

液にくらべ、いくぶんミトコンドリア数を減じる傾向にはあつたが、酸化物を添加したものよりもはるかに多数のミトコンドリアが残存した。この結果より考えらるるに不飽和脂肪酸中の過酸化物の示す毒性はミトコンドリア中の群衆系を破壊することがその一因とも想像される。この予題をより正確に証明するために、Wauburg 検圧計を用いて純不飽和酸及びその酸化物のミトコンドリアによる酸化程度を計ればよい。酸化が、装置がないために目下のところは行えない。結局不飽和脂肪酸中の過酸化物は、消化管を通過するが、あるいは消化管を通過して体内に吸収された過酸化物がそのまゝの形かまたは二次的に分解し、これ等のうちのどれかが組織や酵素系に作用して毒性を呈すると思われる。この問題については今後実験を続けるつもりである。

I. 実験の部

EXP. 1. 供試材料 高度不飽和脂肪酸エステル自動酸化物：第 8 及び 11 報において報告したと同様の方法により製した高度不飽和脂肪酸エステル・エステルをシャーレンに入れ、4 mm 程度の薄層とし、30°C の恒温器中に放置し自動酸化せしめた。

高度不飽和脂肪酸自動酸化物より過酸化物を除いたもの：上記高度不飽和脂肪酸自動酸化物にクロロフォルム：水 (1:2) 溶液 20 倍量を加え、供試エステルと同量の炭酸カリを投入し、CO<sub>2</sub> 中で加温し、遊離炭酸の大半を除き、残存する炭酸をチオ硫酸ソーダ液で除去した後充分水洗し、減圧のもとにクロロフォルムを除去した。得たる試料の性状は Table 1. の如くである。

Table 1. 高度不飽和脂肪酸自動酸化物及び過酸化物を除いたものの性状 Properties of autoxidized highly unsaturated fatty acids and peroxide liberated products of the acids

原高度不飽和脂肪酸 EthyI esters of original highly unsaturated acids	灰質価 I. V.	酸価 S. V.	過酸化物価 Peroxide V. (M.M./Kg.)	共轭過酸化物価 Conjugated acids (%) Diene, Triene, Tetratriene
同自動酸化物 Autoxidized esters of highly unsaturated acids	320.57	156.79	14	
過酸化物を除いたもの Peroxide liberated products of above acids	291.00	179.87	485	7.3
	301.04	170.64	33	7.25
				0.43
				4.63

動物試験結果：試験法は第 11 報と同様であり、得られた結果は Table 2 の如くである。

Table 2. 動物試験結果 Feeding records of peroxide liberated esters (Period; May 24 to June 11, 1954)

添加 (対照) None (Fat-free basal)	性別 Sex	承継 Brood series	体 Body weight (g.)		生存日数 Spane of mortality
			初時 Initial	18日間の増加量 Gained in 18 days	
高度不飽和脂肪酸自動酸化物 Autoxidized esters of highly unsaturated acids	♂	A	76	92	生存 16 日 Survived over 16 days
	♀	B	67	77	生存 10 日 Survived over 10 days
同過酸化物を除いたもの Peroxide liberated products of above acids	♂	A	72	72	死亡 7 日 Died on 7th day
	♀	B	71	61	死亡 4 日 Died on 4th day
同過酸化物を除いたもの Peroxide liberated products of above acids	♂	A	77	96	生存 19 日 Survived over 19 days
	♀	B	75	84	生存 13 日 Survived over 13 days
	♂			9	生存 9 日 Survived over 9 days

本結果によれば高度不飽和脂肪酸自動酸化物は従来と同様に猛毒を示し、白鼠は何れも 7 日以内に致死した。一方過酸化物を除いたものの毒性はより弱く、白鼠は死亡せず、しかも体重の増加がみられた。

Exp. 2. 高度不飽和脂肪酸自動酸化物中の過酸化物を除去する致死量：高度不飽和脂肪酸自動酸化物中の過酸化物の毒性の程度を知るためマウスを用いてその致死量を定めた。即ち体重 18 g のマウスに高度不飽和脂肪酸自動酸化物を 0.15~0.5 g の範囲で経口投与し、24 時間以内に死亡する状態を観察した。供試高度不飽和脂肪酸自動酸化物の過酸化物価は 448 M.M./Kg. 即ち試料 1 kg 中 14.336 g の Total peroxide oxygen を含む。

