), and Pepsin activity (%).

Incubated at 37°C for an hour

ほど、またより高度に酸化された油を添加したのもほど、その減少が著しいことが明らかとなった。

以上のことより、No. 5, No. 6 の高度に酸化させた油は、その減少が著しいことが明らかとなった。

2-2 自動酸化油分画区分と酵素活性

2-2-1 自動酸化油の分画

前試料同様に酸化させたサフラワー油 (P.O.V. 1.210) を用い Fig-4 の通り分画を行なった。分画区分の一覧表、TLC の結果を Table-7, Fig-5 に示した。

Table-7 の結果より低分子化合物区分、Fr. I のカルボニル値が 0.083 と非常に高く、また分子重より低分子化合物が主成分であると思われた。また、Table-7 に示した通り、Fr. II, III, IV, V のカルボニル値は、Fr. I に比べて低く、また、Fr. I のカルボニル値は、Fr. II, III, IV, V のカルボニル値よりも高かった。

Table-7 Effects of the fractionated compounds on lipase activity at different incubation times.

Table with 3 main columns: Fraction, Incubation time (min), and Lipase activity (%).

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 1x10^-2 M

を得た。Fig-3 のスペクトル A は酸化油を加えないサトウ油 c, および No. 1~No. 4 の軽度の酸化を受けた油を加えた場合であり、B は No. 5, No. 6 の高度に酸化を受けた油を加えた場合である。

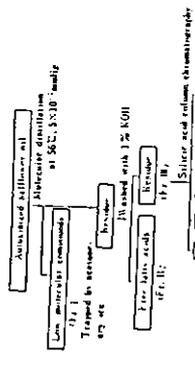


Fig-4 Fractionation of autoxidized safflower oil.

Table-7 Chemical characteristics of fractionated compounds.

Table with 6 columns: Fraction, M.M.I. W., P.O.V., C.O.V., C.O.D., T.B.A.V.

* Mean molecular weight ** Optical density

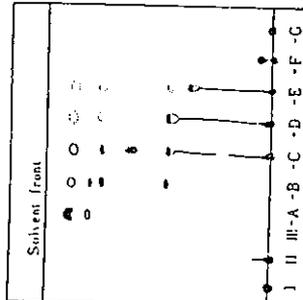


Fig-5 T.L. Chromatogram of fractionated compounds on WAKO GEL B-O detected under iodine vapor.

とパルミン失活力が大きいことがわかった。2-1-2-4 サトウ油 c (E4) に対する影響... 2-1-2-4-1 サトウ油 c の化学酸化測定法... 2-1-2-4-2 各種酸化程度における酸化油のサトウ油 c に及ぼす影響

2-1-2-4-2 各種酸化程度における酸化油のサトウ油 c に及ぼす影響... 0.02 M, pH 7.3 のリン酸緩衝液に溶かしたサトウ油 c 溶液 (0.01 mg/ml) 3 ml にインキニベーション溶液の最終濃度が 3x10^-4 M とする

Fig-3 Absorption spectra of cytochrome c after the reaction of cytochrome c with autoxidized safflower oils.

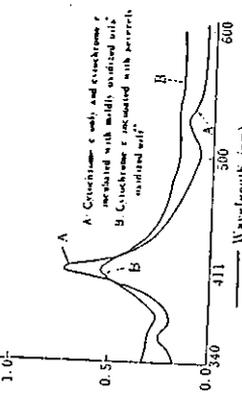


Table-5 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on cytochrome c.

Table with 3 main columns: Autoxidized oil No., Incubation time (min), and Percentage of O.D. at 411 mμ.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3x10^-4 M

注 4) Signa 社製 Horse Heart cytochrome c, Type II を使用した。

Table-11 Effects of the fractionated compounds on papain activity.

Fraction	I	II	III-A	B	C	D	E	F	G
Papain activity (%)	0	35	100	95	100	48	8	28	48

Incubated at 37°C for 20 hours
Oil concentration: 2x10⁻²M

酸化油各分画区画を 2x10⁻²M 添加し、1 hr インキニベートを行ない、活性を測定し Table-11 の結果を得た。すなわち I 区画による赤褐色は最も大きく、II 区画、III-D、III-E、III-F、III-G 区画がこれについて、2-2-2-4 テトラコームの化学構造に及ぼす各分画区画の影響

各分画区画とテトラコームとをインキニベートした後のテトラコームの 340-600 mμ の吸収スペクトルを測定し Fig-5 の結果を得た。酸化油分画区画を添加しなかったテトラコームのスペクトル A に比べ、III-D、III-E、III-F、III-G の各分画および I 区画を添加し

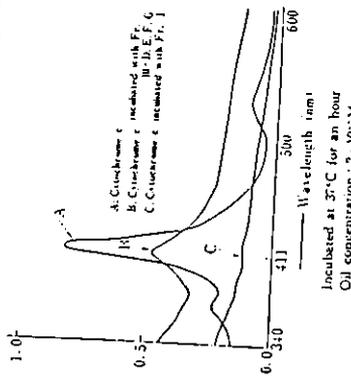


Fig-5 Absorption spectra of cytochrome c after the reaction of cytochrome c with the fractionated compounds of safflower oil.

Table-12 Effects of the fractionated compounds on cytochrome c.

Fraction	Cytochrome c O.D. at 411mμ (%)	
	1x10 ⁻²	1x10 ⁻³
I	78	12
II	100	100
III-A	160	160
B	100	100
C	100	100
D	100	100
E	100	100
F	100	100
G	100	100

Incubated at 37°C for 20 hours

Table-13 Effects of the fractionated compounds on cytochrome c at different incubation times.

Fraction	Cytochrome c O.D. at 411 mμ (%)		Incubation time (min)
	0	30	
I	60	60	60
II	100	100	60
III-A	100	100	60
B	100	100	60
C	100	100	60
D	100	100	60
E	100	100	60
F	100	100	60
G	100	100	60

Incubated at 37°C
Oil concentration: 2x10⁻²M

ンキニベートした後のスペクトル B、C、D、E、F、G では 411 mμ のソレーベークならびに 523 mμ の吸光度の減少が明らかであった。酸化油分画区画を添加しなかったテトラコームのソレーベークにおける吸光度を 100% とし、各分画区画添加テトラコームの吸光度を百分率で表わし Table-12、Table-13 の結果を得た。これよりテトラコームは、低濃度の I 区画の存在でしかも短時間で変化を受けると、I 区画と同程度の吸光度の減少を、III-F、III-G 区画に閉しても吸光度の減少は見られる。I 区画に比較すると、I 区画と同程度の吸光度の減少を受けるのに長時間を要し、また同程度の場合には、前者ほど強い吸光度の低下は認められなかった。

2-3 遊離脂肪酸と酵素活性

遊離脂肪酸が酵素活性に及ぼす影響を検討するため、100% ニーテル抽出区画 (Fr. III-F) をヨウ化カリウムで還元し、還元前後の油脂がリパーゼ活性およびテトラコームのソレーベークの吸光度に及ぼす影響を調べ、Table-14、Table-15 の結果を得た。なお還元前後の油脂の化学特数は Table-16 の通りである。これよ

Table-14 Effects of peroxides on lipase activity.

