

# リノール酸メチルの酸化生成物とその毒性

土田雅子・三浦利之・武藤 健・宮木高明

国立予防衛生研究所 (品川区上大崎 2-10-35)

## Studies on Oxidation Products Derived from Methyl Linoleate and Their Toxicities for Mice and Chick Embryos

Masako TSUCHIDA, Toshiyuki MIURA, Takeshi MUTO and Kōmei MIYAKI  
National Institute of Health (2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo)

1) A number of methyl linoleate derivatives, all highly purified, were examined on their toxicities for the mice and the chick embryos. Each substance was administered to the mice with a gastric tube or to the yolk sacs of the chick embryos through the egg shells with an injector. The results obtained from both animals were quite similar.

2) The compounds used in this experiment were as follows; methyl hydroperoxyoctadecadienoate (HPO), methyl hydroxyoctadecadienoate (HO), methyl ketoctadecadienoate (K), methyl hydroperoxyepoxyoctadecadienoate (HE), methyl trihydroxyoctadecadienoate (T), methyl octadecadienoate (*cis*, *trans*-conjugated) (*r*-C), methyl epoxyoctadecadienoate ( $\alpha$ -unsaturated) (E $\alpha$ ), methyl epoxyoctadecadienoate ( $\beta$ -unsaturated) (E $\beta$ ), methyl linoleate (ML), and methyl ricinolate (MR). Five compounds from the top of the above, especially HE, proved to have strong toxicities as compared with methyl linoleate. When the relation between the radicals in these compounds and their toxicities was investigated, the toxic strength came in the order of  $\cdot\text{OOH} > \cdot\text{CO} > \cdot\text{OH}$ .

3) The characteristic disorders were found in all the mice administered with toxic substances, in more or less degree. Those were atrophy of the spleen, marked dilatation of the intestine, several histological changes in the lymphatic system, and decrease in the leucocyte count in the blood.

4) It was shown that the toxic lesions in the mice induced by these compounds were quite the same as those by the rancid edible oils seen previously. These results indicate that the toxicity of rancid edible oils is the sum of the toxicities of numerous oxidation products.

述、マウスに発現する結核変(化合物によって病状に程度の差はあるが、共通していた)について検討した結果、変化した食用油脂の毒性とまったく一致した傾向を示すことを確認した。これらの成績より、変敗油脂の毒性は単一な物質ではなく、数多くの酸化生成物のもつ毒性の総和によるものであることを明らかにした。

### 2 実 験

#### 2-1 試 料

毒性試験に用いた試料の種類は、Table-1 に示した。この中、ML (対照)、MR はいずれも市販(東京化成工業)のものをそのまま使用したが、そのほかのものについては、以下に従って ML より調製した。

2-1-1 試料の調製 HPO: ML を暗所、0°C で酸素を吹き込み、P.O.V. 約 100 に至ったら、温度を 40°C に上げて、再び P.O.V. 約 2,000 まで酸化を続行し、シリカゲルカララムクロマトグラフィーによって分離精製

TO による毒性発生機構については、緒言で述べたように、油脂の消化率の低下、酵素作用の不活性化に伴う代謝異常、Toc および必須脂肪酸の欠乏に基づく生理作用の低下と肝臓内の必須脂肪酸の酸化促進作用などがあり、上記以外に本実験のように、タンパク質およびアミノ酸の損傷に伴う阻害作用もあるかも知れない。今後、タンパク質およびアミノ酸の面からさらに毒性問題について検討したい。ところで、従来、変質油の毒性を軽くする方法として、ピロキニン、リポフラビン<sup>2)</sup>、トコフェロール<sup>3)</sup>などのビタミン類の補充、良質タンパク質の多量投与(基本飼料に 30%)<sup>4)</sup>などが報告されているが、それぞれ損失したビタミン、タンパク質およびアミノ酸の補充にあたっては、毒性を防止する意義があるのかも知れない。

終わりに癌みずノ酸の分析に御協力をいただいた、本学既卒夫教授に感謝致します。

### 文 献

(昭和48年3月9日受理)

- 1) 松尾, 油化学, 12, 261 (1963)
- 2) E.W. Crumpton et al., *J. Nutrition*, 43, 431, 533 (1951); 44, 177 (1951); 59, 333 (1953); 80, 13 (1956); 82, 341 (1957)
- 3) D. Firsione et al., *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 38, 253 (1961)
- 4) N.R. Bottino, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 39, 25 (1962)
- 5) E.G. Perkins, F.A. Kummerow, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 36, 371 (1959)
- 6) L.W. Hollenman, D.R. Koellens, *Rec. Trav. Chim.*, 58, 666 (1959)
- 7) S.S. Weinstein, A.M. Wynne, *J. Biol. Chem.*, 112, 641 (1935)
- 8) 松本, 油化, 油化学, 14, 520 (1965)
- 9) 松本, 油化学, 18, 66 (1970); 20, 20 (1971)
- 10) D. Fivestone et al., *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*

### 1 緒 言

従来より自動酸化あるいは加熱油脂の毒性について、ヒドロペルオキシド<sup>1)</sup>、カルボニル化合物<sup>2)</sup>、ヒドロキシド<sup>3)</sup>、エポキシド<sup>4)</sup>、重合体<sup>5)</sup>、環状化合物<sup>6)</sup>、あるいは低分子化合物<sup>7)</sup>など数多くの報告があるが、必ずしも一致した見解は得られていない。これは、油脂の酸化がラジカル反応で、連鎖的に進行し、しかも反応条件を投与に反映することから、生成物が複雑多岐にわたることと、これら生成物の性質が互いに類似したものが多く構造的にいくつ分解のむずかしさによるものと思われる。

われわれは変敗した食用油脂の毒性を究明するため、リノール酸メチルの酸化生成物および化学的に調製したいくつかの誘導体(いずれも炭素数 18 の化合物)について、マウス、鶏ハイに対する毒性を検討した。すなわち、これら酸化生成物の毒性の強さと活性基の関

Table-1 Samples prepared for biological examination.

(HPO)	HO: 上記 HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(K)	K: HO を三酸化クロム-ピリジン錯体によって酸化した <sup>1)</sup> 。
(HO)	HO: 上記 HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(HE)	HE: HPO を m-クロロ過安息香酸でエポキシ化した。
(T)	T: HO を三酸化クロム-ピリジン錯体によって酸化した <sup>1)</sup> 。
(I-C)	I-C: HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(E <sub>1</sub> )	E <sub>1</sub> : HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(E <sub>2</sub> )	E <sub>2</sub> : HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(ML)	ML: HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。
(MR)	MR: HPO を水酸化ホウ素ナトリウムで還元した <sup>1)</sup> 。

トリウムおよび水でそれぞれ救済液を添加し、1hr 放置後、5% 水酸化ナトリウムで脱色し、減圧下で溶媒を留去した。  
T: UV 照射した ML より、前報<sup>1)</sup>に従って分離精製した。

I-C: リノール酸をアルカリによって共役化し<sup>1)</sup>、さらにヨウ素-光によりエライジン化の後<sup>2)</sup>、硫酸-メタノールでメチル化した。

E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>: I-C および ML をそれぞれ HIE の場合と同様にエポキシ化し、E<sub>1</sub> および E<sub>2</sub> を調製した。

上記試料は、いずれも 2°C でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、使用時以外は、-20°C のフリーザー中に保存した。

2-1-2 試料の同定 主として IR, UV スペクトル, TLC などにより試料の同定を行なった。IR は日本分光 IR-G を用い、試料は液膜あるいは固体膜として測定に供した。UV は島津 QR-50 により、0.001% エタノール溶液として測定した。

2-1-3 試料の純度 各試料の薄層クロマトグラムのデンシトメトリーにより求めた。すなわち、呈色はリノリンブチン酸誘導体後、100°C, 7 min の加熱により、明日香工業 Ozumor SD-91 によって測定した。

2-2 毒性試験

毒性試験の対毒動物には、鶏ハイおよびマウスを用いた。鶏ハイ法<sup>3)</sup>では、白色レグホン有精卵 (6日令) を使用し、試料は注射器により卵黄ノウ内へ注入して、3日後の LD<sub>50</sub> によってその毒性を調べた。投与量が 50 μl 以下の場合は、利照の ML で総容量が 50 μl になるように希釈して投与した。マウス法では、dd Y/S の

種 (3 週令) を用い、試料を腎ゾンデにより経口投与し、24 hr 後の体重、へい死率をもって毒性の指標とした。  
2-3 マウスの血液および腎臓組織学的検査 動物に対する感受性を高めるために一夜絶食させたマウスについて、上記同様の方法によって試料投与 24 hr 後に断頭し、血液中の赤血球および白血球数、肝臓、ヒゲ、リン臓重量 (体重比) を測定、さらに各臓器の組織学的検査を実施した。

3 結果および考察

3-1 試料の同定

HPO: IR スペクトルで (Fig-1), 3,400 cm<sup>-1</sup> に -OH の鋭い吸収、988 cm<sup>-1</sup> に *trans, trans*-共役ジエン、さらに -OOH の水素結合に基づくと思われるエステルカルボニルの doublet (1,735, 1,751 cm<sup>-1</sup>) の出現によって<sup>4)</sup>、また UV スペクトルでは 231.5 nm に極大吸収をもつこと、あるいは P.O.V. などから同定した。

HO および K: HO は IR (Fig-2) より、3,400 cm<sup>-1</sup> の鋭い -OH の吸収が丸味を帯び、1,715 cm<sup>-1</sup> の吸収の消失などから HO が推定できる。

K については、2,4-ジニトロフェニルヒドロラジン反応<sup>5)</sup>で、IR では (Fig-3, I), *trans, trans*-共役ジエンの特性吸収、すなわち 1682, 1660 および 1632, 1595, 998 cm<sup>-1</sup> にそれぞれカルボニル、*trans, trans*-共役ジエンの吸収を認められたこと、また K を水酸化ホウ

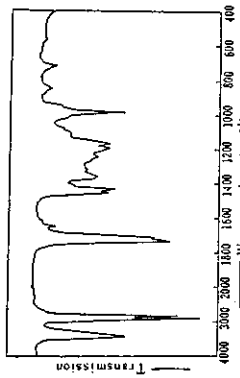


Fig-1 IR spectrum of HPO.

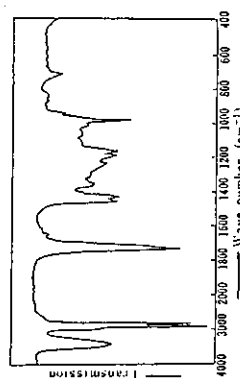


Fig-2 IR spectrum of HO.

素ナトリウムで処理すると、カルボニルが還元されて、上記ジエンの吸収は消失し、HO (Fig-2) の IR とまったく一致したことによって同定した。K は Fig-4 に示したように、化学的に HPO より HO を経て調製したものであるが、自動酸化によっても HPO あるいは HO から K の生成することを TLC の R<sub>f</sub> および IR (Fig-3 II) から確認した。しかし HO は、HPO から K 生成の中間産物としてその存在は推定されるが、自動酸化 ML から分離同定することはできなかった。

HE: TLC 上でヨウ化カリウム-酢酸およびピクリン酸-ピリジン陽性反応<sup>6)</sup>から<sup>7)</sup>、ヒドロペルオキシド、エポキシ基の存在を推定した。また IR では (Fig-5), I が化学的に調製したもので、II の自動酸化生成物中より分離したものであると推定した。すなわち 3,400 cm<sup>-1</sup> に -OOH, 880 cm<sup>-1</sup> にエポ

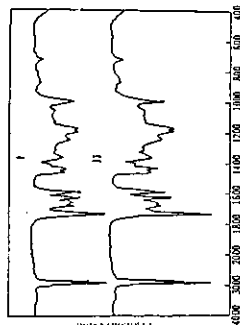
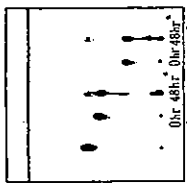
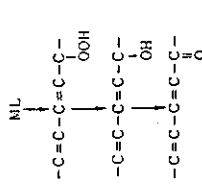


Fig-3 IR spectra of K.



Allowed to stand for 48 hr on the TLC plate

Fig-4 Formation of K from ML.

キシ (水酸化ナトリウム処理で消失)、さらに 965 cm<sup>-1</sup> に *trans*-孤立二重結合をもつことなどからその構造を推定した。

T: さきと同定した結晶<sup>8)</sup>の IR スペクトル、ヨウ素着色による反応生成物、またはヨウ素添加薄層プレートでの R<sub>f</sub> の比較により T であることを確認した。  
I-C: UV スペクトルで 231.5 nm に極大吸収、IR スペクトルでは (Fig-6), 985 cm<sup>-1</sup> に吸収を認め、*trans, trans*-共役二重結合の存在が推定された。

E<sub>1</sub>: IR スペクトルで (Fig-6), I-C の *trans, trans*-共役二重結合の特性吸収 (985 cm<sup>-1</sup>) が消失し、新たに 962 cm<sup>-1</sup> に孤立二重結合、876 cm<sup>-1</sup> のエポキシの吸収 (水酸化ホウ素ナトリウム処理で消失) を認め、また TLC 上でエポキシ陽性反応を示したことなどから α位不飽和のエポキシドであることを推定した。

E<sub>2</sub>: E<sub>1</sub> と同様 に定性反応でエポキシ陰性を示し、IR で (Fig-6), 3,020 cm<sup>-1</sup> に *cis*-二重結合、830 cm<sup>-1</sup> にエポキシの吸収 (水酸化ホウ素ナトリウム処理で消失) を認め、また 3,400 cm<sup>-1</sup> に -OOH, 880 cm<sup>-1</sup> にエポ

3-2 純度

薄層クロマトグラムのデンシトメトリーによる純度は、Table-2 にみられるように、いずれも 90% 以上であった。

3-3 毒性試験

鶏ハイに対する LD<sub>50</sub> は Table-3 に示した。この表は毒性の強いものから順に列記したものであるが、HPO およびその二次生成物に相当する HE, K, T, HO はいずれも対照の ML に比べて強い毒性を示し、この中でも強いのが -OOH とエポキシを同一分子内にもつ HE であった。ラジカル相互では、分子内の 1 個のラジカルのみを異にする HPO, K, HO の三つの化合物を比較することにより、-OOH > -CO > -OH の順で -OOH が最も強い毒性を示すことがわかった。一方 *trans, trans*-共役二重結合では、I-C の結果から算出ではほとんど毒性は認められなかった。

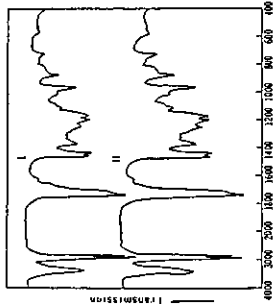


Fig-5 IR spectra of HE.

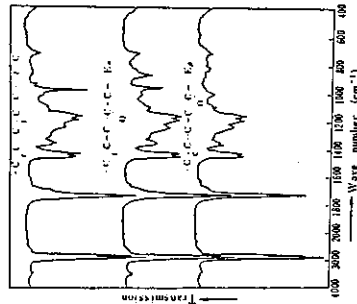


Fig-6 IR of derivatives from ML.

Table-2 Purity by TLC.