Table 3. 高度不飽和脂肪酸自動酸化物中の過酸化物をマウスに対する致死量 Lethal dose to mice of peroxide oxygen in autoxidized highly unsaturated fatty acids

用量 (Total peroxide oxygen mg.)	1.79	3.58	5.017	7.16
Total peroxide oxygen in samples fed to mice (mg.)				
死亡率	0/12	2/12	6/12	10/12

(対照として 6 匹のマウスに純高度不飽和脂肪酸エステル 0.5 g を投与したが、いずれも生存した)

本結果は 7.16 mg の Total peroxide oxygen を与えたものでも 2 匹生き残つてしまったため正確な致死量を求め得ない。しかしかりに 5.017 mg をとつて LD<sub>50</sub> を求めてみると LD<sub>50</sub> = 278 mg. Total peroxide oxygen/kg. となる。この値を過酸化ベンゾイルの致死量とくらべてみると、もしも過酸化ベンゾイルの示す毒性がその過酸化物中の過酸化物の方が倍近くも有毒ということになる。

Exp. 3. 不飽和脂肪酸自動酸化物を投与した白鼠の肝臓及び筋肉中の過酸化物量：不飽和脂肪酸自動酸化物中の過酸化物が示す毒性の本態を突きとめる一手段として、肝臓及び筋肉中の過酸化物量を測定した。即ち高度不飽和脂肪酸自動酸化物及びマニトール脂肪酸自動酸化物をそれぞれ 0.5 g 白鼠に投与し、致死す前となつた時これを屠殺し、ただちに肝臓及び筋肉を脱水乾燥し、エーテル抽出により粗脂肪を分離し、過酸化物量を定めた。その結果は Table 4. の如くである。

Table 4. 不飽和脂肪酸自動酸化物を投与した白鼠の肝臓及び筋肉中の過酸化物量 Peroxide value of oils separated from liver and meat of rats fed with autoxidized unsaturated fatty acids

試料	供試油の過酸化物価 Peroxide value of sample oil (M.M./Kg.)	過酸化物価 Peroxide value (M.M./Kg.)
無添加 None (Fat-free basal)	—	3
オレイン酸エステル (対照) Ethyl ester of oleic acid (control)	0	2
原高度不飽和脂肪酸自動酸化物 Original ester of highly unsaturated acids	40	14
同自動酸化物 Autoxidized product of above acids	1405	57
マニトール脂肪酸自動酸化物 Slightly autoxidized ester of liquid acids of linseed oil	409	20
マニトール脂肪酸自動酸化物 Autoxidized ester of liquid acids of linseed oil	3170	89

\* LD<sub>50</sub> = 50% 致死量

本結果によれば、基本飼料のみで飼育したもの及び純オレイン酸エチルを投与したものは、過酸化脂質が低かつたが、高度不飽和脂肪酸及びアマニ油液性過酸化脂質は餌料の過酸化脂質が高くなるにつれ、投与鼠の肝臓及び筋肉中の過酸化脂質も高くなること認められた。

Exp 4. 高度不飽和脂肪酸を投与し死亡寸前となつたマウスの肝臓のカタラーゼ作用力: Exp 1 に使用した高度不飽和脂肪酸を 18-20g のマウスに 1 匹当り 0.5g 投与し死亡寸前となつたものを屠殺し Euler, Josephson 法の自酸化法を用いて Kat.f. を求めたところ Table 5 の如き結果を得た。

Table 5. マウス肝臓カタラーゼの比作用力

Kat. f. of mice liver	
Type of fat fed	Kat. f.
高度不飽和脂肪酸自酸化物 Autoxidized highly unsaturated acids	238.4
無添加 (対照) None (Fat-free basal)	233.0
	257.1
	230.2
	227.9

本結果を見るに対照として用いた無添加健康マウスと供試群との間にはカタラーゼについてはほとんど差異が認められなかつた。

Exp 5. 白鼠肝臓より分離したミトコンドリアに対する高度不飽和脂肪酸の影響: 1 日絶食せしめてグリコーゲンを減少させた白鼠の肝臓 (6g) に 5% の 0.25M 蔗糖溶液を加えホモゲナイズし、遠心法によりミトコンドリアを分離した。本液 25c.c. をとり、これに高度不飽和脂肪酸エチル・エステル (過酸化脂質 530) 1 滴を加えよく振盪しヤナスグリーン B 1/15000 溶液を用いて超生体染色を行い、検鏡した。また残りのミトコンドリア蔗糖溶液に Lea の方法により前記脂肪酸から過酸化脂質を除いたもの 1 滴を加え、同様処理した。その結果は Fig. 1 に示す如く、過酸化脂質をふくむものはかなりミトコンドリアの数が少なくなること認められた。一方過酸化脂質を除いたものはそれほど減らず、さかんにプラクソン運動を行っているのが認められた。