Original III-F	Reduced III-F by KI	Lipase activity (%)

Incubated at 37°C for an hour
Oil concentration: 1x10⁻²M

Table-15 Effects of peroxides on cytochrome c.

Original III-F	Reduced III-F by KI	Absorbance at 411 mμ (%)

Incubated at 37°C for 20 hours
Oil concentration: 2x10⁻²M

Table-16 Characteristics of III-F fraction.

Original III-F	P.O.V.	CO.V.	T.B.A.
Reduced III-F by KI	997	1103	15.6
	257	291	14.4

り、リパーゼの活性が還元前後でほぼ同じであったのに対し、テトラコームの吸光度は、還元することにより、約 2 倍に回復することがおかされた。以上により、リパーゼは遊離脂肪酸の影響を受けにくい。テトラコームは遊離脂肪酸の影響が大きいように思われた。

3 考 察

前報で、自動酸化油脂の毒性は、酸化程度が深くなるにつれて、自動酸化生成物の濃度が増加するほど、マウスに対して強い毒性作用を有することを報告したが、本実験において、*in vitro* でリパーゼ、パルチン、テトラコーム、ペーパーを用いて酸化油とインキニベートした時、これらの酵素活性、あるいはタンパク質の化学構造の変化を測定した結果、ペーパーを除き、より高度に酸化された部とインキニベートしたものは、その未遊離または化学構造の酸化が大きいという結果を得、酵素の失活度、化学構造の酸化が大きいという結果を示す。低濃度の I 区画の存在でしかも短時間で変化を受けると、I 区画と同程度の吸光度の減少を、III-F、III-G 区画に閉しても吸光度の減少は見られる。I 区画に比較すると、I 区画と同程度の吸光度の減少を受けるのに長時間を要し、また同程度の場合には、前者ほど強い吸光度の低下は認められなかった。

自動酸化油のマウスに対する毒性の程度と、酵素に対する失活作用を比較してみると、1) 自動酸化油の酸化程度による毒性の程度は、リパーゼ、パルチン、テトラコームとの失活度と並行した。2) 個々の酸化生成物の酵素活性に及ぼす影響の強弱はマウスに対する毒性の程度と必ずしも一致しなかつたが、低分子化合物の著しく強い毒性は両者とも同様の傾向を示した。以上のことにより、リパーゼ、パルチン、テトラコームの活性度を測定することにより、酸化程度を知ることが可能であると思われる。

in vitro の同実験が並行しているものと推定された。また、遊離脂肪酸区画もマウスに対して低分子区画につき毒性を示したことを報告したが、酵素活性においては、リパーゼがこの傾向をもっともよく示していた。テトラコームでは、遊離脂肪酸により大きな影響を受けなかったが、2-3 において酸化油脂を還元したものを作用させると、もとの酸化油脂を作用させた場合の吸光度が約 2 倍回復することから、高い T.B.A. 値を示した遊離脂肪酸はやはり過酸化による影響が大きいものと思われる。このように、個々の酸化生成物が種々の酵素に及ぼす失活作用の強弱は、マウスに対する毒性と必ずしも並行したものではなかったが、酸化程度を知る手段として、リパーゼ、パルチン、テトラコームなどの酵素の酸化油による失活程度を測定し比較することは可能であるように思われる。また、低分子化合物のこれらの酵素に対する強い失活作用は、マウスに対する毒性発生機構を示唆するものであるからもしれない。ペーパーに関しては、酸

化油脂により活性化を受けるといふ現象が観察され、マウスに対する毒性試験の結果とまったく逆の傾向を示した。ペーパーの活性化現象の理由は明らかでないが、ペーパーの酵素活性から酸化程度を知ることが不可能であると思われる。本実験においては、4 種の酵素あるいはタンパク質を取り上げたが、さらに数多い酵素に関しては検討する必要がある。

4 要 約

自動酸化油のマウスに対する毒性の程度と、酵素に対する失活作用を比較してみると、1) 自動酸化油の酸化程度による毒性の程度は、リパーゼ、パルチン、テトラコームとの失活度と並行した。2) 個々の酸化生成物の酵素活性に及ぼす影響の強弱はマウスに対する毒性の程度と必ずしも一致しなかつたが、低分子化合物の著しく強い毒性は両者とも同様の傾向を示した。以上のことにより、リパーゼ、パルチン、テトラコームの活性度を測定することにより、酸化程度を知ることが可能であると思われる。

(昭和 47 年 8 月 29 日受理)

文 献

- 1) 吉岡, 家三, 油化学, 21, 316 (1972)
- 2) R.C. MeKnight et al., J. Biol. Chem., 241, 2737 (1966)
- 3) P.J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 4) C. Little et al., Biochem. J., 101, 13 p (1966)
- 5) E. Schauenstein, J. Lipid Res., 9, 417 (1967)
- 6) C. Little et al., Biochem. J., 105, 419 (1968)
- 7) L.A. Witting, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 908 (1965)
- 8) D.D. Hendley et al., Federation Proc., 20, 298 (1961)
- 9) W.T. Roubal et al., Arch. Biochem. Biophys., 113, 5 (1965)
- 10) F. Andrews et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 779 (1965)
- 11) A.W. Yenolia et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 35, 135 (1958)
- 12) I.D. Desai, J. Lipid Res., 4, 204 (1963)
- 13) K.S. Chio, Biochemistry, 8, 282 (1969)
- 14) C. Little et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 145 (1968)
- 15) R.E. Marcuse et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 48, 448 (1971)
- 16) C.E. Eriksson et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 48, 442 (1971)
- 17) G. Marchis-Bouren et al., Arch. Biochem. Biophys., 83, 309 (1959)
- 18) S. Masushita et al., Agr. Biol. Chem., 34, 825 (1970)
- 19) J.R. Kimmel et al., J. Biol. Chem., 201, 515 (1954)

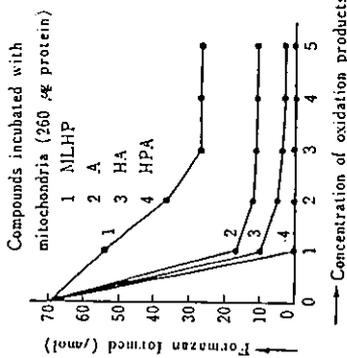


Fig-1 Effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on lipase activities.