Sample	Purity (%)*
HPO	92
K	96
HO	93
HE	92
T	98
CT	94
E <sub>1</sub>	97
E	96
ML	97
MR	98

PMA, 100°C, 7min. \*Densitometry

しかし、ラットで血液凝固因子への影響を報告した例もあり、共役結合の数が3個(キリ油)になると、毒性が強まるともいわれている<sup>20,21)</sup>。エポキシラジカルでは、がいして毒性は弱いといわれているが<sup>22)</sup>、われわれもα位あるいはβ位に二重結合をもつ E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> について、同様に強い毒性は認められなかった。しかし HE にみられるようにヒドロキシルラジカルとの共存によってその毒性は著しく増強することがわかった。ヒドロキシラジカルでは、その数の多いほうが強く(↑HO)。また、1個の-OH であっても HO がα位不飽和のためか MR に比べて著しく毒性を異にしている。α位不飽和ヒドロキシルラジカルについては、不活性なβ位に比べ毒性のあることが報告されている<sup>23)</sup>。以上のように

Table-3 LD<sub>50</sub> of ML derivatives for chick embryos.

Sample	LD <sub>50</sub> (μl/egg)
-C-C-C-C-C-OH	2.4
-C-C-C-C-C-OH	5.0
-C-C-C-C-C-OH	5.5 (mg)
-C-C-C-C-C-OH	10.0
-C-C-C-C-C-OH	14.0
-C-C-C-C-C-OH	125
-C-C-C-C-C-OH	200<*
-C-C-C-C-C-OH	630
-C-C-C-C-C-OH	800<*
-C-C-C-C-C-OH	800<*

\* No more doses were examined.

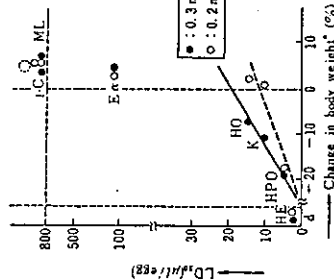


Fig-7 Relation between LD<sub>50</sub> for chick embryos and change in body weight of mice.

は、投与量と毒性との間に dose-response が認められ、一方試料の種類による毒性の強さは、たとえば t-C, E<sub>1</sub> では 0.4 ml 投与によっても毒性が認められないが、H2

Table-4 Toxicity of ML derivatives for mice.

Dose (ml)	Sample	No. of mice	Change in body weight (%)
0.5	ML	3	6
	HO	2	-16
0.4	ML	3	8
	t-C	3	8
	E <sub>1</sub>	3	3
	K	2	-9
	HO	2	-16
	HPO	2	-20
0.3	ML	3	8
	E <sub>1</sub>	3	5
	t-C	3	4
	HO	2	-7
	K	2	-10
	HPO	2	-19
0.2	ML	4	7
	t-C	4	7
	E <sub>1</sub>	4	4
	HO	3	3
	K	4	2
	HPO	4	-17
0.1	ML	2	7
	E <sub>1</sub>	2	-11
	-	4	6

\* Change in body weight at 24 hr after administration.

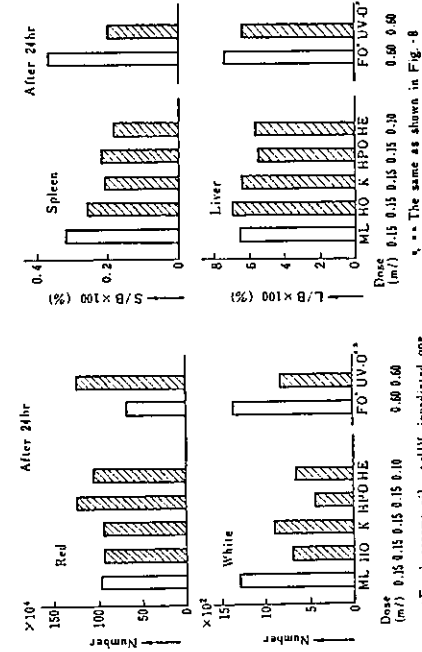


Fig-8 Organ weights of mice administered ML derivatives.

では 0.1 ml ですでに強い毒性が現われており、鶏ハイでの結果とその傾向はまったく一致した。この関係は Fig-7 によってより明瞭に示すことができる。すなわち、縦軸に鶏ハイの LD<sub>50</sub>、横軸にマウスの体重変化を自盛るとき、両者の間には直線関係が成立し、良好

を併記し、ML 誘導体の場合と比較したところ、食用油脂も多数によってまってきた同一の傾向が認められた。次に剖検所見では、小腸の弛緩拡張が特徴的で、管腔内には水溶性物質が充満していた。臓器重量では (Fig-9), 7 臓の著明な萎縮が認められた。肝臓でもいく

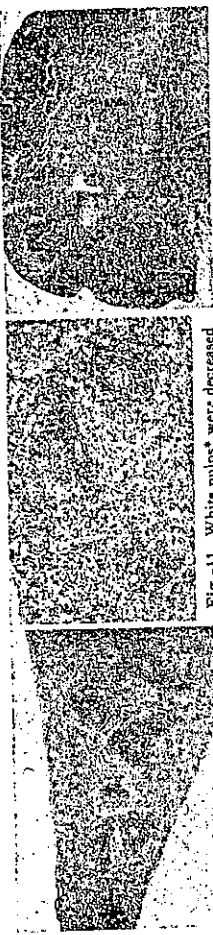


Fig-11 Atrophy of the spleen. (H-E, x6)

Fig-12 Necrosis of the thymic cells in the cortex. (H-E, x6)

Fig-13 Note degenerate and destructive changes of the thymic cells. (H-E, x400)

Fig-14 Marked dilatation of the jejunum. (H-E, x12)

Fig-15 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-16 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-17 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-18 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-19 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-20 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-21 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

Fig-22 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

な相関関係をもつことがわかる。3-4 マウスの血液および病理組織学的検査

著明な HE, HPO, K, HO の 4 種類の化合物を選んでマウスに投与し (HPO, K, HO は 0.15 ml, HE は 0.1 ml) 24 hr 後の血液および病理組織学的な検査を行なった。まず血液中の白血球数については (Fig-8), 白血球では著明な減少を認めた。また各臓の右側にそれぞれ食用油脂 (ゴマ油) について新鮮油脂と、その UV 照射油脂での成績<sup>24)</sup>

# ゾーナル超遠心分離法による卵黄リポタンパク質の分画

原 一 郎・小 森 谷 憲 之・佐 藤 仁

東京医科歯科大学教養部 (市川市国府台)

## Fractionation of Egg Yolk Lipoproteins by Rate Zonal Ultracentrifugation

Ichiro HARA, Noriyuki KOMORIYA and Jin SATO

Department of Preclinical and Pre dental Course, Tokyo Medical and Dental University (Ichikawashi, Chiba)

Crude high density lipoprotein of egg yolk was fractionated by rate zonal ultracentrifugation. Rate zonal ultracentrifugation was carried out with zonal rotor RP2-43 T (660 ml) in density gradient  $d.1.00-1.40$  by sodium bromide at 40000 rpm.

By the ultracentrifugation for four hours, the separation of high density lipoprotein (HDL) from low density lipoprotein (LDL) was observed, but HDL was completely purified only by the second ultracentrifugation for twenty four hours after the first procedure.

The purified HDL shows only one peak in the Schlieren pattern of the analytical ultracentrifugation.

### 1 緒 言

ゾーナル超遠心分離法 (Rate Zonal Ultracentrifugation) は、いわゆる水平ローターを用いて密度勾配を作り、これによって比重の差を利用した分画法の改良型で、水平ローターは容量が極度に小さいため、多量の試料が扱えるゾーナル超遠心分離法が開発された。その理論も応用もすでに確立されている。Wilcox ら<sup>1)</sup>はこれをヒト血清リポタンパク質の分画に応用し、純粋な数種を成分を得ている。一方、微量成分の単離にも利用され、Takahashi ら<sup>2)</sup>は血中の一種のリポタンパク質であるオーストラリア抗原 (Australia antigen, 血清肝炎と密接な関係があるといわれている) の濃縮に応用している。

卵黄には血清の場合と同じように数種のリポタンパク質が存在している。Cook ら<sup>3)</sup>の広はる研究によれば、高密度リポタンパク質 (HDL) と低密度リポタンパク質 (LDL) に大別され、それぞれがさらに細分されている。これらのリポタンパク質は普通は超遠心分離機による浮上法で得られるが<sup>4)</sup>、純粋にするには、その操作を反復する必要がある。ゾーナル超遠心分離法によって比較的純粋な卵黄 LDL と HDL を分画した。

### 2 実験材料および実験方法

ゾーナル超遠心分離法にかける試料は Evans ら<sup>5)</sup>の方法によるグラニューール (小カ粒) を用いた。新鮮な卵黄 2 個に等容量の 0.16 N-塩化ナトリウム溶液を加え、よくかくはんし、1600 rpm で 30 min 遠心し、上清を除く。沈殿したグラニューールを 2 倍量の 0.16 N-塩化ナトリウム溶液を加え、乳濁液を作り、ふたたび 16000 rpm で 30 min 遠心し、沈殿したグラニューールをゾーナル超遠心分離法の試料とした。ゾーナル用超遠心分離機は超遠心分離機 55-P 2 (日立)、ローターは PPZ 43 T、(容量 660 ml) プログラミングポンプ (日立) を用いて溶液の注入、排出を行なった。

ゾーナルローターから排出した塩類溶液は 10 ml ずつに分画し、各分画についてタンパク質量と脂質量を測定した。タンパク質は 280 nm の吸収をウシ血清アルブミンを標準として測定し、また一方ビュレット法でも測定した。

総脂質量は Evans ら<sup>6)</sup>の方法によって各分画の 5 ml を凍結乾燥し、これに 70 ml のクロロホルム-メタノール (1:1) を加え、よく振とうして抽出する。抽出は 3 回繰り返して、抽出された脂質を総脂質とする。脂質の種類については、同じく Evans らの方法に準じて、ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画法を行なった。クロロホルム-メタノールの混合溶液を減圧で乾固し、これをヘキサンの溶液に置き換え、Rhodes<sup>7)</sup> およ

の毒性の総和によるものであると類推した。なお -OOH がラジカルとして毒性に及ぼす影響のきわめて強いことも確認することができた。今回<sup>1)</sup>も同様に ML の酸化の過程において生ずる多くの生成物について毒性を認め、これらのうち最も毒性の強い物質として炭素数 5~9 個の 4-hydroperoxy-2 enal を同定している。

本研究は昭和 47 年 11 月第 11 回油化学討論会 (東京) で発表された。(昭和 48 年 3 月 19 日受理)

### 文 献

- 1) N. Matsuo, *J. Biochem.*, **41**, 645 (1954)
- 2) 金田, 桜井, 石井, 白水誌, **21**, 50, 658 (1954)
- 3) G.M. Findlay, H.H. Draper, *J.G. Bergan, Lipids*, **5**, 970 (1970)
- 4) M.G. Kokatnur, S. Okui, F.A. Kummerow, H.M. Scott, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **104**, 170 (1960)
- 5) 内山, 佐藤, 食衛誌, **11**, 327 (1970)
- 6) J. Glavind, E. Arffmann, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, Section A, **78**, 345 (1970)
- 7) H. Kaunitz, R.E. Johnson, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 50 (1964)
- 8) E. Arffmann, J. Glavind, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, **70**, 185 (1967)
- 9) B.L. Van Duuren, L. Langseth, L. Ornis, G. Tebor, N. Nelson, M. Kuschner, *Nat. Cancer Inst.*, **31**, 825 (1966)
- 10) E.G. Perkins, F.A. Kummerow, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 371 (1961)
- 11) 大原, 金田, 油化学, **21**, 13 (1972)
- 12) E.W. Crampton, R.H. Common, F.A. Farmer, A.F. Wells, D. Crawford, *J. Nutr.*, **48**, 333 (1953)
- 13) 松尾, 油化学, **10**, 447 (1968)
- 14) E. Schavstein, *J. Lipid Res.*, **8**, 417 (1967)
- 15) 吉田, 金田, 油化学, **21**, 316 (1972)
- 16) 土田, 三浦, 吾木, 油化学, **21**, 269 (1972)
- 17) A. Graveland, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 352 (1970)
- 18) G.I. Poos, G.E. Arth, R.E. Beyler, L.H. Soret, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 422 (1953)
- 19) P.L. Nichols, Jr., S.F. Herb, R.W. Riemenschneider, *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 247 (1951)
- 20) M.J. Danzig, J.L. O'Donnell, E.W. Bell, J.C. Cowan, H.M. Teeter, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **34**, 136 (1957)
- 21) 三浦, 土田, 吾木, 油化学, **20**, 335 (1971)
- 22) A. Banks, S. Fazaherly, J.N. Keay, J.G.M. Smith, *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 724 (1961)
- 23) 高木, 福住, 工化, **71**, 328 (1970)
- 24) 日本化学会編 "食糧化学講座 (続)", **5** (上), p. 145, (1965), 丸善, 東京
- 25) J.A. Fioriti, R.J. Sims, *J. Chromatog.*, **32**, 760 (1968)
- 26) G. Raccuglia, *Lipids*, **5**, 85 (1970)
- 27) J. Glavind, E. Arffmann, *Experientia*, **24**, 829 (1968)
- 28) 松尾, 私稿
- 29) H. Kaunitz, *Food Technology*, **21**, 278 (1967)
- 30) E. Arffmann, J. Glavind, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, Section A, **suppl.**, **112**, 97 (1970)
- 31) 土田, 三浦, 未発表

Table-3 Serum protein of mice administered HE.

Sample	Hr. after administration	Protein (%)
ML	2.5	6.0
	2.5	5.3
	4.5	6.0
	24.0	5.5
HE	2.5	9.2
	2.5	7.2
	4.5	10.8
(-)	24.0	5.3
	24.0	6.0

3-4 HE 投与による血清タンパクへの影響  
最も毒性の強かった HE について、血清タンパクへの影響を検討した結果 (Table-5)、対照に比べ明らかにタンパク濃度の上昇が認められた。これは腸コウ (腔) 内の水溶性物質の滞留から考え、尿管よりの脱水による血液濃縮によるものと思われる。血液の粘度が高く、採血が困難だったこと、あるいは赤血球数の上昇などもこれを裏付けるものと思われる。

以上のように、いくつかの投与材料によって発現する症状の程度には差があるが、いずれも共通しており、食用油脂の摂取による毒性を再現することができた。われわれは、従来より変敗油脂に、還元、加熱、アセチル化などの処理を施し、その毒性への影響を検討して、ヒドロペルオキシド以外にもカルボニル、ヒドロキシラジカルなどいずれも毒性と密接な関係をもつことを推定してきた<sup>1)</sup>。しかし -OOH を還元した場合についても、還元によって毒性が低下した例<sup>2)</sup>、あるいはほとんど影響を受けなかった例<sup>3)</sup>など報告者によって一定した結果が得られていない。そこで今回は、これら個々の精製した物質を使用することによって、この点を解明することができた。本報告は、あくまで炭素数 18 の酸化生成物という限られた範囲の検討にすぎないが、一応ラジカルと毒性の関係を明らかにすることができ、これから食用油脂の酸化による毒性の本体は、数多くの酸化生成物

# 加熱魚油不飽和脂肪酸エステルから得た 環状単量体の毒性に関する研究

戸谷 洋一郎, 戸谷 永生, 松尾 登  
成蹊大学工学部工業化学教室

## Toxicity of Cyclic Monomer Obtained from Heated Fish Oil Unsaturated Fatty Acid Esters

Yōichirō TOTANI, Nagao TOTANI, Noboru MATSUO  
Department of Industrial Chemistry, College of Technology, Seitai University,  
Musashino City, Tokyo

The severe toxicity was observed when rats were given the diets containing 10 per cent cyclic monomer and it was difficult to observe the histological changes since all rats died in 4 or 7 days.