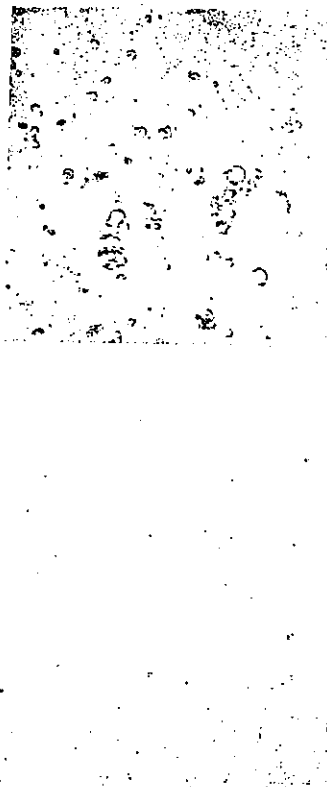
なお高度不飽和脂肪酸を投与した白鼠の肝臓各部組織は Fig. 2 の如くである。

IV. 考 察

以上の結果から考察するに、第 11 報に報じたアマニ油液性過酸化脂質の場合と同様高度不飽和脂肪酸投与物中に生ずるものも有様な成分は過酸化脂質であることがわかる。即ち、本結果及び 11 報の結果をもとにして考へると、不飽和脂肪酸は過酸化脂質を含有する脂肪酸の段階において有毒である。この過酸化脂質が白鼠に与える害作用は消化器をはじめその他内臓器官に直接作用する面と、体内に吸収された過酸化脂質がそのまゝの形で二次的に分解した形で解毒系に働き、その作用を停止せしめるのではないかと思われる。即ち、本研究の第 8 報で報じたごとく、不飽和脂肪酸が脂肪した白鼠の肝臓、四肢等の毛に脱毛し、さらに肝門のまわりは炎症を起し、不飽和脂肪酸投与物に産した組織は犯されている。また Exp. 3 で認めたごとく過酸化脂質はそのまゝの形でかなり肝臓及び筋肉にまでも蓄積される。この過酸化脂質が肝臓中のミトコンドリアを減少させたように各種の解毒系に働き、解毒作用を促進あるいは停止せしめることは当然予想される。

IV. 結 語

高度不飽和脂肪酸の示す害作用の本態を追究し、次の結果を得た。  
(1) 第 11 報に報じたアマニ油液性過酸化脂質の示す毒害と同様、高度不飽和脂肪酸の毒性は主として脂肪酸中に生成した過酸化脂質に由来することを確認した。



I 高度不飽和脂肪酸を添加した肝臓ミトコンドリア  
Fig. 1. Photographs show the mitochondria of rats' liver treated with Janus green B: autoxidized highly unsaturated fatty acids were added for I, the peroxidase liberated products of the acids were added for II. (x 400)

(ついでにもハートキシリン・ニヒタ: 染色)



I 高度不飽和脂肪酸を投与し死亡寸前となつた白鼠の肝臓



I 同 腎 臓

Fig. 2. I, II. a, b. c. show the tissues of rats in which the retardant action is reduced

- (2) この過酸化物のマウスに対する致死量は大概 278 mg. Total peroxide oxygen/Kg. (L.D<sub>50</sub>)である。
- (3) 白鼠に経口投与した不飽和酸メチル自酸化物中の過酸化物は、かなり肝臓及び筋肉中に見出される。
- (4) 白鼠肝臓より分離したミトコンドリアに高度不飽和酸自酸化物を少量加えると、ミトコンドリアは急激に減少する。
- (5) 東大生理学教室高橋、宇敷両氏の所見によれば高度不飽和酸を投与して死亡寸前となった白鼠の腎臓の細胞管は拡張し、小腸の粘膜には細胞脱落が認められた。
- (6) 以上の結果からして、高度不飽和酸自酸化物中の過酸化物の示す毒性は、直接体組織を死すと共に酵素系をも破壊するようと思われる。

本研究を行うにあたり、有益な御助言を賜った食糧研究所長尾崎博士、終始御指導を賜った東秀雄博士、白鼠内臓組織を検討していただいた東大生理学教室高橋守、宇敷真の両氏、動物試験に尽力された荒井君枝氏に厚く謝意を表す。