が 1×10^{-4} mol となるように、85% ニタノール(注3)に溶解した酸化生成物 0.5 ml を加え、37°C で一定時間インキュベートし、インキュベーション後、エーテルで酸化生成物を除去し、第2報で述べた連続測定法で活性度を求め、Fig-1 の結果を得た。これより、HPA の活性度が最も大きいことが認められた。

2-3-1-2 succinate dehydrogenase 活性

Schneider の方法により調製したミトコンドリアを、0.25 M-シロ糖溶液 5 ml に懸濁し、この懸濁液に、インキュベーション溶液における最終濃度が $1 \sim 5 \times 10^{-4}$ M となるように、85% ニタノールに溶解した酸化生成物溶液 0.1 ml を加え、37°C で 5 min インキュベートした。インキュベーション後、酸化生成物を除くため、0.25 M-シロ糖溶液による洗浄、遠心分離 (10,000 G, 20 min) を3回繰り返した。得たミトコンドリアを 1 ml の succinate dehydrogenase 活性を比色測定した。すなわち、阻害ミトコンドリアを酵素源とし、コハク酸がフラム酸に酸化される反応と、triphenyltetrazolium chloride (TTC) が formazan に還元される反応を共役させ、formazan 量を比色測定した。上記のミトコンドリアを懸濁液 1 ml を 37°C, 5 min, プレインキニベーションを行って、5 min 後、0.5 M-コハク酸トリウム、0.1 ml および 1.5% (w/v) TTC 0.1 ml を加え、反応を開始し、10 min インキュベーションを行った。その後、トリクロム酸を加え、反応を止め、酢酸エチル 4 ml で formazan を抽出し、530 m μ で比色測定し、 $E_{max} = 16,700$ より formazan 量を求め、Fig-2 の結果を得た。本結果より HPA の最も強い活性作用が認められた。

2-3-1-3 thiokinase 活性

注3) 85% ニタノールは、MLHP が溶解する最良溶媒であり、MLHP を溶解した同濃度と酵素溶液の混合液には、多少の濁りが認められた。一方、HPA, HA, A は 85%以下ニタノールとも均一の溶液を作った。

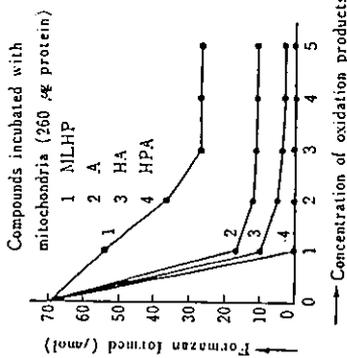


Fig-2 Effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on succinate dehydrogenase activities.

succinate dehydrogenase 活性の測定時と同様に調製したミトコンドリア懸濁液 5 ml にインキュベーション溶液における最終濃度が $0.5 \sim 2 \times 10^{-4}$ M となるように 85% ニタノールに溶解した酸化生成物 0.1 ml を加え、37°C で 5 min, インキュベーションを行った。インキュベーション後、succinate dehydrogenase 活性と同様の方法でミトコンドリアを分離し、0.25 M sucrose sol. に再懸濁後、Mahler の方法で CoA の -SH 基の減少量をニトロプロピルナトリウムにより比色測定し、活性度を測定した。すなわち、0.15 ml 中に 0.17 μ M-CoA, 1.1 μ M-ATP, 2.5 μ M-MgCl₂, 10 μ M-グリセロールリン (pH=8.0), 1 μ M-K₂HPO₄, 5 μ M-butyrilを含む基質溶液に、1 ml の酵素ミトコンドリア懸濁液 (0.8 肝臓液) を加え、38°C, 10 min, インキュベートした。10 min 後、2.0 ml 飽和 NaCl sol. 0.4 ml Na₂CO₃-NaCN, 0.4 ml nitroprusside reagent (27 mg sodium nitroprusside/ml) を加え、遠心分離後、520 m μ の吸光度を測定し、Table-3 の結果を得た。本結果より、lipase, succinate dehydrogenase 同様、thiokinase は HPA によって、最も強く活性を変

Table-3 Effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on thiokinase activities.

Oxidation products	Percentage of O.D. at 520 m μ	
	2×10^{-4} M	1×10^{-3} M
MLHP	74.0	85.9
HPA	4.8	7.6
HA	31.7	63.8
A	49.0	71.7
ML*	98.1	98.8

Incubated at 37°C for 5 min
Incubated with mitochondria (200 μ g protein)
* methyl linoleate

ることが明らかとなった。
2-3-2 赤血球凝集に及ぼす影響 (溶血率の測定)
HPA, HA, A, MLHP の溶血率を Capalin 5TM の方法で測定に基づいて求めた。すなわち、Tseu 5TM の方法で得た赤血球を 0.9% NaCl で洗浄後、0.2 M-リン酸緩衝液に懸濁した (1~5%)。この赤血球懸濁液 0.2 ml を、一定量の HPA, HA, A, MLHP に加え、37°C, 30 min インキュベートした。30 min 後、対照 (R_{00}) には、水 4 ml、管液 (R_1) と生理食塩水 (0.9% NaCl) 4 ml を加え、3,000 回転で 5 min 遠心分離後、上清を 550 m μ で比色し、溶血率を下記の TseuTM の公式で求め、Table-4 の結果を得た。

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{R_1 - R_0}{R_{100} - R_0} \times 100$$

R_1 : 試液
 R_0 : 酸化生成物を加えた試液
 R_{100} : 氷により 100% 溶血をおこした試液

本結果より、HPA の溶血作用が著しく強いことが明らかとなった。

Table-4 Comparative effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on red blood cells.

Compounds	μ mol in product of hemolysis
MLHP	11
HPA	0.037
HA	4.3
A	8.7

3 考察

自動酸化油の種々の酸化生成物のうち、最も毒性が強いと考えられてきた PO は、HPA の毒性に比べると、強い毒性を有することが第1報で明らかとなった。さらに、これは、本報告の *in vitro*, *in vivo* の両実験によって明らかとなった。HPA と PO (MLHP) の作用機構を比較する場合、おのおの分子の化学的性質も同時に考慮することは重要であると思われる。すなわち、HPA は MLHP 同様に -OOH 基を有し、また、取り扱った際、分解を免れるため、細心の注意が必要であったことから想像されるように、不安定、即ち反応性に富んでいたことは、分子量の差からくるものと考えられた。HPA, MLHP を投与したマウスの体脂肪の性状を検討した結果は、酸化生成物投与時の代謝障害の現象を顕著したにすぎないが、HPA の高い反応性による、脂質毒性の表れであると思われる。また、この反応性は、脂質毒性以外に、HPA 投与時の胃、小腸の出血、および腸管以外の組織構成物質との反応 (実験 2-2-2) だけでなく、*in vitro* の実験 (2-3) においては、強い HPA の酵素失活力の他にも、リパーゼとイン