Then a small amount (2.5-7.5 per cent) of cyclic monomer was given to rats and after 38 days the changes in rat's livers and cerebrums were observed by microscope.

As the results, cyclic monomer gave severe toxicity to the rat liver and cerebrum; the liver was considerably enlarged and the adipose spots were clearly seen with the naked eyes.

And also in microscopic observation, also, the necrosis of liver cells was remarkably observed by microscope. In cerebrum, Cerebral edema was found in all over the cerebrum and deficiency or degeneration of nerve cells and congestion of the tissue were observed there.

(Received September 20, 1974)

変質した油脂の毒性に関する研究は、多くの立場から  
広く論じられている。すなわち自動酸化による過酸化物  
の毒性や、熱酸化分解物、あるいは重合物の毒性、さら  
に加熱油中に生ずる環状化合物の毒性などについては、  
松尾、金田、秋谷<sup>1)</sup>、Crampton<sup>2)</sup>、Kummerow<sup>3)</sup>、  
Kaunitz<sup>4)</sup>、その他多くの研究者により報告されてき  
た。

ことに松尾<sup>1)</sup>は環状単量体の毒性について一連の  
報告を行なっているが、その毒性がいかなる病理的原因  
によるものか、また動物の臓器官に与える影響について  
も不明な点が多量に存在している。本研究においては、イカ油  
よりゾーダ塩アセトン法<sup>5)</sup>を用いて高圧不飽和脂肪酸を  
分離し、これをエステル法<sup>6)</sup>を用いて高圧不飽和脂肪酸を  
液中、250°Cで10時間加熱した。この加熱高圧不飽和  
脂肪酸エステルから炭素付加別法で環状化合物  
を分離し、これを真空蒸留して得られた環状単量体につ  
いて、その毒性をラットを用いて検討するとともに、各  
臓器における毒性の発現状況を顕微鏡をもって観察し  
た。

### 実験および結果

1. 高度不飽和脂肪酸エステルエーステルの調製  
Fig. 1 に示したように、原料イカ油 1kg を常法によ  
りケン化したのち、過剰に加えた水酸化ナトリウムを水  
酢酸で中和し、次に 15 l のアセトンを加え 0°~10°C  
に 1 夜放置した<sup>7)</sup>。このイカ油脂肪酸ナトリウム塩のア  
セトン溶液を総別し、アセトン溶解区分のアセトンを除  
去したのちに 3 N 塩酸を加えて酸分解し、上層に分離し  
た脂肪酸を石油エーテルで抽出し、洗浄、脱水、脱溶媒  
して低高度不飽和脂肪酸を得た。これに 2.5% の塩化水  
素ガスを吸収させた約 2 倍量の無水エタノールを加え  
て、3 時間加熱遠流してエステル化を行なったのち、温  
水分離、洗浄、脱水を行ない、次に 2~3 mmHg 減圧下  
に蒸留して、160°~200°C で留出してぐる留分を高度不  
飽和脂肪酸エステルとした。

この高度不飽和脂肪酸エステルエーステルの性状は原料イ  
カ油の性状とともに Table 1 に示したとおりであるが、  
ベンゼンを溶媒とした氷点降下法によって測定したその  
平均分子量 350 とヨウ素価 (I.V.) 321.6 からして、  
平均二重結合数は 4.4 であった。

状構造エステルを得た。次にこの環状構造エステルを1.5~4 mmHg 減圧下で真空蒸留して、193°~216°Cで留出してくる留分を環状単量体とした。その収率は、加熱高度不飽和脂肪酸エステルを100としたとき14.5%であった。

この環状単量体の性状は加熱高度不飽和脂肪酸エステルとほぼ等しく、Table 2 に示した。またベンゼンを溶媒とした氷点降下法によって測定した環状単量体の平均分子量は320であることから、この環状単量体中には重合物ほとんど含まれていないと思われる。

3. 環状単量体の毒性試験

体重30g前後のウイスター系ラットを1週間固型飼料を与えて予備飼育して、体重60~70gによく成長したものを6匹(雄雌各3匹)選んで1グループとして、環状単量体の毒性試験を行なった。すなわちTable 3に示したような組成をもつ基礎飼料に環状単量体を10%混合して与え、ラットの成長を観察した。なおコントロールグループには、7-メチル脂肪酸エステルを基礎飼料に10%混合して与えた。

その結果、実験グループ、コントロールグループの成長曲線はFig. 2, Fig. 3のごとくであった。

Fig. 2, Fig. 3に明らかのように、コントロールグループは順調に成長しているが、実験グループは飼料投与後、急激に体重が減少し4日~7日で死亡した。このように短期間で実験を終了すると、内臓諸器官の特有の变化が観察しにくいため、次に環状単量体の投与量を加減してラットを飼育した。すなわち、よく成長した60~70gのウイスター系ラット6匹(雄雌各3匹)に最初

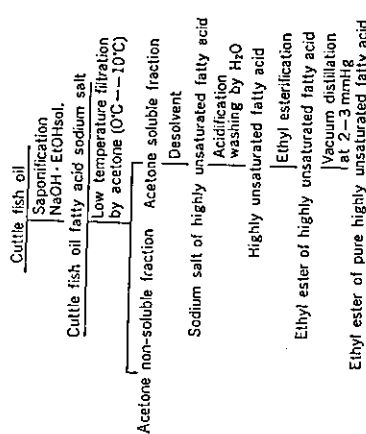


Fig. 1. Preparation of highly unsaturated fatty acid ethyl ester from cuttle fish oil.

2. 高度不飽和脂肪酸エステルエチルエターの加熱環状化  
高度不飽和脂肪酸エステルを三ろフラスコに入れ、無触媒下に窒素ガス気流中、250°Cで10時間加熱した。その後、加熱高度不飽和脂肪酸エステルから環状構造エステルを分離するために、尿素付加分別を行なった。すなわち加熱試料に4倍量の尿素と5倍量のエタノールを徐々に加え、よく攪拌しながら60°Cで1時間除ったのち、室温に1夜放置した。

次にこれを吸引濾過して尿素付加物と非付加物に分別し、尿素非付加物に含まれる過剰のエタノールを留出したのち、過水分中に上層に浮いたエステルを $H_2O$ へキサンで抽出し、よく洗浄したのち脱水、脱窒素して環

Table 1. Analytical data of cuttle fish oil and the ethyl ester of highly unsaturated fatty acid.

Sample	Characteristics		Average mole wt.
	I.V. (Wijis)	S.V.	
Cuttle fish oil	192.0	176.1	1.4863
Ethyl ester of highly unsaturated fatty acid	321.6	166.3	1.4892

Table 2. Analytical data of ethyl ester of heated highly unsaturated fatty acid and the cyclic monomer.

Sample	Characteristics		Average mole wt.
	I.V. (Wijis)	S.V.	
Ethyl ester of heated highly unsaturated fatty acid	179.6	178.9	1.5055
Ethyl ester of straight chain monomer fatty acid	160.6	173.5	1.5017
Ethyl ester of cyclic chain monomer fatty acid	214.8	178.5	1.4982

Table 3. Composition of experimental diets (%).

Starch	82.5	80	77.5	75
Casein <sup>a)</sup>	9	9	9	9
McCullum's salt mixture	3	3	3	3
Yeast	3	3	3	3
Liver oil	1 drop/day	1 drop/day	1 drop/day	1 drop/day
Sample	2.5	5.0	7.5	10.0

a) Non fat casein extracted ether.

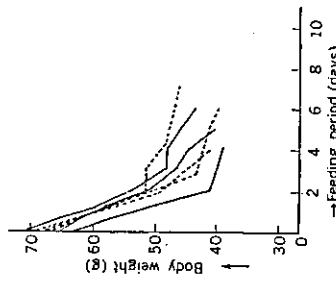


Fig. 2. Growth of rats fed experimental diet containing 10% cyclic monomer.

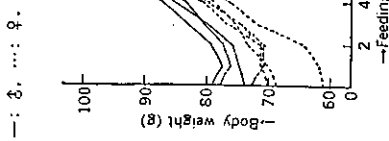


Fig. 3. Growth of rats fed diet containing 10% ethyl ester of linseed oil fatty acid.

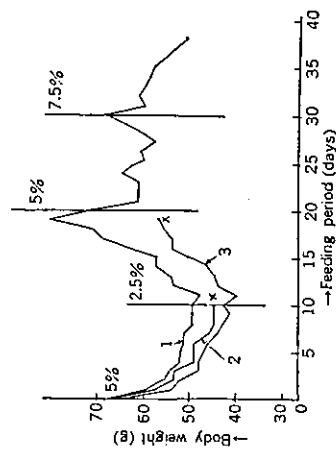


Fig. 4. Growth of rats fed diet different levels of cyclic monomer.

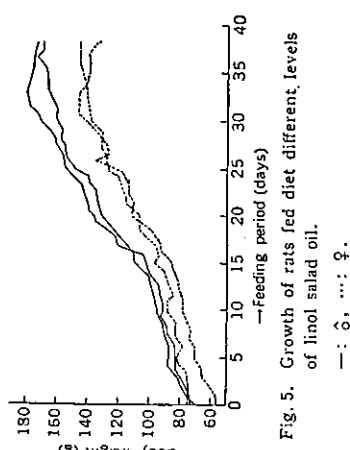


Fig. 5. Growth of rats fed diet different levels of linol salad oil.

期間中、環状単量体投与量と同じ割合で基礎飼料に混合して与えた。

その結果、Fig. 4, Fig. 5 のような結果を得た。次に両グループのラットは死亡時あるいは実験終了時にただちに腎臓、肝臓、大脳、小脳、腎臓を摘出し、通常のH. E. 標本を作成して顕微鏡観察した。その結果、腎臓、小脳、腎臓においては充血が見られる程度で、その他に著しい変化は認められなかったが、肝臓においてFig. 6に示したように顕著なる変化が観察された。

環状単量体を5%投与し、10日目からその量を2.5%に減じて10日間与え、その後20日目から30日まで、再度その量を5%とし、さらに31日より38日目まで7.5%と徐々に環状単量体の投与量を増加した。なおコントロールグループには市販のリノールサラダ油を実験

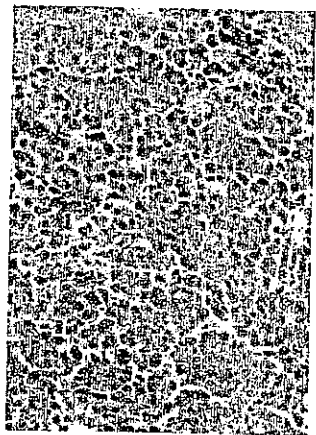


Fig. 6. Microphotograph of cells obtained from rat liver of the experimental group.

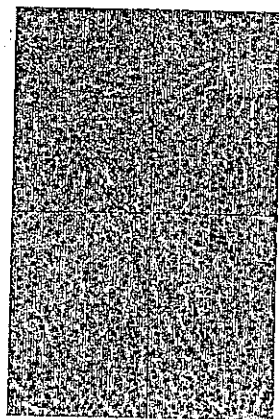


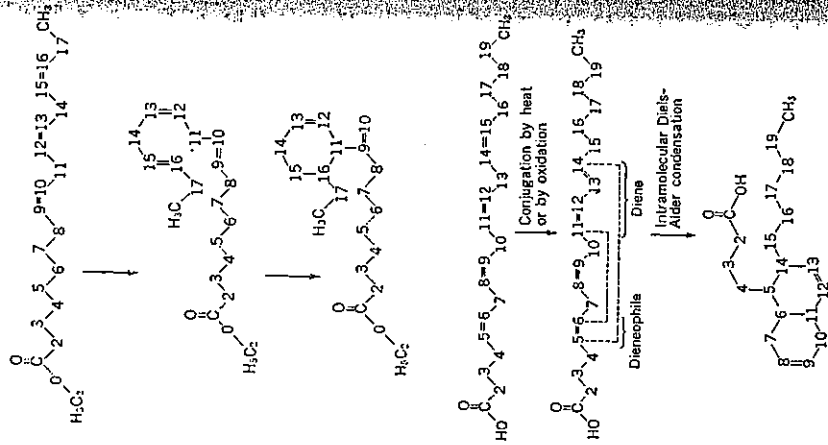
Fig. 7. Microphotograph of cells obtained from rat liver of the control group.

なお、コントロールグループのラットの肝臓の顕微鏡写真は、Fig. 7のごとくであった。

考 察

イカ油より分離、精製した高度不飽和脂肪酸エチルエステルを無酸素、無酸素下に250°Cで10時間加熱して得られた環状単量体の性状はTable 2に示したとおりであるが、そのヨウ素価(1.7)と平均分子量320から平均二重結合数を算出すると2.7であった。すなわち平均二重結合数4.4の高度不飽和脂肪酸エチルを加熱環状化して、平均二重結合数2.7の環状単量体が生成したことになる。この環状単量体のI.R.分析の結果、高度不飽和脂肪酸エチルのI.R.スペクトルには存在しなかつた560 cm<sup>-1</sup>のシクロヘキセン環の特性吸収が認められたことから、この環状単量体はシクロヘキセン環を有するものが含まれていると考えられる。

松尾等は無酸素、無酸素下に250°Cでリノレン酸エチルを加熱したとき得られる環状単量体の生成機構について、またPaschke, R.F., Wheeler, D.H.等はアラキドン酸からの環状単量体の可能な生成機構を、次図のように推定している。



次に本実験で行なった環状単量体の毒性試験の結果はFig. 2に示したごとく、環状単量体を40%投与したとき、その毒性が著しく、体重の急激な低下とともに体毛の黄変、脱落、さらに下痢を起し、実験開始後4日〜7日でラットは死亡した。

これらの実験結果は、松尾らが行なっているアーマン油または桐油などを加熱環状化して得た環状単量体の毒性試験結果とよく一致している。次にFig. 4に示したように環状単量体の投与量を加減してラットに投与し病育したのち、内臓諸器官を顕微鏡観察した結果、腎臓、小腸、腎臓については充血が認められる程度で、その他に著しい変化は認められなかったが、大脳、肝臓については顕著な変化が観察された。ことに、肝臓については肉眼的にも肝臓が茶色に変色し、そのうえ、肝臓肥大の傾向が著しく、さらに脂肪斑が明瞭に認められた。またFig. 6に示したように、肝臓においては肝細胞の死亡が顕著であった。大脳においては全体的に脳浮

腫が激しく、さらに神経細胞の脱落、変性が著しく、組織の充血、凝縮化、白質の軟化も認められた。

以上の解剖所見より環状単量体をラットに投与した場合は、大脳と肝臓に著しい変化が認められ、とくに肝臓において組織学的変化が明瞭であった。大脳においては、白質部の変化に注目する必要があると思われる。また、神経膠細胞の変性も認められた。

これらの症例はすべて非特異的なものであり、環状単量体投与の初期には組織の充血、浮腫が出現し、さらに長期間の投与になると組織の凝縮化、細胞の壊死がみられ神経細胞の脱落が起こることより、環状単量体は神経毒としての作用もあると思われる。なお環状単量体を多量(10~15%)に投与した場合は、その顕微鏡的観察において組織の変性が認められず、すべて短期間に死亡し

た。本実験において顕微鏡標本の作成、その観察および考察については、順天堂大学医学部教授飯塚孔二博士に多大なるご助力、ご指導をいただいた。ここに深甚なる感謝の意を表すものである。