#### 文 献

- (1) 金田, 石井; 日本公誌 19, 171 (1954)
- (2) 金田, 石井, 石井; 日本公誌 20, 50 (1954)
- (3) P. Debouloz, J. Fondarai and C. Lagarde; Biochem. et Biophys. Acta 3, 371 (1949)
- (4) 大森, 岡; 薬物致死彙報 P 211 (1953)
- (5) 白川; 農化 24, 125 (1951) 25, 166 (1951)
- (6) W. C. Schneider; J. Biol. Chem. 176, 259 (1948)

脂質の栄養価に関する研究—XI.  
 高度不飽和脂肪酸の栄養価及び毒性について (2)

金田尚志・櫻井秀恵・石井清之助  
 (東海区水産研究所)

Studies on the Nutritive Value of Lipids—X.  
 Nutritive Value or Toxicity of Highly Unsaturated Fatty Acids (2)  
 Takashi KANEDA, Hisae SAKURAI and Scinosuke ISHII

In the previous paper we have established that the nutritive value of highly unsaturated fatty acids is not much lower than that of oleic acid, and that long-believed toxicity of highly unsaturated acids is not produced by the acids themselves but actually by formation of autoxidized matters.

The observation led us to an assumption that natural unsaturated fatty acids around Cas even if different in the autoxidation degree, would always become less nutritious by some autoxidation.

The assumption was confirmed by examining the toxic effect on rats of the autoxidized product which was prepared from the ethyl ester of liquid acids of linseed oil, as the rats were all died in a few days after the feedings.

On the basis of these findings our efforts have been extended to throwing light on the nature of the toxic product of the above description. The methods used for and the result obtained from the present test are as follows:

- (1) The autoxidized products were prepared by leaving the original ethyl ester of liquid acids of linseed oil, about 3mm. deep in basin, open to atmospheric oxygen under 30°C., 50 hours.
- (2) As shown in Table 1, the autoxidized products are fractionated by urea adduct formation, and the nutritive or retarding effects of each fraction are examined.
- (3) Fraction 1 separated from the autoxidized products (consist mainly of un-oxidized esters) does not give any retarding actions to the rats, however, fraction 2 and 3 which do not form urea adducts show the toxic effects on the animals (Table 5). From these results it is apparent that aldehydes have no harmful effect upon the rats.
- (4) On the other hand, polymerized highly unsaturated fatty acids which contain small proportion of peroxide show the nutritive effects to the rats (Table 6) and no retarding effects are noticed.
- (5) Judging from these results, the toxic effects which yield from the autoxidized acids should certainly be attributable mainly to production of peroxide-structure.

In order to prove this assumption, we liberated the peroxide of autoxidized products by I. a. s. Peroxide-determination method. In consequence, peroxide liberated products became "not-toxic" (Table 7).

On the basis of this result we have come to conclusion that the most toxic structure in autoxidized unsaturated fatty acids is peroxide which has been produced at the beginning of autoxidation.

\* Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries Vol. 19, 171, 1953

一 緒 言

筆者等は本研究の第8報<sup>\*</sup>において、乾菜油等とされていく高度不飽和脂肪酸は飼料を十分に消化し、さよもも毒性を示さぬことを認め、さらに従来信じられていた高度不飽和脂肪酸は高度不飽和脂肪酸そのものではなく、寧ろ高度不飽和脂肪酸の自酸化生成物であることも明らかとなった。この結果は高度不飽和脂肪酸よりかはかきらず、不飽和脂肪酸の自酸化生成物についていえるのではないかと考え、アマニ油液体アセチル・エステルを用い、第8報に報じた方法と同様に動物試験を行ったところ、果して全く同一の結果を得た。これ等の結果をもとにして考えると、不飽和脂肪酸は二重結合数を増やすにつれ、酸化をうけ易くなることは当然だが、酸化されにくい不飽和脂肪酸のうち、毒性を示すものはみな毒性を有するよう思われる。そこで不飽和脂肪酸の自酸化により生ずる酸化生成物のうち、毒性を示すものを分離し、その構造を究明しようとした。

この際筆者等は不飽和脂肪酸の自酸化により生ずるとされる過酸化物質、共轭酸、重合物、アルデヒド、ケトン等の全部が同程度の毒性を示すのではなく、これ等のうちの特定のものが特に強い毒性を示し、その他のものは無毒か、ないしは弱い毒性しか示さぬだろうと予想した。