キニベーション開始後、直ちに、インキュベーション溶液不溶の物質が沈殿したこと、ミトコンドリアの変色も認められたことなどからも明らかであった。また、化学的性質の相違の一つとして、HPA は MLHP より hydrophilic であった (実験 2-3-1) が、この性質は、体内作用機構を考慮する場合、重大な意義を持つものと思われた。実験 2-2, 2-3 より、HPA は MLHP より吸収されやすいこと、筋肉組織への移動が容易であること、酵素失活作用が強いことが明らかとなった。これは、上記のように、HPA が MLHP より hydrophilic であることも一原因であらうと思われる。さらに、2-1-1 で LD₅₀ を求めた際、致死量を投与した HPA 群は、超口投与法によっても、腹コウ内注射法によっても、投与後、直ちに、行動が極めて鈍り、外見上の変化は無く、死亡したことを述べたが、この症状は Finfrey らによって報告された気体状酸化油による呼吸機能の損傷の症状と類似していた。一方、PO (MLHP) を腹コウ内注射した実験動物にも、同様の症状が認められたが、超口投与法によっても、この症状は認められず、MLHP が吸収されにくいことが推測された。この観察からも、HPA の吸収のされやすさ、体内組織への移動の容易さが考えられた。今更には、酸化油全体の毒性を考慮する場合には、その発生していた種々の自動酸化油の比率における毒性の総和として考える必要があり、HPA のような一酸化生成物の持つ毒性の症状を、全酸化油による症状と比較して、一酸化生成物の全酸化油に及ぼす毒性の寄与の程度を知ることが困難であるとも思われる。すなわち、自動酸化油の毒性は、第1報でも述べたように、種々の酸化生成物の総和であり、一酸化生成物の量は知ることは、難しいと思われる。したがって、単一の物質の毒性の程度を比較する場合には、HPA が最も強い毒性を有することが明らかである。

4 要約

第1報で、自動酸化油の種々の酸化生成物のうち、単一物質として最も強い毒性を有する物質は HPA であることが明らかとなったが、さらに、HPA の毒性発生機構を、従来、自動酸化油の毒性の本質といわれてきたペルオキシド (本研究では PO の一つである MLHP を選んだ) のそれと、1) HPA, MLHP の超口投与、腹コウ内注射法による LD₅₀ の測定、2) HPA, MLHP 投与時の体脂肪の P.O.V., C.O.V. の測定、3) *in vitro* における両物質の酵素失活作用の比較、4) *in vitro* における溶血率の測定などにより比較した結果、HPA は、その高い反応性による、胃、小腸壁に対する作用とともに

に、少なくとも一部は吸収され、体内組織に運搬され、代謝系群衆に阻害的に働いたり、成長を遅くさせたりするものと思われる。一方、MLHP は、体内の臓器に運ばれにくいものと思われるが、各組織に運ばれたものは、HPA 同様の作用を及ぼすものと推測された。しかし、その作用の程度は、HPA に比べると、かなり弱いものであった。

(昭和48年9月18日受理)

文 献

- 1) 吉岡, 安田, 油化学, 21, 23 (1972)
- 2) 吉岡, 鈴木, 安田, 油化学, 21, 83 (1972)
- 3) P.J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 4) A.L. Tappel, Arch. Biochem. Biophys., 80, 326 (1959)
- 5) A. Onoleggi et al., Arch. Biochem. Biophys., 58, 157 (1955)
- 6) F. Bernheim et al., Arch. Biochem. Biophys., 38, 177 (1952)
- 7) E.D. Willis, Biochem. Pharmacol., 7, 7 (1961)
- 8) C. Little et al., Biochem. J., 101, 13 P (1966)
- 9) R.C. Maknight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 10) A.L. Tappel et al., Arch. Biochem. Biophys., 80,

- 326 (1959)
- 11) H. Zalkin et al., Arch. Biochem. Biophys., 81, 113 (1960)
- 12) L.A. Winters, J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 908 (1965)
- 13) J.S. Andrews et al., J. Nutr., 70, 199 (1960)
- 14) T. Nishida et al., J. Lipid Res., 1, 450 (1960)
- 15) J.G. Bergan et al., Lipids, 5, 976 (1970)
- 16) T. Kaneda et al., J. Biochem. (Tokyo), 42, 561 (1955)
- 17) J. Bunyan et al., Brit. J. Nutr., 22, 97 (1968)
- 18) 日本油化学協会誌 "基礎油成分分析法" p. 120 (1966), 朝倉, 東京
- 19) 能沢, 大沢, 油化学, 14, 167 (1965)
- 20) D.L. Stammen et al., J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 920 (1965)
- 21) W.C. Schneider et al., J. Biol. Chem., 181, 123 (1950)
- 22) A. Ogano et al., J. Biochem., 60, 197 (1966)
- 23) H.R. Mahler et al., Biol. Chem., 204, 453 (1953)
- 24) S. Capalba, Rev. Roum. Physiol., 7, 1 (1970)
- 25) C.C. Tsou, Canad. J. Biochem., 38, 957 (1960)
- 26) G.M. Findlay, Lipids, 5, 970 (1970)
- 27) 厚生省食品衛生局資料 March (1965); 三浦ら, 食料誌, 7, 67 (1965)

自動酸化油の毒性に関する研究 (第 4 報)

自動酸化油投与時の代謝障害

吉岡 優子・立花 邦子・金田 尚志
 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市青葉区宮町 1-1)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. IV. Impairments of Metabolic Functions Induced by Autoxidized Methyl Linoleate

Masako YOSHIOKA, Kuniko TACHIBANA and Takashi KANEDA
 Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University
 (1-1, Tsutsumi-dori, Aramaki-cho, Sendai)

Before 1962, the studies on the toxicity of autoxidized oils were conducted using either partly fractionated autoxidized oils or intact oils. From these works, it was generally concluded that peroxides were the most toxic compounds yielded in autoxidized oils. With improvements in methods for preparation of pure hydroperoxides, much attention had been paid to the toxicity of hydroperoxides. It was found however, in previous papers^{1,2,3,4}, that the toxicity of autoxidized oils come from all the toxic compounds and not from a single compound and that with no information concerning composition of oxidation products, it was not determined which compound was the major contributor to the toxicity. Early works which concluded that peroxides were the most toxic, were carried out when P.O.V.s of autoxidized oils were on the increase. Therefore, peroxides were presumably the major component in those autoxidized oils. Thus, it is significant to investigate the toxicity of autoxidized oils with various properties as well as a single compound in autoxidized oils. The present paper is concerned with investigation of relationships between properties of autoxidized oils and the degrees of impairments of metabolic functions induced by them.

1) Methyl linoleate was autoxidized at 40°C by oxygen. While P.O.V.s were determined periodically, four samples were collected in the course of autoxidation. P.O.V.s and CO.V.s of four samples were as follows: No. 1 (P.O.V. 8, CO.V. 20), No. 2 (P.O.V. 2,205, CO.V. 875), No. 3 (P.O.V. 922, CO.V. 3,400), No. 4 (P.O.V. 420, CO.V. 1,675). Each sample (1/1,000 gram of rat body weight) was administered to 20 male rats of Wistar strain for 22 days.