文 献

- 1) 松尾 登: "Lipid and Their Oxidation", 321 (1982), AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, U.S.A.
- 2) 金田尚志: "生物化学最近の進歩", 第5集, 55, 共報堂 (東京)
- 3) 秋谷年見: 栄養と食糧, 14, 71 (1961)
- 19) 紀實一郎: 工業化学雑誌, 37, 1002 (1934)
- 20) 松尾 登: 油化学, 9, 37 (1960)
- 21) 松尾 登: 油化学, 18, 447 (1969)
- 22) Paschke, R.F. and Wheeler, D.H.: J. Amer. Oil Chemist's Soc., 32, 473 (1955)

(昭和49年9月20日受理)

- 4) 秋谷年見: 栄養と食糧, 15, 226 (1962)
- 5) Crampton, E.W., Farmer, F.A. and Berryhill, F.M.: J. Nutrition, 43, 431 (1951)
- 6) Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Berryhill, F.M. and Wiseblatt, L.: J. Nutrition, 43, 533 (1951)
- 7) Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Wells, A.F. and Crawford, D.: J. Nutrition, 49, (1953)
- 8) Kummerow, F.A., Johnson, O.C. and Sakuragi, T.: J. Amer. Oil Chemist's Soc., 33, 433 (1956)
- 9) Kummerow, F.A., Johnson, O.C., Perkins, E. and Sugai, M.: J. Amer. Oil Chemist's Soc., 34, 594 (1957)
- 10) Kummerow, F.A. and Perkins, E.G.: J. Amer. Oil Chemist's Soc., 36, 371 (1959)
- 11) Kaunitz, H., Slanetz, C.A. and Johnson, R. E.: J. Nutrition, 55, 577 (1955)
- 12) Kaunitz, H., Slanetz, C.A., Johnson, R.E. and Gullman, J.: J. Nutrition, 60, 237 (1956)
- 13) Kaunitz, H., Slanetz, C.A. and Johnson, R. E.: J. Amer. Oil Chemist's Soc., 33, 630 (1956)
- 14) 松尾 登: 生化学, 29, 885 (1958)
- 15) 松尾 登: 栄養と食糧, 10, 285 (1958)
- 16) 松尾 登: 日本化学雑誌, 81, 469 (1960)
- 17) 松尾 登: J. Biochem., 49, 635 (1961)
- 18) 松尾 登: Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 105 (1962)



以下で蒸発範囲した。

- 2) 有酸素のアセチル化 蒸発範囲した有酸素は、ブタノール 20 ml に溶解し無水硫酸ナトリウム 2 g を加え乾燥して、濃硫酸 3 滴を加え、これに還流冷却器を付けて、15 分間加熱撹拌させて反応を行なった。
- 3) 標品有酸素のアセチル化 標品有酸素 (クエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、マンデル酸、シユウ酸、安息香酸) の各 1 g に、ブタノール 20 ml を加え溶解し、無水硫酸ナトリウム 2 g を加え、さらに濃硫酸 3 滴を加えて還流冷却器を付けて、15 分間加熱撹拌させて反応を行なった。
- 4) 測定 標品有酸素アセチルエステル、梅酒有酸素アセチルエステルについて、ガスクロマトグラムを求めた。また、梅酒を直接マイクレンジでとり、ガスクロマトグラムを求めた。

実験結果

梅酒のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示すように、ペンズアルデヒド、クエン酸トリメチルエステルが検出された。梅酒中の有酸素をアセチルエステルした場合のガスクロマトグラムは Fig. 2 に示すように、ピークが 8 個認められた。そのうち、ピーク成分  $t_R=2.6$  分は、シユウ酸ジブチル、 $t_R=3.0$  分は、安息香酸ジブチル、 $t_R=4.2$  分は、コハク酸ジブチル、 $t_R=49.2$  分は、クエン酸トリブチルであることが標品有酸素のアセチルエステルとの保持時間の一致より確認された。

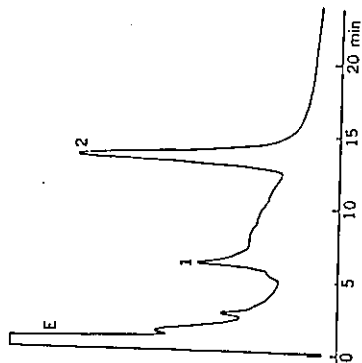


Fig. 1. Gas chromatogram of Ume-shu. E: ethanol, 1: benzaldehyde, 2: triethyl citrate. Column: DEGS 5% H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% on Chromosorb W 60/80 mesh stainless steel tube 2 m x 2.5 mm I.D., temperature: column oven 155°C, N<sub>2</sub> flow 40 ml/min.

市販油脂含有食品の酸化変質

戸谷 洋一郎, 戸谷 永生  
松尾 登  
成蹊大学工学部工業化学教室

Oxidative Deterioration of Commercial Foods Containing Oils and Fats  
Yôichirô TOTANI, Nagao TOTANI  
Noboru MATSUO  
Department of Industrial Chemistry, College of Technology, Seibei University, Musashino City, Tokyo

Degree of autoxidative deterioration on 100 kinds of commercial foods containing oils and fats was investigated: instant ramen (31 kinds), potato chips (14 kinds), fried rice crackers (14 kinds), buttered peanuts (10 kinds), crackers (15 kinds), doughnuts (10 kinds) and fried doughnuts (6 kinds).

The following results were obtained with peroxide, iodine and acid values of oils extracted from the samples.

(1) 91 kinds of them showed the peroxide value below 30 meq/kg. Peroxide values of more than 30.1 meq/kg were found in 7 kinds of buttered peanuts, the maximum value being 95.7 meq/kg.

(2) The acid values were in the range of 0.1-3.4, 59 kinds of them showed the values below 1.0 and 82 kinds showed those below 2.0. Acid values of fried rice crackers and doughnuts were higher than those of the other samples.

(3) Considering from the peroxide values of the samples used in this experiment, those of daily reports, and the results of animal experiment with rats, it is reasonable that the limits of peroxide value of oils and fats contained in foods should be set at about 30 meq/kg.

(Received September 28, 1974)

油脂含有食品中の油脂の変質は、商品価値を損い、保蔵性の面からも重要な問題であるので、その保存とくに自動酸化による変質については、数多くの報告がなされている。

油脂含有食品の流通消費の過程における酸化変質については十分な注意が必要であると思われ、近來製造者の側から、変質の防止に対する配慮、包装の工夫、改善、製年月日の明記、保存時における日光、温度に対する注

1975 東京都武蔵野市吉祥寺北町 3-3-1

意などについて次第に注目され、実行されるようになってきた。

市販油脂含有食品中の油脂の酸化の程度については、たとえば過酸化価をとった場合、その安全度、許容度をどのくらいの数値とすべきかについて、はっきりとした決定を行ない必要があると考えられる。このためには油脂含有食品中の油脂の酸化の状態を、さらにできるだけ広く把握する必要があると考えられるので、市販されている油脂含有食品について、購入場所、製造年月日、包装および標品の状態等を考慮に入れてその酸化変質の程度を調べた。

実験方法

1. 実験材料

バター、マーガリン、かりん糖、ドーナツ、ポテトチップス、即席ラーメン (袋入りあるいはカップ入り)、揚げせんべい、クラッカーをさまざまな地域で求めて使用した。

2. 抽出条件

抽出条件を決めるため、バター、マーガリン、ポテトチップス、揚げせんべいの 3 種を用い、溶媒としてエチルエーテルを使用して、ソックスレー抽出器により、1、2、3、4、5 時間抽出を行なった。いずれの場合においても 2 時間以後は抽出量がほぼ一定であったので、抽出時間を 2 時間とし以後の実験を行なった。

3. 抽出および性状測定

試料はフードチャップパーを用いて粉砕し、正確にその 20 g を秤とり、ソックスレー抽出器を用いてエチルエーテル 100 ml をもって抽出した。抽出後 60°C でエーテルを留出し、さらに減圧下に痕跡のエーテルを完全に除去して抽出油脂を得た。

得られた油脂の過酸化価 (以下 P.O.V. と略す)、ヨウ素価 (以下 I.V. と略す)、酸価 (以下 A.V. と略す) の測定を速やかに行なった。また抽出した油脂の脂肪酸組成を調べるために、これをエタノールシスしてエチルエステルとしたものについて、GLC 分析を行なった。

実験結果

1. 即席ラーメンより抽出した油脂の性状 各地域で求めたラーメンより抽出した油脂の性状を、表 1-1、表 1-2 に示す。表中、隣列状態は蛍光燐下のものが大部分であり包装状態はほとんどがポリセロム袋入りであった。
2. ポテトチップスより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 2 に示す。
3. 揚げせんべいより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 3 に示す。



表 1-1. 即席ラーメンより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)	製造年月日	測定日
1	27.5	9.4	60.7	0.5	—	—	赤	47. 3. 17	47. 7. 26
2	21.7	9.4	59.0	0.7	—	—	黄, 白	47. 2. 9	47. 7. 26
3	21.7	16.2	57.2	0.4	吉祥寺酒屋	蛍光燈下	赤	47. 9. 17	47. 11. 2
4	20.2	9.0	64.5	0.6	北区十条菓子店	—	橙	47. 8. 2	47. 11. 17
5	22.0	29.0	58.9	0.4	—	—	赤	47. 10. 28	47. 11. 17
6	18.7	13.9	60.9	0.4	川崎パン屋	—	白	47. 12. 2	48. 1. 17
7	16.0	13.2	64.1	0.5	吉祥寺パン屋	—	赤	47. 10. 31	47. 11. 14
8	15.2	9.1	52.4	0.4	吉祥寺酒屋	蛍光燈下日光下	赤, 橙, 桃	47. 12. 18	48. 1. 2
9	12.7	19.2	52.3	0.7	川崎菓子屋	蛍光燈下	—	47. 12. 18	48. 1. 2
10	19.3	11.9	59.4	—	横須賀菓子店	—	白, 赤	47. 9. 25	47. 12. 18
11	20.0	4.7	54.8	1.1	鎌倉酒屋	蛍光燈下日光下	橙	47. 8. 29	47. 9. 25
12	17.3	12.3	48.4	0.5	鎌倉マーケット	蛍光燈下電燈下	—	47. 12. 28	48. 2. 1
13	17.7	14.8	49.3	1.3	大船酒屋	蛍光燈下	赤	47. 5. 3	48. 1. 9
14	21.4	11.2	57.9	0.7	横須賀菓子店	—	白, 黒	47. 9. 28	47. 12. 12
15	22.0	11.4	56.8	0.5	福生(多摩)	—	赤	48. 1. 8	48. 1. 23
16	21.8	12.3	60.9	0.6	吉祥寺酒屋	—	—	47. 9. 27	47. 10. 31

表 1-2. 即席ラーメンより抽出した油脂の性状 (No. 26~31 カップ入り)

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)	製造年月日	測定日	
17	18.9	11.0	56.7	0.5	川崎菓子屋	蛍光燈下	赤	47. 12. 14	48. 1. 11	
18	21.4	16.9	51.5	0.6	鎌倉マーケット	蛍光燈下電燈下	橙	47. 4. 13	48. 1. 29	
19	18.3	13.2	50.5	0.4	—	—	赤, 赤	47. 11. 11	48. 1. 31	
20	19.5	8.6	63.2	0.5	北区十条	蛍光燈下	白, 黄	47. 10. 3	47. 11. 15	
21	19.0	11.2	60.0	0.7	川崎パン屋	—	白	47. 9. 7	48. 1. 16	
22	18.8	5.2	57.8	0.7	横須賀菓子店	—	白, 黄	47. 5. 29	47. 12. 15	
23	19.8	11.6	62.9	0.4	鎌倉マーケット	—	赤	47. 11. 29	48. 1. 30	
24	29.8	10.0	60.2	0.2	—	—	—	48. 1. 23	48. 1. 26	
25	18.9	10.1	—	0.6	鎌倉マーケット	—	透明	47. 10. 16	48. 1. 26	
26	17.6	6.6	60.2	1.7	吉祥寺販売店	—	袋泡スチロール	47. 11. 24	47. 12. 3	
27	15.7	12.0	71.7	3.2	吉祥寺大売店	—	—	—	47. 12. 3	
28	13.7	11.2	53.4	0.6	鎌倉スーパー	—	—	—	48. 1. 13	48. 1. 30
29	14.5	19.2	57.0	0.8	鎌倉マーケット	蛍光燈下電燈下	—	—	48. 1. 29	
30	14.8	13.3	53.5	2.4	鎌倉マーケット	蛍光燈下	—	—	48. 1. 23	48. 1. 31
31	19.9	17.0	63.5	1.8	—	—	—	—	48. 1. 18	48. 2. 1

4. パクーバーナッツより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 4 に示す。
5. フラッカーより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 5 に示す。
6. ドーナッツより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 6 に示す。
7. かりん糖より抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 7 に示す。

表 2. ポテトチップスより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	35.7	6.0	99.8	0.6	吉祥寺	蛍光燈下	透明
2	28.9	19.8	99.5	1.3	鎌倉	—	—
3	28.9	5.6	113.4	0.9	北区十条	—	—
4	36.8	13.1	110.3	1.0	藤沢	—	—
5	34.0	6.5	100.0	0.5	埼玉戸田	—	—
6	37.4	7.2	101.2	1.0	有馬	—	—
7	37.7	11.6	105.7	0.9	世田谷区梅ヶ丘	蛍光燈下電燈下	黄
8	36.0	21.8	105.1	0.9	千代田	蛍光燈下	透明
9	33.8	6.0	109.7	1.0	埼玉秩父	蛍光燈下日光下	黄
10	36.6	4.9	111.2	0.7	横須賀	蛍光燈下	透明
11	37.1	6.9	96.5	0.8	平塚	日光	—
12	38.0	18.5	104.8	1.1	川崎	—	—
13	28.7	5.2	—	0.3	戸塚	—	—
14	32.9	5.7	124.8	0.6	横濱	—	—

表 3. 揚げせんべいより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	20.4	24.8	116.8	1.5	鎌倉	蛍光燈下日光下	透明
2	25.0	7.7	118.6	1.0	吉祥寺	—	—
3	21.6	11.5	119.1	2.7	御茶ノ水	—	—
4	22.0	20.7	120.9	2.1	鎌倉	—	—
5	25.8	33.6	108.0	2.1	浦和	—	—
6	18.6	6.6	105.4	2.0	亀戸	—	—
7	27.0	6.6	104.4	1.7	藤沢	—	—
8	31.7	16.0	102.3	2.0	世田谷区梅ヶ丘	蛍光燈下電燈下	—
9	21.5	4.9	94.2	1.9	千代田	—	—
10	21.8	13.2	109.3	3.0	—	—	—
11	22.8	9.4	106.8	3.4	埼玉秩父	—	—
12	18.5	4.0	100.9	2.7	横須賀	—	—
13	26.8	7.9	108.7	1.3	三浦鎌倉	—	—
14	20.7	30.5	106.3	1.3	川崎	—	—

8. 油脂含有食品より抽出した油脂の性状総括 各種抽出油脂の性状測定の結果を総括して表 8 に示す。
  9. 油脂含有食品より抽出した油脂の脂肪酸組成 各種抽出油脂の脂肪酸組成を表 9 に示す。
- その色調は赤, 橙, 黄等様々であるが, ほとんどがポリセロ袋入りであった。カップ入り即席ラーメンでは, カップは袋泡スチロールのものが多かった。
- 試料 31 種の全体についてみると, 表 8 に示したようにその含油率は 12~30% の間にあった。山下<sup>9)</sup> の報告によれば含油率は 14~26% と報告されており, ほぼ一致している。P.O.V. は 5~29 meq/kg 程度であった。15 meq/kg 以下のものは 31 種中 25 種 (81%) であった。購入場所, 陳列状態により過酸化物質に特別な差異は