この考え方を証明するため、上記自酸化生成物を未だ分離し、そのおのれについて動物試験を行うこととした。不飽和脂肪酸を自酸化させる場合、酸度の自酸化においては、もとの不飽和脂肪酸も変化することなく、不飽和脂肪酸の第8報<sup>\*</sup>においても、こうした状態の時の毒性が最も強いことを認めている。

不飽和脂肪酸の自酸化生成物の濃縮法としては従来種々の報告があるが最近のものを見れば、まづ Privat<sup>1)</sup>等、Skellysolve F とアルコールを用いて酸化生成物の分離を行い、Chang<sup>2)</sup>等は Skellysolve F とエーテルの混合比を変えて分別している。また Zilch<sup>3)</sup>、Fugger<sup>4)</sup>、Cannon<sup>5)</sup>、Privet<sup>6)</sup>等は向流分配法による分離を試み、Auberton、Hildrich<sup>7)</sup>等はシリカゲルを用いるクロマトグラフにより分離を行った。更に数年前、原薬添加物による分離が Carravaz<sup>8)</sup>、Coleman<sup>9)</sup>、Daniel Swern<sup>10)</sup>、等により報告されている。

そこで筆者等もこれらの方法を用いて、自酸化生成物の分離を試みた。即ちまづ Privat<sup>6)</sup>等の行った方法に準じ、石油エーテルと 85% 酒精を用いて、自酸化生成物の大部分はアルコールに可溶となるが多少は石油エーテル可溶部にも残る。また動物試験により毒性の程度を調べると両者とも自酸化に対し有毒であった。つまりこの方法は不飽和脂肪酸の自酸化生成物を濃縮し、その性質を調べるためには有効だが、筆者等の置む完全な無毒な部分の分離には役立たぬことになる。そこで Ahterton、Hildrich<sup>7)</sup>等の行ったシリカゲルによるクロマトグラフ法を用いたところ、本法もシリカゲルに吸着された部分に有毒成分が入りこむ目的を達し得なかつた。但しこれを要しアルミナを用いてクロマトを行うと、アルミナに吸着された部分に全く無毒となる。しかしアルミナ層より吸着物を完全に溶出せしめることはかなり困難で各種溶剤を用いても完全に回収し得ず、しかも処理の途中において、試料は更に酸化をうける恐れが多分によつた。

そこで原薬添加物による分離を試みたところ、自酸化せしめたアマニ油液体アセチルエステルのうち 75% は原薬添加物を作り、動物試験の結果は全く無毒であつたから、原薬添加物を作らぬ部分に強い毒性を示した。原薬添加物を作つた部分は未酸化アマニ油液体アセチルエステル及び比較的低分子の重合体及びアルデヒド等を含有したが、過酸化物質は僅かである。一方原薬添加物を作りぬ部分はアルデヒドは僅かしか存在せぬが、過酸化物質は高し、また共轭酸量も多い。更に分子量も前者に比し、マゝ大きい。

これらの結果よりしてアルデヒドははたいたいして毒性を有せず、毒性の本態は、同質を有する脂肪酸、ラクト

なら原薬附加物は尿素を飽和した冷メタノールで十分蒸餾した。(洗液は Fr. 4 とす)  
 これら各区分の百分数は Table 2 の通りである。(過酸化物の定数は Lea の方法<sup>1)</sup>, 共脱酸は Am. Oil  
 Chem. Soc. Official and tentative method; Cf 7-46) によつて算出した。

Table 1. 原薬附加物によるアーマー油液特種自酸化物の分離  
 Diagram showing scope of fractionation of a noxidized liquid acids  
 of linseed oil by urea adduct formation