2) The growth was recorded by observing weight gains. It was learned that the weight gain of No. 4-administered group was the smallest followed by No. 3. There was no significant difference in weight gains between No. 1 and No. 2 administered groups.

3) After feeding period of 22 days, hemolysis of red blood cells of the four groups of rats were determined. It was apparent that the highest hemolysis was observed in No. 4 treated rats.

4) Enzyme activities (Succinate dehydrogenase, Thiokinase) of liver mitochondria of three groups of rats (No. 1, 2 and 4) were determined. It was evident that both enzyme activities were the lowest in No. 4 administered group.

From these results, authors concluded that the toxicity of autoxidized oils was dependent on the amount of secondary degradation products rather than peroxides.

* Yoshioka and Kaneda, *Yakugaku*, 71, 23 (1972) ** Yoshioka, Suzuki and Kaneda, *ibid.*, 71, 881 (1972)

1 編 查

著者らは、既報¹⁾で、自動酸化油の種々の酸化生成物のうち、低分子化合物は、ペルオキシド(PO)より以上に、

注 1) ペルオキシド(PO)と記述する場合は、従来、不飽和自動酸化油の毒性の本題と行われてきたPOのよりに、第1報で述べた炭素数5-9のHFAに比べ、高分子のPOをさす。

し、活性度を測定した。すなわち、Schneiderら²³⁾の方法により、ラット肝臓 1gより調製したミトコンドリアを 0.25 M-シスリン緩液、1 ml 懸濁し、37°C、5 min、ブレインキニネット後、コハク酸ナトリウム、I.T.C. を加え、反応を開始し、10 min、インキニネットした。インキニネット後、トリクロロ酢酸で反応を止め、酢酸エチルで formazan を抽出し、550 m μ で比色定量し、formazan 量を求め、Table-5 の結果を得た。本結果より、II 群より III 群の酵素活性が近いことが明らかであり、succinate dehydrogenase は PO よりも、2 次酸化生成物により、より大きく活性を受けることがわかった。

2.5.2 thiokinase 活性

succinate dehydrogenase 活性の測定時と同様、Schneiderら²³⁾の方法により、I~III 群のラット肝臓よりミトコンドリアを調製し、本ミトコンドリアを酵素源とし、第 3 報と同様に、Mahler 5²⁴⁾の方法により CoA-SH 基の減少量をニトロプロピルナトリウムにより比色定量し、活性度を測定した。すなわち、1 ml の酵素ミトコンドリア懸濁液 (1 g 肝臓/0.25 M-シスリン緩液) を CoA, ATP, MgCl₂, glycylglycine, KBH₄, butyrate を含む 0.15 ml の基質溶液に加え、35°C、10 min、インキニネット後、2.0 ml 飽和 NaCl sol. 0.4 ml Na₂CO₃ -NaCN、0.4 ml nitroprusside reagent を加え、速心分離後、520 m μ の吸光度を測定し、Table-6 の結果を得た。

Table-6 Thiokinase activities of rat liver mitochondria.

Group of rats	O.D./Protein (g)	
	I	II
	7.55 \pm 0.64*	6.87 \pm 0.64
		5.52 \pm 0.71

* Mean \pm standard error of 5 rats/group

I, II and III represent groups of rats administered No. 1, No. 2 and No. 4 in Table-1.

本結果より、thiokinase 活性は succinate dehydrogenase 活性同様、PO よりも、2 次酸化生成物により低下することが明らかとなった。

3 考 察

結果で述べたように、自動酸化油全体の毒性を排除したものは、P.O.V. が上昇時のものが大半を占めているが、それらの結果によると、P.O.V. と毒性の程度は比例するという結果であった。著者らも、第 1 報で、P.O.V. の上昇時の酸化油について同結果を得た。本研究では、上昇時のものは、新製油に近いもの (No. 2) のもの (No. 1) と P.O.V. が極大に近いもの (No. 2) の二点のみを検討したので、上昇時のものを投与したラ

ットの代謝障害の程度を P.O.V. と関連づけることはできない。しかし、少量 (体重の 1/10,000) 長期 (22 日間) にわたり投与した結果では、P.O.V. が 2,205 のものでも、体重の増加は、新製油に近い No. 1 を投与した I 群とほぼ変わらなかった。また、体脂肪の P.O.V. を検討したところ、I 群と II 群には、肝臓、コウラにやや差が認められたが、この差は、I 群と、2 次酸化生成物含量の多い IV 群の差に比べると、わずかなものであった。また、小腸、ジン臓周囲の脂肪では、差が認められなかった。酵素活性、溶血作用なども、I・II 群間の差は、I・III、I・IV 群間に比べるとわずかにあった。本研究で調べた、体脂肪の性状の変化、溶血作用、酵素活性などは、代謝障害のわずかな例にすぎず、その他の種々の代謝障害を検討する必要があるものと思われるが、上述の結果からすれば、自動酸化油の投与による毒性は、2 次酸化生成物の方が、PO によるものよりも顕著に現れるといえさうである。また、No. 2, No. 3 の種々の酸化生成物の量を検討しなかったが、No. 2 の P.O.V. は 2,205 であり、No. 3 (920), No. 4 (420) に比較すると、かなり高い値を示しながら、体脂肪に蓄積された PO 量は、No. 3, No. 4 の方が高く、No. 4 の 2 次酸化生成物中に、第 3 報で述べた、HPO No. 4 の 2 次酸化生成物中に、第 3 報で述べた、HPO より容易に吸収され、体組織に運搬されやすい HPA のようなヒドロキシル基が、体脂肪の PO の蓄積に何らかの役割を果たしているのではないかと思われる。

4 要 約

自動酸化油を少量、長期間にわたり投与し、いかなる性状のものか、代謝障害をおこす割合が大きいかを検討するため、酸化程度の異なる自動酸化油を投与したラットの体脂肪の変化、溶血率、酵素活性などを代謝障害の一例として調べた。その結果、阻害度は、PO の多少よりも、2 次酸化生成物含量に左右されることが明らかとなった。

(昭和 48 年 9 月 2 日受理)

文 献

- 1) 吉岡, 釜田, 油化学, 21, 28 (1972)
- 2) 吉岡, 杉木, 釜田, 油化学, 21, 881 (1972)
- 3) 吉岡, 釜田, 油化学, 23, 321 (1974)
- 4) 釜田, 杉木, 石井, 日水産, 20, 50, 68 (1954); J. Biochem., 42, 561 (1955)
- 5) 松尾, J. Biochem., 41, 481, 647 (1954)
- 6) E.H. Groot et al., *Experientia*, 9, 189 (1953)
- 7) C.E. Poling et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 34, 315 (1957)
- 8) J.S. Andrews et al., *J. Nutr.*, 70, 199 (1960)
- 9) J.P. Freeman, *Chem. Ind.*, 1954, 1543
- 10) J. Bunyan et al., *Brit. J. Nutr.*, 22, 97 (1968)
- 11) J. Glavind et al., *Acta Physiol. Scand.*, 48, 97 (1960)
- 12) T. Nishida et al., *J. Lipid Res.*, 1, 450 (1960)
- 13) I.D. Desai et al., *J. Lipid Res.*, 4, 204 (1963)