表 4. パタービナーナッツより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	37.6	21.2	101.0	0.7	東京	蛍光燈下	透明
2	21.0	31.8	96.6	0.6	茨城	"	"
3	36.4	36.0	95.8	0.7	鎌倉	"	"
4	20.3	31.5	97.0	0.5	埼玉	"	"
5	39.5	36.2	97.5	0.7	有馬	"	"
6	32.2	17.2	98.3	1.6	千葉	"	"
7	27.7	34.0	99.5	2.8	埼玉	"	パラ売り
8	27.6	95.9	100.3	1.0	茨城	"	透明
9	29.0	44.4	92.5	0.8	川崎	"	"
10	40.5	19.5	95.8	0.5	"	"	"

表 5. クラッカーより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態
1	20.8	12.8	38.1	0.7	吉祥寺	蛍光燈下	透明ポリセロ袋
2	9.6	10.8	-	-	鎌倉	"	透明ポリセロ袋
3	24.4	1.6	39.0	0.7	吉祥寺	"	アルミ箔袋
4	16.0	3.2	45.0	0.8	埼玉	"	アルミ箔袋 (酸化防止剤添加)
5	22.9	1.5	32.8	0.6	有馬	"	"
6	15.6	2.0	-	1.2	世田谷区	蛍光燈下電燈下	"
7	22.0	2.0	36.0	0.6	千葉	蛍光燈下	"
8	25.2	19.7	42.2	1.6	埼玉	"	紙
9	12.1	3.9	67.7	0.7	三真	電燈下	透明ポリセロ袋
10	24.4	2.1	37.7	0.5	北區	電燈下	アルミ箔袋 (酸化防止剤添加)
11	22.7	4.4	34.0	0.3	平塚	蛍光燈下日光下	アルミ箔袋
12	25.3	3.6	34.5	0.1	川崎	電燈下	アルミ箔袋 (酸化防止剤添加)
13	7.0	3.7	36.9	1.0	戸塚	"	"
14	25.6	5.3	52.4	0.6	多摩	"	"
15	18.6	2.3	-	0.4	"	"	"

なく、またカップ入り製品については袋入りとの差異は見られなかった。今回の試料中には、山下の報告にある500 meq/kgを越すような特別に高いものはなかった。抽出した油脂のI.V.は、48~72、A.V.は0.2~3.2であって、GLCによる脂肪酸組成はラードのそれとほぼ一致している。

即席ラーメンは製造年月日の明示を要する食品である。今回実験試料としたものは、製造後だいたい1~5カ月の製品であった。昭和49年6月1日日本即席食品工業協会は6カ月上過ぎた製品は店頭からはずし、おのの仕入先に返品してほしいと公示している。

2. ポテトチップスについては、陳列場所は蛍光燈下におかれているものが普通で包装状態はポリセロ袋入りであるが、即席ラーメンの場合と異なり袋は透明なものが多かった。

試料14種の含油率は29~38%で、P.O.V.は5~22 meq/kgであり、15 meq/kg以下のものは11種(79%)であった。I.V.は96~125、A.V.は0.3~1.3で、脂肪酸組成をみると綿実油、米ヌカ油の組成と似ている。

3. 揚げせんべいは陳列状態はほとんど蛍光燈下であり包装はポリセロ袋入り、色調は透明のものが大部分であった (パラ売り1種)。

表 6. フーナッツより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態
1	17.4	6.8	118.8	2.2	吉祥寺	蛍光燈下	パラ売り (自家製)
2	16.8	9.7	107.7	2.4	新宿	"	透明ポリセロ袋
3	20.0	10.0	68.7	-	新茶ノ水	"	パラ売り (自家製)
4	11.3	8.4	107.5	2.6	鎌倉	"	透明ポリセロ袋
5	17.2	7.4	64.4	3.1	"	"	パラ売り (工場製)
6	15.3	21.2	61.2	3.2	東京	蛍光燈下電燈下	パラ売り (自家製)
7	26.2	5.6	64.6	1.1	千葉	蛍光燈下	透明ポリセロ袋
8	29.3	8.5	120.9	1.8	北區	"	パラ売り (自家製)
9	18.2	5.4	122.2	1.2	川崎	"	透明ポリセロ袋
10	27.9	14.6	97.3	1.8	多摩	"	パラ売り

表 7. かりん糖より抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	20.9	6.1	97.2	1.7	吉祥寺	蛍光燈下	透明
2	15.2	6.4	114.2	1.5	亀倉	"	"
3	25.0	14.0	104.5	2.3	横須賀	"	"
4	16.4	13.6	102.3	1.2	川崎	"	白
5	28.5	13.1	111.3	0.8	戸塚	"	透明
6	18.6	3.5	108.3	1.0	"	"	"

表 8. 油脂含有食品より抽出した油脂の化学的性状

種	個	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.
即席ラーメン	31種	12~30	5~29	48~72	0.2~3.2
ポテトチップス	14種	29~38	5~22	96~125	0.3~1.3
揚げせんべい	14種	18~32	4~53	94~121	1.0~3.4
バタービナーナッツ	10種	21~41	17~96	92~101	0.5~2.8
クラッカー	15種	7~26	1~20	32~68	0.1~0.6
ドーナッツ	10種	11~30	5~21	64~122	1.1~3.2
かりん糖	6種	15~29	3~14	97~114	0.8~2.3

試料は14種、含油率は18~32%、P.O.V.は4~53 meq/kgで、一つだけ53.6 meq/kgと高いものがあったが、15 meq/kg以下のものは9種(60%)、30 meq/kg以下のものは12種(86%)であった。I.V.は94~121、A.V.は1.0~3.4、脂肪酸組成をみるとこれも綿実油、米ヌカ油の組成と似ている。

4. バタービナーナッツの試料10種についてみると、陳列状態はいずれも蛍光燈下、ポリセロ袋入り、袋は全部下に陳列されているものがほとんどであり、包装状態は

表 9. 油脂含有食品より抽出した油脂の脂肪酸組成

試料名	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
即席ラーメン	—	—	4.2	23.2	15.3	40.2
ポテトチップス	—	—	—	22.2	—	37.3
揚げせんべい	—	—	—	17.9	1.5	41.3
バターピーナッツ	—	—	—	12.7	3.7	49.8
クラッカー	2.9	3.9	30.4	11.1	5.8	23.3
ドーナッツ	—	—	—	30.3	1.7	37.0
かりん糖	—	—	—	18.5	6.2	39.0

表5に示したごとく、ポリセロ袋入り、アルミ箔袋入り、紙袋入り等、種々であり、酸化防止剤添加と表示されたものが多い。

食油率は7~26%で、P.O.V.は1~20 meq/kg、15 meq/kg以下のものは14種(95%)、10 meq/kg以下のものは12種と低かった。I.V.は32~68であり、A.V.は0.1~0.6と他の試料に比べて最も低かった。脂肪酸組成は表9のようであった。

6. ドーナッツは他の食品と違い自家製のものが多い、製造後1~2日間で消費されるのがほとんどである。そのため包装は簡略である。透明なポリセロ袋入りのものもあったが、バラ売りのものが多い。食油率は11~30%の間にあり、P.O.V.は5~21 meq/kgあり、15 meq/kg以下のものは10個中9個(90%)、10 meq/kg以下のものは8個(80%)と低かった。

これは保存期間が短いためである。I.V.は60~70のもの4種、110前後のもの6種とあり、A.V.は1.1~3.2、脂肪酸組成は表9のような値であった。

7. かりん糖は7種について調べたが、包装は透明ポリセロ袋入り、食油率は15~29%、P.O.V.は3~14 meq/kgであった。7種類の結果ではあるが低かった。I.V.

は97~114、A.V.は0.8~2.3、脂肪酸組成は綿実油、米ネカ油と似ている。

以上を総合して考察すると、全試料100種のP.O.V.については表10のごとくである。

表10によれば、P.O.V.20 meq/kg以下のもの85%、30 meq/kg以下のもの91%であった。30.1 meq/kg以上のものはほとんどがバターピーナッツの試料であり、その最高値は95.7 meq/kgであった。100 meq/kg以上のものはみられなかった。A.V.については、0.1~3.4の範囲にあり、試料97種について、1.0以下、2.0以下、2.1以上と分類してその数と比較すると表11のごとくである。表11にみられるように、A.V.1.0以下のものは約60%、2.0以下は約80%であった。揚げせんべいおよびドーナッツの中にA.V.の高いものがあった。

試料は、東京、神奈川県、埼玉、千葉にわたって購入了たが、同一種類の試料において特別な地域的な差異はみられなかった。

包装については、なまは即席ラーメン31種のなか、カップ入りを除いた25種についてみると、赤色フィルムによって包装されているものが約60%であった。渡辺ら<sup>10)</sup>、日下ら<sup>11)</sup>は、完全な真空包装以外に油脂の酸化

表 10. 全試料の過酸化価による分類

試料名	過酸化価 (meq/kg)		
	10以下	15以下	20以下
即席ラーメン	31	9	25
ポテトチップス	14	9	11
揚げせんべい	14	7	9
バターピーナッツ	10	0	0
クラッカー	15	12	14
ドーナッツ	10	8	9
かりん糖	6	3	6
計	100	48	74

表 11. 全試料の酸価による分類

試料名	酸 価			
	1.0以下	2.0以下	2.1~3.4	最高値
即席ラーメン	30	24	28	2
ポテトチップス	14	12	14	0
揚げせんべい	14	1	8	6
バターピーナッツ	10	8	9	1
クラッカー	14	12	14	0
ドーナッツ	19	0	4	5
かりん糖	6	2	5	1
計	97*	59	82	15

\* 全試料数は100であるが、そのうち3試料については、A.V.の測定数値がないので97となった。

に光線の影響が大きくなり、385 m $\mu$ 付近の紫外線と可視光線において450~550 m $\mu$ の領域の光線が影響すること、これを明らかにし、赤色フィルムは透明フィルムや緑色フィルムよりも、過酸化価生成を抑制することを報告している。

山下<sup>12)</sup>は即席ラーメンの保存試験を行ない、室温、開封状態で45日経過によってP.O.V.296.7 meq/kgの最高値に達したことを示しており、さらに光線による影響では紫外線防止加工を施したフィルムにより包装されたものでも、白色蛍光灯下における酸化防止効果はほとんどなく、弱い赤色フィルムでは明らかに効果があつたと述べている。

日下ら<sup>11)</sup>によれば、即席ラーメンを真空包装した状態でしかも出回時と同様に段ボール箱に密封し、保存試験を行なった結果では、実験開始時のP.O.V.11.8 meq/kgに対し、室温および30°Cでは60日経過してもほとんど変化なく、40°Cの場合は50日経過で約15~16 meq/kg、60日経過で20 meq/kgであった。50°Cの場合は50日経過で20 meq/kg、60日経過で30 meq/kg近い値を示した。

下岡ら<sup>13)</sup>によれば揚菓子類(かりん糖、揚げせんべい等)の中にP.O.V.の高いものが見られ、とくに揚げせんべいには、140.9、264.6 meq/kg程度のものもあつたと報告されているが、今回の試料では揚げせんべいで53.0 meq/kg、バターピーナッツで95.7 meq/kgが最高であった。油脂が自動酸化によって脂肪酸価が低下し、さらに酸化を示すことは金田ら<sup>14)</sup>の研究をはじめとし、松尾<sup>15)</sup>の研究によって古く明らかにされているが、現在はP.O.V.の上昇期においては、その過酸化価に平行する。

Crampton<sup>16)</sup>はP.O.V.が100 meq/kg以下の場合は、白ネズミによる実験で悪い症状は現われなかつたと報告しているが、松尾による結果も同様であつた。ま

たAndrews<sup>17)</sup>は大豆油を銅および鉄化合物を触媒として、60°Cで通気して過酸化価100、400、800、1,200 meq/kgの酸化大豆油を調製し、これを15%または20%飼料に添加して、白ネズミによる成長試験を行なつていた。その結果ではP.O.V.が100 meq/kgの試料油では、白ネズミはほとんど列座の大豆油と同じ程度に生長したと報告している。

以上からして100 meq/kgあたりが一つのめどになるかと思うが摂取する量との関係もあり、健康状態にもよるので安全性を十分に考える必要がある。

ドイツでは、P.O.V.が10 meq/kg以上の油脂は食用に用いないとしており、非常にきびしい。しかし今回の各試料のP.O.V.、他の報告にみられる試料のP.O.V.、既報の白ネズミによる動物実験の結果を総合的に考察し、油脂含有食品中の油脂のP.O.V.は30 meq/kgあたり以上の風害をおくのが適当であろうと考

える。自動酸化によって生成されたもののうち、分解物で毒性の強いものもあり、(それらはごく微量であつて、油脂中に存在しても全体としてとくに悪影響を与えたりは考えられないが)、また油脂の栄養価を判定するためにいくつかが方法が示されておらず、P.O.V.だけから判断するのは当を得ておらず、P.O.V.のみでは、P.O.V.の立場からすれば30 meq/kg以上は食用としないといふべきであると考えられる。

油脂含有食品中の過酸化価の変化は、共存する他の成分の影響を大きく受けることは、自動酸化物とたんぱく質、アミノ酸等の相互作用<sup>18)</sup>を考へても容易におか

ることであり、共存する水分も大きな関係をもっている。食品を乾燥すると水分が減少し、油脂と空気との接触面積が大きくなって、油脂は酸化を受けやすくなる。水分の含量が多くなるとP.O.V.の上昇は比較的少な

く、むしろ A.V. が増大する。この過程では生成してき  
た過酸化物の分解も水によってひきおこされると考  
えられる。

油脂含有食品の流通消費の過程での酸化変性につい  
ては、十分な注意が必要である。

要 約

市販の油脂含有食品として即席ラーメン (31 種)、ポ  
テトチップス (14 種)、揚げせんべい (14 種)、パター  
ンナッツ (10 種)、クラッカー (15 種)、ドーナツ  
(10 種)、かりん糖 (6 種)、計 100 種について、その酸  
化変性の状態を調べた。

試料から抽出した油脂の過酸化物価、ヨウ素価、酸価  
を測定した結果を総合して考察すると下記のようであ  
る。

(1) 過酸化物価についてみると、100 種中 30 meq/  
kg 以下のもの 91 種、30.1 meq/kg 以上のものはパ  
ーヒーナッツに多く (10 種中 7 種)、その最高は 95.7  
meq/kg であった。

(2) 酸価は 0.1~3.4 の間にあり、1.0 以下のもの  
59 種、2.0 以下のもの 82 種であり、揚げせんべいと  
ドーナッツに高いものが多かった。

(3) 今回の各試料の過酸化物価、他の報告にみられ  
る試料の過酸化物価、既報の白ネズミによる動物実験の  
結果を総合して考察し、油脂含有食品中の油脂の過酸化  
物価は 30 meq/kg あたりにその限度をおくのが適当で  
あるとも考える。

コレストロールの比色定量法の  
比較検討

阿 部 重 信, 金 田 尚 志  
東北大学農学部農産化学科

Comparative Study of Photometric  
Determinations of Cholesterol

Shigenobu ABE, Takashi KANEDA  
Department of Food Chemistry, Faculty of  
Agriculture, Tohoku University, Amamiya-  
machi, Tsurumidori, Sendai, Japan 980

Many workers have been used Sperry-Webb  
method which has long been believed the best  
method for total and free cholesterol determina-  
tion of blood and tissues, however, this method

〒 980 仙台市岩通南町 1-1

栄養と食糧

本報告は、昭和 49 年 5 月第 27 回日本栄養・食糧学会  
総会 (東京) において発表された。

文 献

- 1) 下岡 勉, 外山修之: 名古屋産業科学研究所研  
究報告, 38, 10 (1957)
- 2) 金田尚志, 渡辺寛子: 栄養と食糧, 16, 211 (1963)
- 3) 柳本安司, 金田尚志: 栄養と食糧, 20, 178 (1967)
- 4) 種本美佐子, 森 豊夫: 栄養と食糧, 20, 367  
(1967)
- 5) 山下太郎: 油化学, 14, 754 (1965)
- 6) 秋谷年見: 油化学, 14, 733 (1965)
- 7) 三浦利之, 武藤 健, 長野景典, 宮木高明: 食  
衛法, 7, 68 (1966)
- 8) 松尾 登: 第 38 回製油研究会資料 (1969)
- 9) 渡辺 芳, 小林 晃, 久米寿昭, 川北 敏: 日  
水誌, 32, 327 (1966)
- 10) 日下兵衛, 深沢 輝, 松尾 登: 栄養と食糧,  
22, 582 (1969)
- 11) 金田尚志, 石井清之助: 日水誌, 19, 171 (1953)
- 12) 金田尚志, 松井秀忠, 石井清之助: 日水誌, 20,  
50 (1954)
- 13) 松尾 登: J. Biochem., 41, 481 (1954)
- 14) 松尾 登: J. Biochem., 41, 647 (1954)
- 15) Crampton, E.W. et al.: J. Nutrition, 49, 333  
(1953)
- 16) Andrews, J.S. et al.: J. Nutrition, 70, 202  
(1960)
- 17) 金田尚志, 吉岡俊子: 油化学, 21, 316 (1972)
- 18) 松尾 登: 生化学, 29, 773 (1957)
- 19) 松尾 登: "Lipids and Their Oxidation", 321  
(1962), AVI. Pub. Comp. INC., Westport,  
Connecticut, U.S.A.

(昭和 49 年 9 月 28 日受理)

is rather complicated for the formation of choles-  
terol digtonide, while the color developed by  
Liebermann-Burchard reaction is quite unstable.  
In order to find a nice method, first the authors  
compared the several photometric methods. And  
through this comparison, we notice that a mod-  
ified method of Nief-Duvel is one of the best  
methods for the formation of cholesterol digi-  
tonide. For the coloration, the cholesterol digi-  
tonide is dissolved in 90% acetic acid and a  
greenish blue color is developed by addition of  
the reagent described by Zurkowski with a  
syringe. This developed color is very stable and  
the procedure is simplified remarkably. We be-  
lieve that this method is excellent for the choles-  
terol determinations of various tissues as well  
as plasma or serum.

(Received October 28, 1974)

コレストロール (CS) 代謝の研究分野では種々の CS  
定量法が使われている。ちなみに、CS 代謝に関する論  
文がもっとも多く掲載されていると思われる Journal of

Lipid Research と本誌の過去 8 年間の論文中の定量法  
を調べてみると、大部分が比色法によっているが、その  
操作は研究者によりまちまちである (約 20 種)。また、  
これらの定量法の中で、米國では L-B 反応 (21 例) が  
わが國では Killiani 反応 (15 例) が多く用いられてい  
る。

著者はこれまで使用してきた比色による定量法を  
比較検討するとともに、Sperry-Webb (S-W) 法と Zur-  
kowski (Z) 法を組合せる改良を試みたので、その結果  
を報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬  
水酸化カリウム、スルホサリチル酸、塩化第二鉄 6 水  
塩、米酢酸、無水酢酸は和光純薬製特級試薬を、ジギト  
ニンは Merck 製のものを使用した。クロロホルムは特級  
試薬を塩化カルシウムで脱水後蒸留し、アセトン、エチ  
ルアルコールは 1 級試薬を、エタノールは未変性エタノ-  
ール (日本アルコール販売製 2 級品) を蒸留して用い  
た。

2. 試薬の調製  
CS 標準液 第一製薬標準 CS 100 mg をクロロホル  
ム 100 ml で定容したものを用いた。CS 標準液原液とし、使用  
に際して 10 倍に希釈して用いる。

発色試薬 Zurkowski 試薬<sup>1)</sup>、Liebermann-Burchard

Table 1. Results of analyses of plasma or serum cholesterol in duplicate specimens (mg/100 ml).

Sample	Method	Described	Sperry-Webb	Abel-Kendall	Zurkowski	Zak-Henly	Zak et al.						
1		100	98	101	102	92	92	116	113	115	116	114	115
2		92	94	96	97	88	88	102	102	104	104	108	110
3		91	92	93	94	83	88	102	103	108	108	107	107
4		126	126	126	130	120	122	138	140	146	146	150	151
5		109	108	113	109	104	103	118	114	125	125	132	131
6		94	93	93	92	85	85	102	99	102	102	118	119
7		108	105	108	108	101	102	117	114	107	108	115	118
8		131	133	133	134	125	128	149	147	142	139	151	152
9		116	116	122	122	115	115	140	135	130	127	132	132
10		152	151	157	159	146	147	173	172	160	161	165	167
11		149	147	150	150	145	145	166	166	154	153	160	162
12		98	95	100	101	92	92	103	103	101	101	107	107
Concra*		133	133	132	133	133	132	168	165	144	144	143	144
Mean value		115.1	117.5	117.5	117.5	110.6	110.6	129.4	125.8	125.8	125.8	131.4	131.4
Coefficient of variation		12.8%	12.8%	12.8%	12.8%	13.8%	13.8%	14.4%	14.4%	11.6%	11.6%	11.1%	11.1%

\* Reference level 147 mg/100 ml. (a modified method of Zak and Henly).

(L-B) 試薬<sup>2)</sup>、Zak-Henly (Z-H) 試薬<sup>3)</sup> はそれぞれ  
原標にしたがって調製した。

3. 血漿 (血清) コレストロールの定量

i) Sperry-Webb<sup>4)</sup> 改良法  
1) CS の抽出とジギトニン付加物の生成 血漿 1 ml  
をアフト遠心管 (15 ml) に採り、アセトン・エタノ-  
ール (1:1) 混液 9 ml を注射筒を用いて激しく注  
入し、内容物をよく分散させ、2,000 rpm、5 分間の遠  
心分離により上澄液を分けて試料とする。

ii) 総 CS の定量 試料 0.5 ml を遠心管 (15 ml)  
に採り、33%水酸化カリウム液 1 滴を加え、ピーブワ  
タをし、サンドパス (40~50°C) で 30 分間ケン化する。  
反応液には 0.1% フェノールフタレイン液 1 滴を加え、  
15%酢酸溶液で中和のち、アセトン・エタノール混液  
1.5 ml を注射筒を用いて加え、サンドパスで保温しながら  
0.5% ジギトニン 50% エタノール溶液 1 ml を注  
射筒を用いて加える。約 10 分後取出し、1 夜室温暗所  
に放置する。翌日、3,000 rpm、20 分間の遠心分離を行  
い、傾斜法により上澄液を捨てる。沈殿はエチルエーテ  
ル・アセトン (2:1) 混液 2 ml を先を細くした注射  
筒を用いて激しく注入分散させたのち、3,000 rpm、5  
分間の遠心分離を行い、再び傾斜法により上澄液を捨  
てる。

iii) 遊離型 CS の定量 試料 2.0 ml を遠心管に加  
り、15%酢酸液 1 滴を加え、以下ジギトニン溶液を加

# 自動酸化油投与マウスの病理組織学的研究 (急性毒性)<sup>†</sup>

白 台 鴻\*, 星 野 忠 彦\*\*, 金 田 尚 志\*

\* 東北大学農学部食糧化学科

\*\* 東北大学農学部畜産学系

## Histopathological Studies on Mice Administered Autoxidized Oils (Acute Toxicity)<sup>†</sup>

Tai Hong PAIK,\* Tadabiko HOSHINO,\*\* Takashi KANEDA\*

\* Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University

\*\* Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University

In order to clarify the mechanism of acute toxicity of autoxidized oils, histopathological studies were carried out. 50% and 100% lethal dosages of methyl linoleate hydroperoxides (LMHPOs) and autoxidized methyl linoleate contained secondary oxidation products were administered orally to mouse. The mice were inspected continuously for 48 hours, the died and survived mice were anatomized. Specimens of small intestine, liver, lung, kidney and other tissues were separated immediately from body.

Gross symptoms were observed in small intestine, liver, lung and kidney by histopathological examination. Marked effect of these compounds was necrosis, fatty degeneration and congestion in tissues. The degree of impairments in each tissue was correlated to the toxicity of samples. From a consideration of histopathological observation, it was recognized that similar symptoms were induced by LMHPOs and secondary oxidation products. However, severe injury was observed on the tissues after secondary oxidation products.

The toxic effect of secondary oxidation products appears to come from their smaller molecular weight than LMHPOs and the presence of their functional groups such as carbonyl compounds. From the results obtained, the authors conclude that one of the reasons for the toxic effect of secondary oxidation products than hydroperoxides is attributable to the facility of absorption of secondary oxidation products.

(Received September 16, 1975)

金田らは自動酸化油の毒性の本体はヒドロペルオキシド (HPO) であると報告したが、その後、2次酸化生成物に HPO 以上の毒性を示し、とくに遊離酸 5 ないし 9 のヒドロペルオキシドアルケナール (HPOA) の毒性がもっとも強いことを明らかにした<sup>†</sup>。自動酸化油とくに HPO を動物に与えたときに生ずる毒性の発生機構についてはいくつかの報告が出されているが、なお不明な点が多い。これらの報告のうち毒性発生機構を病理組織学的に検討したものをみると、金田らは自動酸化油は小

腸および腎臓に影響を及ぼし腸管を直接貫すとしてい  
る。Privett ら<sup>‡</sup> はリノール酸メチルヒドロペルオキシ  
ド (LMHPO) を雄ラットに尾静脈注射した場合、肺へ  
の影響が大きいことをとめていいる。Nakamura ら<sup>§</sup> は  
自動酸化油をラットに経口投与し、脾臓に著明な変化を  
とめていいる。また土田<sup>¶</sup> はリノール酸メチル (LM)  
の誘導体をマウスに与え、リンパ系組織の障害と脾臓の  
萎縮などを認めていいる。

上記のように自動酸化油ないし過酸化物の動物組織に  
およぼす影響についてはいくつかの報告があるが、な  
お、統一的な見解は出されていない。また従来の報告は  
HPO を単離せず、各種酸化生成物の混合物を用いて試験  
を行なったものが多く、とくに HPO の分解により生ず  
る 2 次酸化物に由来する毒性の病理組織学的研究はま  
た行なわれていない。そこで、著者は LMHPO お  
よび 2 次酸化物をよく自動酸化 LM を用いマウスに  
対する急性毒性を病理組織学的に検討したので、その結  
果を報告する。

<sup>†</sup> 自動酸化油の毒性に関する研究 (第 5 報)  
Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils  
(Part V)

\* \*\* 〒 980 仙台市堤通南宮町 1-1

略字解 HPO: ヒドロペルオキシド

LMHPO: リノール酸メチルヒドロペルオキ  
シド

HPOA: ヒドロペルオキシアルケナール

AOML: 自動酸化リノール酸メチル

LM: リノール酸メチル

### 実験方法

#### 1. 試料の調製

リノール酸メチルヘリドベロオキシンド：サフラワー油混合脂肪酸メチルエステルを減圧蒸留，尿素付加法により精製し，純度 98% の LM を得た。これを 2 次酸化生成物の生成を抑えるため低温 (3°C) で酸素を吹き込み 40 日間自動酸化させ P.O.V. が 2080 meq/kg, CO.V. が 230 meq/kg となったものをセルロースカラムクロマトグラフィー<sup>9)</sup> で分離し，P.O.V. 5900 meq/kg, 平均分子量 324 (理論値) P.O.V. 6125 meq/kg, 分子量 326.53 の LMHPO を得た。この LMHPO は石油エーテル：ジメチルエーテル：酢酸 (90:10:1) を展開溶媒とした Wakogel B-5 の薄層プレート上で単一のスポットを示した。

リノール酸メチル 2 次酸化生成物：2 次酸化物を得るため，LM を 60°C で酸素を吹き込み自動酸化させた。25 時間後，P.O.V. が 2670 meq/kg と最高値付近に達したとき試料を採取し，これを AOML-1 とし，さらに 90 時間酸化させ P.O.V. が最大値を過ぎるべきオルキンドがこわれて 2 次酸化生成物を多く生成するようになったものを AOML-2 として試料とした (Fig. 1)。AOML-1 は P.O.V. 2670 meq/kg, CO.V. 876 meq/kg, AOML-2 は P.O.V. 1167 meq/kg, CO.V. 1720 meq/kg を示した。

#### 2. 動物実験

各試料を Table 1 に示すように，1 群 5 匹よりなる体重 14~15g 程度の DD 系雄マウスに 1 夜絶食後，胃ゾンデを用いて，1 回経口投与した。LMHPO は LM で希釈し，M-1 群には吉岡ら<sup>10)</sup> が求めた LD<sub>50</sub> 量 0.256g LMHPO/20g mouse (762 μmole LMHPO/20g mouse) を投与した。また A-1 群には AOML-1 を 0.6 ml/20g mouse, A-2 群には AOML-2 の毒性の強さを考慮して半量 0.3 ml/20g mouse を前記同様のマウスに 1 回経口投与した。試料投与後，供試マウスは固型飼料を自由に採取させた。48 時間マウスの状態を観察するとともに，体重の変化も調べた。マウスは経口投与後直前，直後また生き残ったものは 48 時間後断頭処死し，ただちに

Table 1. Toxicity of each sample orally administered on mice.

Group	Sample	Amount of sample orally administered	Mortality after 24 hours	
			No. of mice	No. of survival
M-1	*LMHPO (LD <sub>50</sub> )	0.256 g LMHPO/20 g mouse	5	2
M-2	LMHPO (LD <sub>100</sub> )	0.600 g LMHPO/20 g mouse	5	0
A-1	**AOML-1	0.6 ml/20 g mouse	5	2
A-2	AOML-2	0.3 ml/20 g mouse	5	3

\* methyl linoleate hydroperoxides. \*\* autoxidized methyl linoleate.

### 栄養と食糧

各試料投与後，各群のマウスはいずれも行動緩慢となり，食欲は減退して下痢および呼吸困難を示し，口内，肛門のまわりはセボレン (皮脂ロウ症) を思わせる症状を示した。生き残ったマウスは平均 10~15% 体重が減少したが，生き残ったマウスでは回復とともに摂餌をはじめ，体重は増加した。

#### 2. 病理組織学的所見

1) 小腸 Table 2 に示すごとく，死亡マウスには各群とも小腸粘膜の壊死を認めた (Fig. 2)。また，上皮細胞，粘膜固有層，粘膜下組織およびリンパ管に脂肪沈着が認められているのが特徴的であった (Fig. 3)。毒性の強い M-2 群では絨毛の壊死が強く，とくに粘膜下組織にまでおよんでおり，中程度の壊死を認めた (Fig. 4)。脂肪沈着は組織の破壊のため確認できなかった。生き残ったマウスでは絨毛の固有上皮細胞に空胞形成が顕著であった (Fig. 5)。また，絨毛先端部固有層には壊死がみられた。固有層内血管中の赤血球は PAS 陽性となり，赤血球の異染色性を認めた。

以上の所見によると，死亡マウスでは LMHPO および 2 次酸化生成物のいずれにも，小腸粘膜の壊死と脂肪沈着が著しかった。また，両群とも管腔は拡張し油性物質が充満していた。

Table 2. Histopathological observation in the small intestines orally administered LMHPOs or AOML on mice.