- 14) W.T. Roubal et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 113, 5 (1966)
- 15) W.T. Roubal et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 113, 150 (1966)
- 16) F. Andreats et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 779 (1965)
- 17) E.D. Willis, *Biochem. Biophys. Acta*, 98, 238 (1965)
- 18) 日本油化学会編「基礎油質分析試験法」, p.170 (1966). 朝倉, 東京 (1950)
- 19) A.S. Henick et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 31, 88 (1954)
- 20) D.L. Stamm et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 920 (1965)
- 21) L.A. Wittkop, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 908 (1965)
- 22) 池田, 杉山, *Vitamins (Japan)*, 37, 31 (1968)
- 23) F.J. O'Brien et al., *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 9 (1966)
- 24) A. Ogano et al., *J. Biochem.*, 59, 197 (1966)
- 25) W.C. Schneider et al., *J. Biol. Chem.*, 182, 123 (1950)
- 26) H.R. Mahler et al., *Biol. Chem.*, 204, 453 (1953)

Table-1 Toxicity test of oxidized methyl linoleate. Relationship between survival hours and oxidation hours

Oxidized ester No.	Total mice killed	Numbers killed within 18 hr	Numbers killed within 36 hr	Numbers killed within 40 hr
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	1	0	0	1
4	3	0	1	3
5	2	0	2	2
6	5	0	0	5
7	5	1	1	5
8	5	1	5	5

Five mice were used for each group.

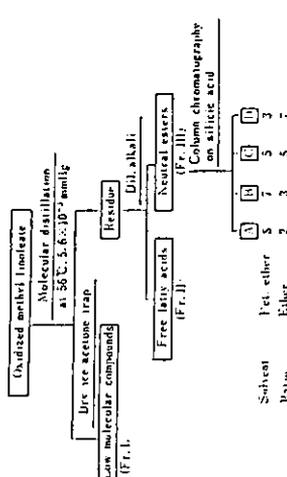


Fig. 2. Fractionation of autoxidized esters.

3 自動酸化油脂の毒性区分の分画

3-1 分画法
自動酸化エステル中のいかなる成分の毒性が最も強いかを検出するための分画を試みた。すなわち、2-1, 2で最も強い毒性を示した No. 8 (P.O.V., 1620, CO.V. 1530) を Fig. 2 に示すように 56°C, 5.6 x 10⁻³ mmHg で分子蒸留し、ドライアイス-アセトントラップで低分子区分 (I) を捕集した。残留区分をアルカリで処理し、遊離脂肪酸 (II) を除去し、さらに吸着カラマクロマトグラフィーにより種々の差を利用して、石油エーテル-ジエチルエーテル系で4区分 (即-A, III-B, III-C, III-D) に分画した。

3-2 分画区分の化学特徴

3-1 で分画した各区分の性状を推定するために、I, O.V., CO.V. および平均分子量を測定した。その結果 Table-2 に示すように、I 区分の CO.V. は約 800 と高い値を示し、低分子カルボニル化合物を主とするところ、また III-A 区分はリノール酸ヒドロペルオキシド環状体、III-D 区分はリノール酸二環体が主成分であろうと思われた。II 区分の平均分子量はリノール酸よりも大きいことが注目された。

Table-2 Characteristics of fractionated compounds.

Fractions	P.O.V.	CO.V.	M.M.W.*
I	603	7,953**	120
II	241	450	453
III-A	6,772	260	330
III-B	3,642	434	344
III-C	2,536	219	435
III-D	1,996	1,689	587

* Mean molecular weight

** The reaction was carried out in sealed ampouls.

3-3 分画区分の毒性試験

分画した各区分を体重 25g 程度のマウスに前試料と同様の方法により、0.058 mg/kg ずつ投与し、毒性の程度を比較し、Table-3 の結果を得た。本結果によらば I 区分の毒性が最も強く、II 区分、III-D 区分がこれに次いで、また従来より毒性の本態であると指摘されたヒドロペルオキシド区分 (III-A) の毒性は弱いことが注目された。死亡直後のマウスの内臓の症状を観察したところ I 区分は胃の腫脹が顕著であったのに対し、II および III-D 区分の胃は一見充血ともいふべき状態であった。

4 低分子区分 I の毒性

4-1 低分子区分の分画

低分子区分中のいかなる物質が強い毒性を示すかを明らかにするために、毒性の差を利用して分画を試みた。前述の通り本区分の P.O.V. は 603, CO.V. は 7983 であり、平均分子量は小さく反応性に富むものと考えられた。そこで分画中の酸化を減少量におさえるため、短時間で分画可能な方法としてドライカラマクロマトグラフィーを用いた。すなわち 2cm x 2.5cm のナイロンチューブに、10% の水を加え活性炭を添したドライカラマクロマトグラフを用いるシリカゲル 310g を詰めサンプリング 12g を吸着させ、ベンゼンで展開し、10cm の間隔でカラマを切り 22 の区分に分け (I-1~I-22)、各区分をエーテルで抽出した。おのおの区分につ

Table-3 Toxicity test of fractionated compounds on mice.

Fractions	Numbers killed within 2 hr		Numbers killed within 16 hr		Numbers killed within 24 hr	
	Total mice killed	Numbers killed within 2 hr	Total mice killed	Numbers killed within 16 hr	Total mice killed	Numbers killed within 24 hr
I	5	5	5	5	5	5
II	4	0	3	4	4	4
III-A	1	0	0	1	1	1
III-B	0	0	0	0	0	0
III-C	0	0	0	0	0	0
III-D	3	0	0	0	0	3

Five mice were used for each group.

Table-4 Fractionation of low molecular compounds (Fr. I) and the toxicity of fractionated each subfraction.

Dry column No. and subfractions	Functional groups by IR	Staining reaction on TLC	Total mice killed
1 (A)	Ester	+	0
2	Ester, Sat. ald.	++	+
3 (B)	Sat. ald.	+++	1
4	Sat. ald., Unsat. ald.	+++	+
5~11 (C)	Unsat. ald.	+++	3
12	Unsat. ald., Hydroperoxy unsat. ald.	+++	+
13, 14 (D)	Hydroperoxy unsat. ald.	+++	6
15	Hydroperoxy unsat. ald., Hydroxy ketone?	+++	+
16, 17 (E)	Hydroxy unsat. ketone?	+++	4
18 (F)	Hydroxy unsat. ald.	+++	+
19	Hydroxy unsat. ald., Acids	+++	4
20, 21	Acids	+++	+
22	Hydroxy, Hydroperoxy acids	+	+

* Saturated aldehyde
** Unsaturated aldehyde
*** 2,4-Dinitrophenylhydrazine
+ weak
++ medium used for each
+++ strong subfraction.