Group	Villus (絨毛)		Fatty deposition (脂肪沈着)	
	上皮細胞の壊死 (epithelial cell necrosis)	管腔の拡張 (dilatation of the lumen)	固有層 (lamina propria)	粘膜下組織 (submucosa)
M-1	+	+	##	+
M-2	+	+	+	+
A-1	-	-	/	+
A-2	-	-	+	+
Survival	-	-	-	-

\* Necrosis is reached to mucosa and tela submucosa. The degree of symptoms is roughly indicated by the number of + signs: - very weak, + weak, ## moderate, # strong, +++ very strong, / can't identify.

### 2) 肝臓

Table 3 に示すごとく，M 群の死亡マウスの肝臓には生存マウスには発現しない血管に近接した部位でびまん性壊死がみられた (Fig. 6)。A 群のうち A-2 群の死亡したものは A-1 群では認められなかった壊死がみられ，2 次酸化生成物の障害が強いことを認めた。各群とも肝細胞のグリコーゲンは消失し (Fig. 7)，中性脂肪が特徴的に蓄積されていたが，これらの程度の程度の程度とよく一致していた (Fig. 8)。一方，全群の死亡マウスの静脈洞内皮細胞は肥大し多核様の沈着が多く，活性化された。また全群の死亡マウスでは充りつぱり血が起り，これらの変化は死亡マウスにおいてとくに著しかった。肝細胞の核の異状，すなわち大・巨核の出現，核の大小不同，核濃縮，二核細胞の出現，核消失 (Fig. 9) などが全マウスで認められたが，死亡マウスにやや強く現われた。

### 3) 肺臓

Table 4 に示すごとく肺臓の壊死は LMHPO 投与群のほうが，2 次酸化生成物投与群より強い影響を与えており，他の臓器とは異なっていた。すなわち，2 次酸化生成物を与えた A-2 群を除いて，生死に関係なく出血と充りつぱり血，さらには無気肺病と壊死集がみられた (Fig. 10)。肺臓は拡張し上皮細胞は肥厚し，なかには壊死細胞がみられた。一般に血管の拡張と充りつぱり血が強い。

各試料投与後，各群のマウスはいずれも行動緩慢となり，食欲は減退して下痢および呼吸困難を示し，口内，肛門のまわりはセボレン (皮脂ロウ症) を思わせる症状を示した。生き残ったマウスは平均 10~15% 体重が減少したが，生き残ったマウスでは回復とともに摂餌をはじめ，体重は増加した。

#### 2) 肝臓

Table 3 に示すごとく，M 群の死亡マウスの肝臓には生存マウスには発現しない血管に近接した部位でびまん性壊死がみられた (Fig. 6)。A 群のうち A-2 群の死亡したものは A-1 群では認められなかった壊死がみられ，2 次酸化生成物の障害が強いことを認めた。各群とも肝細胞のグリコーゲンは消失し (Fig. 7)，中性脂肪が特徴的に蓄積されていたが，これらの程度の程度の程度とよく一致していた (Fig. 8)。一方，全群の死亡マウスの静脈洞内皮細胞は肥大し多核様の沈着が多く，活性化された。また全群の死亡マウスでは充りつぱり血が起り，これらの変化は死亡マウスにおいてとくに著しかった。肝細胞の核の異状，すなわち大・巨核の出現，核の大小不同，核濃縮，二核細胞の出現，核消失 (Fig. 9) などが全マウスで認められたが，死亡マウスにやや強く現われた。

#### 3) 肺臓

Table 4 に示すごとく肺臓の壊死は LMHPO 投与群のほうが，2 次酸化生成物投与群より強い影響を与えており，他の臓器とは異なっていた。すなわち，2 次酸化生成物を与えた A-2 群を除いて，生死に関係なく出血と充りつぱり血，さらには無気肺病と壊死集がみられた (Fig. 10)。肺臓は拡張し上皮細胞は肥厚し，なかには壊死細胞がみられた。一般に血管の拡張と充りつぱり血が強い。



Group	Mortality	Survival	M-2	A-1	A-2	Survival
M-1	Death	+	+	+	+	+
M-2	Death	+	+	+	+	+
A-1	Death	+	+	+	+	+
A-2	Death	+	+	+	+	+
Survival	Survival	+	+	+	+	+
C: central band of hepatic lobule, M: middle band of hepatic lobule, P: peripheral band of hepatic lobule. * The control group showed mean of 9.6% in occurrence ratio.						
<b>Sudan black B stain</b> Congestive hyperemia of the livers 肝臓の充血 Dilatation of the portal veins 門脈の拡張 Lipids 脂質 Fatty degeneration 脂肪変性						
<b>PAS stain</b> Activation of reticulo-endothelial system 網内系・単核球系活性化 Liver cells 肝細胞 Endothelium 内皮細胞 Glycogen deposition 糖原蓄積 Atrophy of the liver cells 肝細胞萎縮						
<b>Nuclei of liver cells 肝細胞核</b> Pyknosis 核縮小 Occurrence ratio of binuclear cells (%) 二核細胞出現率 (%) Irregularity in the nuclear sizes 核の大きさの不均一性 Appearance of large and giant nuclei 巨大核の出現 Disappearance of nuclei 核の消失						

Table 3. Histopathological observation in the livers orally administered LMHPs or AOML on mice.



Fig. 2. Jejunal in dead mouse with necrosis at the top of jejunal villi. (H-E stain, x200)  
 Fig. 3. Jejunal in dead mouse with fatty deposition in the tunica propria and tela submucosae. (Sudan black B stain, x100)  
 Fig. 4. Jejunal in dead mouse with colliquative necrosis at the top of jejunal villi. Remarkable changes in the jejunal villi are observed. (H-E stain, x100)  
 Fig. 5. Jejunal in survival mouse with vacuolic degeneration in the epithelial cells. (H-E stain, x700)

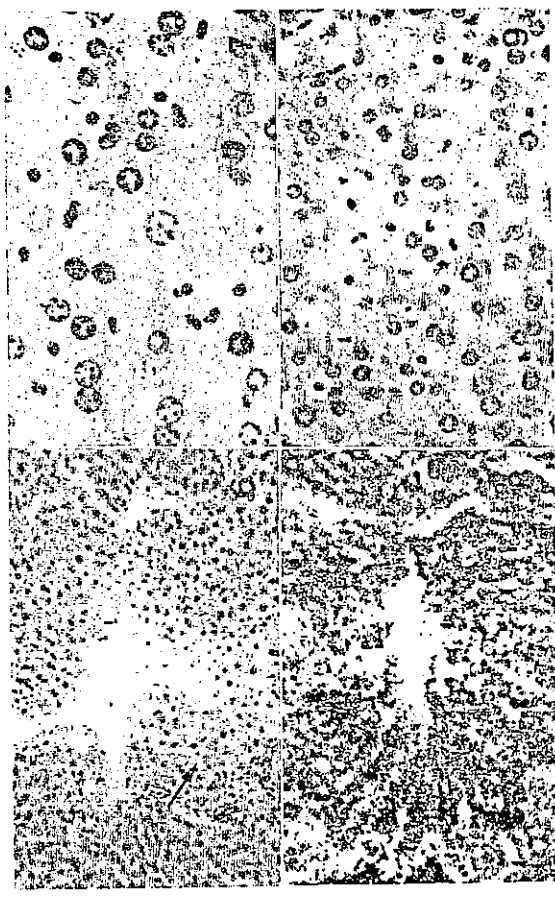


Fig. 6. Liver in dead mouse with diffusional necrosis near blood vessels. (H-E stain, x200)  
 Fig. 7. Liver in dead mouse with glycogen disappearance in the liver. (H-E stain, x200)  
 Fig. 8. Liver in dead mouse with fatty degeneration in the liver. (Sudan black B stain, x200)  
 Fig. 9. Disappearance of nuclei in the liver cells of the dead mouse. (H-E stain, x400)



場合には、壊死も強い傾向がみられた。また、生存マウスには肺炎を起こす傾向にあった。

4) 腎 臓

Table 5 に示すごとく、各群共通の変化として糸球体の壊死と充血、出血と、尿管の崩壊壊死や主部尿管の空胞形成が認められた (Fig. 11)。とくに死亡マウスでは、主部尿管の脂肪沈着を認めた (Fig. 12)。このほか尿管上皮細胞の脂肪沈着性、ポーマンのう腔拡張と肥厚などがみられたが、これらの変化は2次酸化生成物を投与した A-2 群でいちばん著しかった (Fig. 13)。また A-2 群では特異的障害として尿管管におけるたんぱく尿原付着、拡張尿管管が中等度に見られた。

5) その他の臓器

死亡マウスの胃は全群とも胃粘膜が薄くなり、液漏と充血がみられ、血球変性を認めた。とくに A-2 群では腸細胞に死滅細胞が多く、空胞変性も顕著であった。心臓の障害は一般に前記の臓器よりも少なく、筋繊維の空胞変性と血管内血球の異染色性が軽度に見られ、精巣では精細管腔内に合胞体性巨細胞が出現し、精細管の壊死が軽度に見られた。また精細管の死滅像がみられた。脳では全群ともめだつ組織的変化はなかったが、M-2 群で軽度の出血、うっ血、神経細胞死滅像がみられた。

考 察

金田らは高度不飽和性自動酸化物をマウスに経口投与した場合、小腸粘膜に細胞浸潤を認め、過酸化物は腸管を血球塞すとともに併発系を破壊すると報告している。土田らは LMHPO をマウスに経口投与し、尿管の高度の拡張と上皮細胞の空胞形成を認めている。Privett らは LMHPO を投与すると、尿管はいくぶん拡張し下痢を起こしたといっている。

本研究でも死亡マウスには、尿管の拡張と小腸粘膜上皮細胞の空胞形成および壊死がみられ、上記の報告と一致している。しかし難性が強い場合には、これまでの報告には記載されていない絨毛先端部の起壊壊死と粘膜上皮の剝離が認められた。膀胱は粘膜上皮、粘膜固有層、粘膜下組織およびリンパ管に沈着していた。一方生存マウスでは壊死は認められなかったが、絨毛先端部の固有層に壊死が認められた。試料の投与量が少ない場合、小腸の障害はまず粘膜上皮細胞の空胞形成がおこり、ついで絨毛先端部で壊死がおこり、つづいて粘膜の壊死が後々におこるものと推察された。これにともななって脂肪沈着は粘膜上皮から粘膜下層にまで及んでいくと考えられる。また投与量が多い場合、壊死は急激におこるため脂肪の沈着がみられないものと思われた。

肝臓の変化をみると、土田らは核の大小不同と細顆

栄養と食糧

内皮系の活性化を認めているが、本研究では土田らの所見のほかに二核細胞の出現や核の消失、細胞の萎縮、核濃縮などを認めた。とくに死亡マウスでは、血管に近接した部位でびまん性壊死がみられた。死マウスでは門脈の拡張と充血がみられた。死マウスは脂肪変性をおこし、中性脂肪が沈着しており、脂肪代謝の異常が考えられた。また死亡マウスにはグリコーゲンの消失がみられたが、これは小腸の障害による吸収の阻害、食餌減などの結果と推定された。一方、生存マウスではグリコーゲンは存在したが、その分布は肝小葉の周辺で減っており、減少の程度は肝臓の障害度と比例していた。A 群の場合、A-2 の死亡マウスに壊死がみられたが、A-1 群にはみとめられないことより、2次酸化生成物の毒性がより強いことは明らかである。全体的にみて、肝臓の障害の強さは慢性と平行しており、肝臓障害は酸化脂質の毒性発現の重要な部分を占めていると考えられた。

前記のごとく Privett らはラットに LMHPO を尾静脈注射すると組織障害は肺にだけおこり、経口投与の場合には肺はほとんど認められず、出血、出血などの障害を認めていた。著者は経口投与でもうっ血、出血などを認めたが、さらに全マウスに無気肺病と壊死果が強くみられ、Privett らの結果よりも本実験の所見のほうが強く現われたのは、LMHPO の投与量の差によるものと考えられる。そして血管内投与、経口投与を問わず同じような所見が得られたところから、LMHPO は経口投与によって、小腸から吸収されて肺に直接作用する可能性が推察された。

腎臓については、金田らは髓質と皮質との境界付近に尿管の拡張を認めている。本研究では金田らの報告よりも著しく強い障害があらわれ、とくに糸球体に壊死と充血が起こり、尿管には崩壊壊死や主部尿管の空胞形成、出血、硝子滴変性、脂肪沈着などを認めた。このことから LMHPO および2次酸化生成物投与によって尿管の機能の低下が推定されると同時に、上述の諸臓器の障害と同じ種類の障害がおきていることが明らかである。

全体的にみた場合、各組織の障害は LMHPO 投与時では小腸に最も強く、ついで肺臓、肝臓、腎臓の順であったが、2次酸化生成物投与時は小腸、肝臓、腎臓の順となり肺臓は大きい障害を受けていない。このことから LMHPO および2次酸化生成物はまず小腸から直接吸収され小腸粘膜に強く障害をおこし、ついで各臓器に障害を与えたと考えられるが、LMHPO と2次酸化生成物の肺に対する影響の違いは、なお明らかでない。なお、2次酸化生成物の毒性が著しいのは、分子量が小さく腸よりの吸収が LMHPO よりも容易であり官能基に

Table 4. Histopathological observation in the lungs orally administered LMHPOs or AOML on mice.

Table with 5 columns: Group, Death, Survival, Death, Survival. Rows list histopathological observations such as Hemorrhage, Congestive hyperemia of the lung, Dilatation of the blood vessels, Appearance of macrophagocytes, Focal necrosis, Atelectasis, Dropping of bronchiole epithelium, Deposition of substance like protein, Epithelial proliferation, Epithelial thickness, Epithelial drooping, Necrosis of epithelial cells, Alveolar rupture, Alveolar dilatation.



- 5) 土田雅子, 三浦利平, 武藤 健, 香木高明: 油化学, 22, 259 (1973)  
 6) Kepler, J.G., Sparreboom, S. and Von Mikusch, T.D.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 36, 308 (1959)  
 7) Olcott, H.S. and Dolev, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 114, 820 (1964)  
 8) 熊沢 恒, 大山 保: 油化学, 14, 167 (1965)

- 9) Kokatnur, M.G., Bergan, J.G. and Drapper, H.H.: *Anal. Biochem.*, 12, 324 (1965)  
 10) 吉岡俊子, 金田尚志: 油化学, 23, 321 (1974)  
 11) 佐野 豊: 組織学研究法, 67, 179, 456, 480 (1974), 南山堂 (東京)

(昭和50年9月16日受理)

## シイタケの血漿コレステロール低下機構について (IV)<sup>†</sup> (<sup>14</sup>C-エリタデニンの白ネズミ体内でのゆくえ)

徳田 節子, 鈴木 神, 金田 尚志  
東北大学農学部食糧化学科

### Reducing Mechanism of Plasma Cholesterol by Shi-ta-ke Mushroom (IV) (Trace of <sup>14</sup>C-Eritadenine in Rats Body)

Setsuko TOKUDA, Shin SUZUKI, Takashi KANEDA  
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University,  
Tsutsumi-dori, Sendai

It is known that Eritadenine in Shi-ta-ke mushroom markedly reduces plasma cholesterol level in rats. In this paper, <sup>14</sup>C-Eritadenine was synthesized and the incorporation of this substance into rats was investigated. The results obtained were as follows:

- (1) After oral administration of <sup>14</sup>C-Eritadenine, it was found that the most of Eritadenine were excreted into feces, however, a part was absorbed and found mainly in liver.
- (2) Liver was fractionated by ultracentrifugation and it was observed that a rapid incorporation of Eritadenine into supernatant and followed by microsomes and mitochondria in the order.
- (3) Amounts of incorporated cholesterol into intestinal wall after oral administration of <sup>14</sup>C-cholesterol were same among Shi-ta-ke and control groups.
- (4) Plasma cholesterol reducing effect of Eritadenine by intraperitoneal injection was also observed. The results with previous paper<sup>1)</sup> indicate that one of the hypocholesterolemic activity of Eritadenine would be due to the inhibition of lipoprotein formation in liver.