いて、IR, TLC を行ない、その組成を推定した (Table 4)。

4-2 低分子区分 (Fr. I) の毒性

4-1 で分画した各区分のうち、IR で同一官能基を持つものと思われた区分は、Table-4 に示すように I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F とし、これら各区分の毒性を比較した。すなわち、体重 15g のマウスに 0.1 ml ずつ投与したところ Table-4 のような死亡を示した。これより 1 分子中に -OOH 基とカルボニル基とを有すると思われる物質 (I-D) の毒性が最も強いことを認めた。I-D 区分に続きヒドロキシカルボニル化合物区分 (I-E), (I-F) が強い毒性を示した。おのおの分画区分の死亡直後の内臓を観察すると、I-D を与えたものの胃は黒ずんだ赤色で半透明状に変化しているのに対し、I-C 区分では胃・腸に異常な膨脹が見られた。これは hex-2-en-1-ol, oct-2-en-1-ol を与えたものとまったく一致した症状であった。I-22 は、-OOH, -OH, -COOH などの基化合物であるが、この区分は与毒時の内臓は著しく黄褐色に変化していた。

4-3 I-D 区分の同定

I-D 区分の IR 図 (Fig. 3) より 3450 cm⁻¹ の -OOH または -OH による吸収、1685 cm⁻¹ の共役アルデヒド、980 cm⁻¹ の trans 二環構造が推定された。一方 P.O.V. を測定したところ 14,138 eq/kg であった。また同区分をベンゼンにより TLC 上で展開したところ、N1-star-

ch. および 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) 陽性の単一のスポットが認められた。この区分を ZnCl₂ により -OOH を -OH に還元し、2,4-DNP により 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) 誘導体とした。得られた 2,4-DNPH 誘導体を phenoxethanol impregnated Wacogel B-O 上で hexane により多量展開し、四つのスポットを得、R_f 値の大きいものより、I-D-1, I-D-2, I-D-3, I-D-4 とした。おのおののスポットをかきとって融点測定および元素分析を行なった結果、I-D-1, mp=153°C, C=53.65%, H=5.91%, N=16.60%, I-D-2, mp=145°C, C=52.09%, H=5.55%, N=17.43%, I-D-3, mp=197°C, C=48.78%, H=4.75%, N=18.59%, I-D-4, mp=171°C, C=47.10%, H=4.23%, N=20.10% であった。元素分析の結果はおのおの hydroxymonenal, hydroxyacetal, hydroxyhexenal, hydroxypentenal に近似するものであった。またいずれのスポットも、クロロホルム中の可溶性部吸収は 375 mμ にあった。これより二環構造に共役しているものと思われた。一方 I-D-2, I-D-3 の質量スペクトルを測定した。(Fig. 4) I-D-2 は熱分解され、このままの形で測定不可能であったため、neotame にした。I-D-3 に関しては I-D-2 と比較のため同様の操作にした。Fig. 4 の上部に示した m/e=294 は hydroxyhexenal の分子式であり、m/e=276, 269 はおのおの [M-H₂O]⁺, [M-(H₂O+OH)]⁺ に相当するものと思われた。また m/e=57, 237 は水素の置換列およびアルデヒド炭素値の C₂ と C₃ の開裂に基づいて生じたものと思われた。Fig. 4, 中央チャートにおいて m/e=206 は hydroxyhexenal の acetate の分子式で [M-CH₃COOH]⁺, m/e=258 はおのおの [M-CH₃COOH]⁺, Fig. 4, 下段チャートにおいて m/e=364 は hydroxyoctenal の分子式であり、304, 302, 386 は Fig. 4, 中央と同様に [M-CH₃COOH]⁺, [M-(CH₃COOH)]⁺, [M-(CH₃COOH+H₂O)]⁺ である。Fig. 4, 中, 下段における m/e=42, 154, 202, 246 のピークの帰属は明らかでないが、Esterbauer¹¹⁾, Sherman¹²⁾, Grady¹³⁾ の方法により合成した 4-hydroxyoctenal acetate のピークと一致した。さらに、hydroxyl 基の帰属を明らかにするために核磁気共鳴スペクトルを測定した (Fig. 5, 6)。Fig. 5 において τ=9.1 は CH₃ の 3 個のプロトンに τ=6.5 は -CH₂- の 2 個のプロトンに、τ=5 は -N-H- プロトンに、τ=2.3, 1.7, 1.2 は芳香環の 3 個のプロトンに、τ=1.8 は -N-CH₂- のプロトンに帰属されたと推定された。また NMR (Fig. 5, 中段) で Fig. 5-5 上段に見られた τ=1.3 のピークが消失したこと

数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-al が最も強い毒性を示すことが明らかとなった。有毒物質の毒性発生機構に関しては、病理学的研究を必要とするが、マウスの死亡直後の内臓の症状を観察するという簡単な操作から判断すると、種々の有毒物質はおのおの異なる作用機構を有するのではないかと思われる。

6 要 約

1) リノール酸メチルの誘性は、酸化程度により、成分および量比が異なり、一團にいかなる物質が最も強い毒性を示すとはいえないが、P.O.V. がピークに達する前において、従来から指摘されたヒドロペルオキシドが毒性に著しく関与するものと思われる。一方 P.O.V. がピークに達し、CO.V. が急激に上昇し始めるとヒドロペルオキシドの二次分解産物である低分子化合物が主として毒性に寄与するようになる。また低分子化合物のうちでも炭素数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-al の毒性が最も強いことを見いだした。

2) 種々の有毒物質の毒性発生メカニズムは、マウスの死亡時の症状よりすると、異なるように思われた。(昭和47年2月25日受理)

文 献

- 1) 金田ら、日本産誌, 18, 171 (1953); 20, 50, 658 (1954) 栄養と食糧 7, 54 (1954); J. Biochem., 41, 327 (1954); 42, 561 (1955); 北海道新聞, No. 12, 1 (1955)
- 2) 土田ら、物化学討論会, 昭和44年, 天夜
- 3) E. Schauenstein, J. Lipid Res., 8, 417 (1967)
- 4) P. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 5) R.C. Mcknight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 6) B.O. Christophersen et al., Biochem. J., 100, 95 (1966)
- 7) C. Little et al., Biochem. J., 102, 10 P (1966); 101, 13 P (1966); C. Little, Biochem. Biophys. Res. Comm., 31, 145 (1968)
- 8) P.J. O'Brien et al., Biochem. J., 103, 32 P (1967)
- 9) I.D. Desai et al., J. Lipid Res., 4, 204 (1963)
- 10) J.S. Andrews et al., J. Nutr., 70, 199 (1960)
- 11) 竹村, ビタミン, 36, 187 (1967)
- 12) R.T. Holman et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 702 (1965)
- 13) P. Doboulos, Biochim. Biophys. Acta, 3, 371 (1949)
- 14) H. Esnerbauer, Monatshefte Fur Chemie, 88, 194 (1967)
- 15) J.C. Sheehan, J. Amer. Chem. Soc., 71, 1:37 (1949)
- 16) M. Grand, Ann. de. Chim., 10, 336 (1930)