(Received October 20, 1975)

筆者らはシイタケの白ネズミ血漿コレステロール低下機構を明らかにするため、血漿中のリポたん白を分離したところ、コレステロールを添加しない飼料を用いた場合、シイタケを与えると血漿コレステロール値はすべてリポたん白画分において低下し、とくにD<1.019 (VLDL) およびα-リポたん白 (HDL) 画分では著しく減少することを認め、またコレステロール1%を多く含む飼料では、VLDL およびβ-リポたん白 (LDL) 画分で低下していた。さらにリポたん白中のたん白、リポたん白画分ともにVLDL, HDL 画分で低下すること、<sup>14</sup>C-標識コレステロールを経口投与すると24時間後、α-リポたん白からβ-リポたん白へのコレステロール移行がはやいこと、<sup>14</sup>C-化合物は多く胆汁中へ排泄されることなども認められた。

本報告においては、シイタケの血漿コレステロール減少効果物質である「エリタデニン」<sup>1)</sup>の標識物を合成

<sup>†</sup> 食用キノコ類の白ネズミコレステロール代謝におよぼす影響 (第10報)  
Effect of Mushrooms on Cholesterol Metabolism in Rats (Part X)  
下 980 仙台市堤通兩宮 1-1

し白ネズミに与えてそのゆくえを追い、血漿コレステロール減少機構を解明しようとしたのでその結果を報告する。

### 実験方法

実験1 <sup>14</sup>C-標識エリタデニンの合成と取りこみ  
 1) <sup>14</sup>C-標識エリタデニン [2(R), 3(R)-dihydroxy-4(8-<sup>14</sup>C-9'-adenyl) butyric acid] の合成  
 Fig. 1 に示すごとく物質I (廉沢薬品 K.K. 提供) 120 mg, 濃酸 0.1 ml に H<sup>14</sup>COOH (英国, The Radiochemical Centre 製) 2 mCi を混じり 100°C 湯浴上で1時間還流加熱後、過剰の濃酸を除くため、脱塩水による洗浄と乾固を6回くり返し、つぎに 1N NaOH 2 ml を加え 100°C 湯浴上で30分間還流加熱、放冷後、10% HCl で pH を3 に調節し析出した結晶を濾別し、水洗、乾燥しエリタデニン (III) を得た。

2) <sup>14</sup>C-標識エリタデニンの白ネズミへのとりこみ  
 前報<sup>1)</sup>と同一組成の飼料 (無および含コレステロール食) とこれらにシイタケ粉末5%を加えた飼料で体重100g 前後のウィスター系雄白ネズミを1カ月間飼育したのち、1匹あたり <sup>14</sup>C-標識エリタデニン水溶液約 10

# 自動酸化油の毒性に関する研究 (第8報)

## 自動酸化油の毒性に及ぼすトコフェロールの効果

白 台 鴻\*・金 田 尚 志

東北大学農学部食糧化学科 (仙台市青葉区宮城町 1-1)  
\* 現住所: ソウル特別市城東区新氣洞山 8-2 海陽大学校農学部

### Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. VIII

#### Protective Effect of Tocopherols on Acute Toxicity Induced by Autoxidized Oils

Tai Hong PAIK and Takashi KANEDA  
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University (1-1 Tsutsumi-dori, Anamiyama-machi, Sendai)

In a previous paper<sup>1)</sup>, the acute and chronic toxicities on mice caused by autoxidized methyl linoleate were studied histopathologically. In that paper, we reported that the gross symptoms were observed in liver, lung and kidney. Especially, it was severe in small intestine. Marked symptoms were necrosis in fatty accumulation, and congestive hyperemia in tissues. This paper deals with the histopathological investigation of the protective effect of tocopherols (Toc) (*d-α*, *dl-α* and *d-γ*) on acute toxicity of autoxidized oils. Five diary oral doses 30 mg/20g mouse/d of *d-α*, *dl-α*, *d-γ* Toc and 60 mg/d of *dl-α* Toc were administered to male mice before the feeding of autoxidized methyl linoleate. Specimens of small intestine, liver, lung, and kidney were obtained from the dead and survived mice and microscopic examination was carried out. As the results, mice were protected from the acute toxicity of autoxidized oils by prefeeding of tocopherols. Survival time and survivor increased and symptoms induced by autoxidized oils in tissues decreased remarkably. *d-α* Toc showed better protective effect than other tocopherols, however, twice dose of *dl-α* Toc was the most effective among groups. The effect of tocopherols against mortality and symptoms was not parallel to their antioxidant actions. These results suggest that the protective effect of tocopherols is not only due to their antioxidative activity but also by their physiological actions.

1) *Eizo to Shokuryo*, 29, 85 (1976)

### 1 結 言

著者らは自動酸化油の毒性発現機構を究明するため過酸化油及びその二次酸化生成物をマウスに経口投与し、急性、慢性毒性時の小腸、肝、肺、じんなどの各組織における病理組織学的変化を検討した。<sup>1)</sup>最近、自動酸化油の毒性の予防や防弊にビタミンEが有効であることが明らかにされつつあるが、これらは生体組織 AOML-1: Autoxidized methyl linoleate contained hydroperoxides AOML-2: Autoxidized methyl linoleate contained secondary oxidation products

化学的研究が中心で、組織学的な研究はほとんど行われていない。すなわち、脂質過酸化物をマウスに与えた際、同時にトコフェロール (Toc) を与えると過酸化油の毒性が弱められるということはよく知られているが<sup>2)</sup>、病理学的変化については不明である。特に、二次酸化生成物を与えた場合、Toc の供与により毒性が認められるか否かは明らかではなく、その際の病理組織学的変化については全く知られていない。

そこで著者らは過酸化油及び二次酸化生成物を含むリノール酸メチルをマウスに経口投与した時の急性慢性による各組織障害に及ぼす各種 Toc 類の効果の青点、さ

らには病理組織学的変化に対する各種 Toc の効果の程度を検討したので報告する。

### 2 実 験

#### 2-1 試料の調製

試料は既報<sup>1)</sup>の通り調製した。すなわち、リノール酸メチルを 60°C で酸素を吹き込み自動酸化させた。25h 後 POV が最高値付近に達した時試料を採取し (AOML-1) さらに 90h 酸化させ、POV が最大値を過ぎ過酸化物の分解により二次酸化生成物が多く生成するようになったものを試料 (AOML-2) とした。これら 2 試料の特性は Table-1 の通りである。

Table-1 Characteristics of sample oils.

Sample oil	POV meq/kg	COV meq/kg	*MMW
**AOML-1	2981	765	415
AOML-2	884	2195	427

\* MMW: Mean molecular weight  
\*\* AOML: Autoxidized methyl linoleate

#### 2-2 動物実験

体重 20g 程度の DDI 系雄マウスを 1 群 5 匹ずつ用い、午前 9 時から午後 3 時まで、1 日 6h 絶食させる訓練を 5 日行い、*d-α*, *dl-α*, *d-γ* Toc をオレイン酸メチルに溶かし、20g マウス当たり 30 mg/d を 6h 絶食後 1 日 1 回 5 日連続経口投与した。また、*dl-α* Toc はその生理的効果を考え 20g マウス当たり 60 mg/d と 2 倍量を与えた群を設けた。6 日目、6h 絶食させたマウスに AOML-1 を 20g マウス当たり 0.5 ml、AOML-2 は 0.3 ml、1 回経口投与した。対照群には Toc 無添加のオレイン酸メチル及び AOML-1, 2 を同一条件で与えた。なお、飼料は固型飼料を用いた。実験は 2 回行ったが最初の実験 1 では試料投与 24h 後の体重、72h までの生存時間と死亡数を求めた。実験 2 では前実験同様

Table-2 Effect of orally administered tocopherols on body weight of mice following AOML-1 or AOML-2 intubation.

Group	Sub-group	Tocopherol dose mg/20g mouse/d use	Sample dose ml/20g mouse	No. of mice	Average of body weight at each time of oral administration of sample, h					Loss of body weight (%)
					0	5	10	24	24	
AOML-1	1	None	—	5	23.7	22.0	21.1	18.7	21.3	21.3
	2	<i>d-α</i> Toc	30	5	21.1	19.7	19.3	17.8	15.8	15.8
	3	<i>dl-α</i> Toc	30	5	22.6	21.1	20.4	18.3	19.2	19.2
	4	<i>d-γ</i> Toc	60	5	23.5	21.3	21.7	19.8	15.0	15.0
	5	<i>d-γ</i> Toc	30	5	21.6	20.0	19.2	18.4	19.5	19.5
AOML-2	1	None	—	5	21.3	20.3	19.7	18.2	14.4	14.4
	2	<i>d-α</i> Toc	30	5	22.6	22.0	21.7	19.8	12.0	12.0
	3	<i>dl-α</i> Toc	30	5	22.3	21.6	21.2	19.6	12.1	12.1
	4	<i>d-α</i> Toc	60	5	21.5	20.4	19.9	19.0	11.6	11.6
	5	<i>d-γ</i> Toc	30	5	21.9	21.2	20.5	19.2	12.3	12.3

Tocopherols were administered orally for 5d prior to oral AOML-1 and AOML-2 intubation.

に処理したマウスを死亡マウスは死亡直後、AOML-1 区は試料投与 20h 後、AOML-2 区は 10h 後全マウスを断頭と殺し小腸、肝、肺、じん、の各組織を採取し既報<sup>1)</sup>の通り標本を作成し、各 Toc の効果を病理組織学的に検索した。

### 3 結 果

3-1 各実験群の体重変化、死亡率及び肉質的観察  
実験 1: 試料投与 24h までの体重変化を Table-2 に示した。AOML-1, 2 区とも Toc 投与群と対照 (Toc 無添加) 群間に体重の差が認められた。すなわち、AOML-1 区においても対照群に比し 14.4% 減少に対し Toc 投与は 11.6~13.3% と対照群に比べ体重減少は少なくなつた。特に、両区とも *d-α* Toc と 2 倍量の *dl-α* Toc 投与群の体重の減少は少なかった。

試料投与 72h 後までの生存数をみると、Table-3 に示すように、AOML-1 区の対照群は試料投与後 25~30h に 5 匹中 4 匹が死亡したが、Toc 投与群では 30~48h まで生存時間は延長された。特に、*d-α* Toc と 2 倍量の *dl-α* Toc 投与群では生存時間の延長したマウスの数を増した。しかし、試料投与 48h 後まで生き残った群はいなかった。また、AOML-2 区に対照群は試料投与 30h までに全マウスが死亡したが、Toc 投与群はいずれも生存時間が延長し死亡数は減り、72h 後まで生き残ったマウスの数は *dl-α* Toc, *d-γ* Toc 投与群において 5 匹中 2 匹、*d-α* Toc と 2 倍量の *dl-α* Toc 投与群では 5 匹中 3 匹ずつあった。AOML-1, 2 両区とも対照群のマウスは急性毒性時の症状を示したが、Toc 投与群はいずれも症状が弱まり、行動は通常で外観的にも効果は認められた。AOML-2 区では一層明らかな効果は認められた。

実験 2: 各時間における生存マウスは Table-4 に示すように AOML-1 区に対照群は試料投与後 20h まで

Table-3 Effect of orally administered tocopherols on survival of mice following oral AOML-1 and AOML-2 intubation.

Table with 5 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose (mg/20g mouse/d), No. of mice, No. of death at each time after oral administration (10-35h), No. of survival after 72h.

Table-5 Histopathological observation in the small intestines treated with AOML-2 and tocopherols.

Table with 10 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose (mg/20g mouse/d), Status, Villi (Necrosis, Glanular degeneration), Fatty deposition (Epithelial cells, Tunica propria, Tela submucosae), Dilatation of lymphatic vessels, Degeneration of blood cells.

The degree of symptoms is roughly indicated by the number of + signs: - negative, 1 very weak, + weak, ++ moderate, +++ strong, / can't identify.

\*\* 上皮細胞の空泡化 \*\* 腸管壁が肥化 \*\* 壊死 \*\* リンパ管拡張 \*\* 血管拡張 \*\* 粘膜下組織 \*\* 血球変性



Fig-1 Jejunal in dead mouse fed AOML-2 as control with colliquative necrosis at the tip of jejunal villi. The severe injury is observed in the jejunums. (H-E stain, x100)



Fig-2 Jejunal in dead mouse fed d-alpha-Toc and AOML-2 with necrosis at the tip of jejunal villi. The degree of impairment in the jejunums is milder than that of control. (H-E stain, x100)

Table-6 Histopathological observation in the livers treated with AOML-2 and tocopherols.

Table with 10 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose (mg/20g mouse/d), Status, Nuclei of liver cells (Pyknosis, Appearance of binuclear cells, Irregularity in nuclear sizes, Appearance of large and giant nuclei, Disappearance of nuclei), Diffusional necrosis, Atrophy of the liver cells (Polysaccharide bodies, Glycogen deposition), Activation of reticular endothelial system, Sudan B black stain (Lipids, Fatty deposition).

Table-4 Effect of orally administered tocopherols on the acute toxicity of AOML-1 and AOML-2 in male mice.

Table with 5 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose (mg/20g mouse/d), Sample dose (ml/20g mouse), No. of survival after oral administration.

\* Tocopherols were administered as a dilution in the 30-60mg/0.1ml of methyl oleate orally at 120, 96, 72, 48 and 24 h prior to intubation of AOML-1 and AOML-2. \*\* The mice were killed at 20 h (AOML-1) and 10 h (AOML-2) after administration and used for histopathological investigation.

5匹中3匹が死亡したが、Toc投与群はいずれも1匹死亡したのみであった。AOML-2区では対照群は飲料投与10hまで5匹中4匹が死亡し1匹が生存したが、dl-alpha-Toc投与群では5匹中3匹、d-gamma-Toc投与群は4匹中2匹が生存した。とくに、d-alpha-Tocと2倍量のdl-alpha-Toc投与群では全マウスが生存した。すなわち、実験2においても実験1と同様にTocの効果は認められた。

3-2 病理組織学的所見
実験2の全マウスから採取した小腸、肝、脾、じん各組織に対する病理組織学的所見は次のとおりである。
1) 小腸: AOML-2区の小腸で認められた所見をTable-5に示した。対照群の死亡マウスと全Toc投与群の死亡マウスにはじゅう毛の先端部に壊死が認められた(Fig-1)。また、上皮細胞、粘膜固有層、粘膜下組織には脂肪の異常沈着がみられ、リンパ管、血管の拡張もみ...