た。すなわち、P.O.V. が頂点を過ぎ減少の傾向にある酸化エステルより時間を過ぎて3試料を採取し、P.O.V. の大きなものより No. 1, No. 2, No. 3 とした。この3試料、および分子蒸留によって低分子区分を除いたものをマウスに与え、毒性の程度を調べた。その結果 Table-5 に示すように酸化時間の長いものほど低分子区分の収量が増加し、死亡率の高いこと、低分子区分の除去により、生存率が回復することがわかった。これより低分子区分は P.O.V. が減少している段階の酸化油において、その毒性に大きな影響を持つことが推測された。

Table-5 The degree of contribution of low molecular compounds.

Oxidized ester No.	P.O.V.	CO.V.	Numbers killed**		Yield of low molecular comps. (%)
			Before M.D.	After M.D.	
1	1,820	1,320	0	0	0.9
2	1,621	1,532	1	0	1.1
3	421	1,709	5	1	1.8

** Molecular distillation
** Five mice were used for each test.
0.1 ml of oxidized ester was fed to mouse weighing 15 grams.

5 考 察

自動酸化油中の有毒物質として従来から指摘された脂肪酸エステル、または酸の過酸化物の誘性は、これが分解して生じる二次酸化生成物に比べるとかなり弱いのであった。また二次酸化生成物のうちでも炭素数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-al が最も強い毒性を示した。しかしながら、自動酸化油の誘性は、油自体がどの程度酸化されたものであるかにより誘性の原因となる主たる物質が異なってくる。すなわち、P.O.V. がピークに達する以前においては、従来より指摘されたヒドロペルオキシドが毒性の原因物質となり、ピークを過ぎ二次酸化生成物が増加する段階においては、低分子化合物がおもな有毒物質となる。また種々の有毒物質の量比も問題である。このように、自動酸化油の有毒成分に関しては、自動酸化の経過を知ることなしには、いかなる物質が最も強い毒性を示すのが明言できない。しかし、種々の成分を単一物質として取り出し、その毒性の強弱を問題にする場合には、二次酸化生成物のうちでも炭素

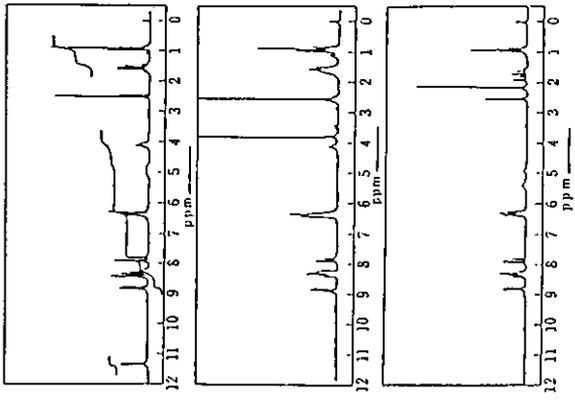


Fig-5 NMR of 1-D-3 (top), 1-D-1 (bottom) in DMSO-d₆.

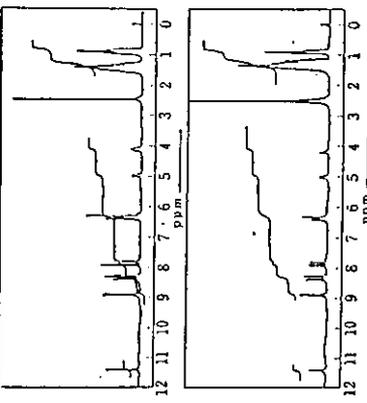


Fig-6 NMR of 1-D-2 (up) and 1-D-1 (down) in DMSO-d₆.

区分は炭素数 5 から 9 の 4-hydroperoxy-2-en-1-al が主成分であることが明らかとなった。

4.4 低分子区分の毒性への寄与の程度
2.1.2 で酸化時間の長いものほどマウスに対する毒性が強く、また 3.3 で種々の酸化生成物のうちでも低分子区分が最も強い毒性を示すことを指摘したが、この低分子区分の毒性の程度は全酸化油の毒性に対してどの程度のものであるかを調べるため、以下の実験を行なっ

より、-OH プロトンのシフトが確認された。さらに Fig-5, 上に昇られた $\tau=5.9$ のピークが、1-D-3 の acetate の誘導体の NMR (Fig-5, 下段) で $\tau=4.6$ に移動したことにより、Fig-5, 上段の $\tau=5.9$ のプロトンは -OH 基と同じ炭素に結合していることがわかった。また、acetate にすることによって、-CH₂-CH=CH- のピークの形が変わったことが観察された。これらのことから -OH 基はアルデヒド炭素隣の 4 位にあり、1-D-3 は 4-hydroxy-hex-2-en-1-al であることが明らかとなった。Fig-6 も Fig-5 同様に確認され、4-hydroxy-oct-2-en-1-al, 4-hydroxy-non-2-en-1-al であることがわかった。なお 1-D-4 は炭が少なく、融点測定、元素分析、UV 以外の分析ができなかったが、これらの結果からすれば、hydroxypentenal であると推定された。以上のことにより、1-D 区分の還元物は 4-hydroxy-2-en-1-al であると思われたが、一方、四つのスポットの mol 比が 2.3:2.3:5.1:0.3 であり、また P.O.V. が 14.138 eq/kg であることより、1-D



Fig-3 IR spectrum of 1-D fraction.

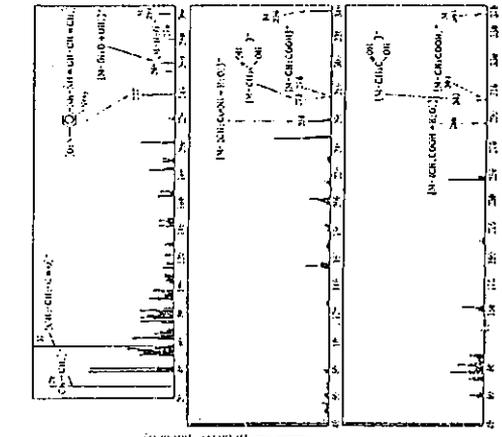


Fig-4 Mass spectra of 1-D-3 (top), acetate of 1-D-3 (middle) and acetate of 1-D-2 (bottom).