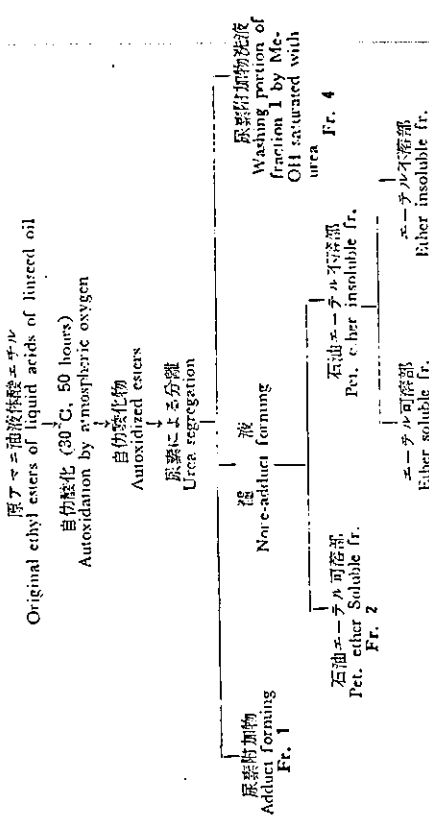


Table 2. アーマー油自酸化物尿素処理各区分の性状  
 Analysis of the samples used in the experiments

試料油 Sample ester	得率 Yield (%)	過酸化値 Acid Value	過酸化値 Iodine Value (a. e.)	分子重 Mol. Wt.	クライス Kraus Test	共脱酸 Conjugated acids (%)
						Diene Triene Tetraene
アーマー油液特種エチル Original ethyl ester of liquid acids of linseed oil	—	0	176.01100.23	—	—	4.97 0
同 自 酸 化 物 Autoxidized esters of above acids	—	6.47104.85137.45	818	—	⊕	6.07 0.08 0
第 1 区 分 Fraction 1	74.9	3.50177.30143.44	66	331	⊕	1.01 0
第 2 区 分 Fraction 2	6.1	14.86213.20116.43	2432	352	⊕	30.15 0 0
第 3 区 分 Fraction 3	11.9	3.83242.97 77.53	3170	354	⊕	17.63 0.69
第 4 区 分 Fraction 4	3.7	—231.43106.31	2.05	—	—	—
(Total 56.6)						

ン、重合物、共脱酸、過酸化物ということになる。ところで不飽和物の重合する場合、低温と高温とでは重合物の性質が異なり、低温の場合には過酸化物量は高くなるが、高温の場合、過酸化物量は低くなることを見出し、Hidlich<sup>2)</sup> 等によつて認められている。筆者等の実験においても同様の結果が得られている。

高度不飽和酸を高温で重合せしめ、沃養油を下げたものを用い、動物試験を行つてみると、毒性は全く現れず、白鼠はよく成長する。この結果からして過酸化物を含んだ高度不飽和酸の重合物は無害であることがわかる。また共脱二重結合を有する化合物には毒性を呈するものがあることが古くから知られている。筆者等の扱つた不飽和酸低濃度生成物は6%程度の共脱酸を含み、これは白鼠1日投与量としては0.03gに当る。試みに同油を用いて共脱酸をこの5%程度白鼠に与えてみるとほとんど毒性は現れぬ。このことから共脱酸は不飽和酸自酸化生成物の示す毒性の主な原因とは考えられぬ。

以上の結果よりして、不飽和酸低濃度生成物中に含まれるものも毒性の強い部分は例證を有する膠粒體がラクトンあるいは過酸化物に由来するを得ない。

即ち自酸化生成物中原薬附加物を作らぬ部分の分子重をラクトン法により測定すると、原則的に多少分子重を増すにもかかわらず、その酸化度は大きくなり、アルコロール性毒性カリにより切斷されやすいような形の側鎖、あるいはラクトン分子中に含むことを認める。そこでこうした化合物の毒性の有無はほとんどおき、酸化生成物の母体の本質を過酸化物として実験を進めてみた。

即ち過酸化物が主なる毒性を示すとすれば、自酸化生成物が過酸化物を除いたものの毒性は益々弱く、あるいはごく微弱となるはずである。そこで過酸化物定量の際と同方法を用い、沃養油を酸化生成物に加え、過酸化物を除き、その毒性を調べたところ、予想の如く毒性は問題とならぬほど強まり白鼠は致死しない。(但し白鼠は多少下痢をおこした)。

以上の結果から、不飽和酸低濃度生成物中最も毒性の強いものは過酸化物であることが認められた。残された側鎖は過酸化物が体内でいかなる働きをするために毒性を生ずるかということである。自酸化生成物を投与口投与する場合も過酸化物は白鼠の胃中において胃液のため H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生じ、それが毒性を呈することが考えられる。そこで自酸化生成物の胃液の酸濃度に等しい 0.7% HCl を加え、40°C の恒温槽に時々振盪し、2.5 時間隔で生ずる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の量を人工的に定着したところ、生ずる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量はせいぜい 0.4 mg 程度であった。またオキシドールをこの 10 倍量白鼠に投与してみたが全く毒性は認められなかつた。—フ/0.7% HCl 酸性に曝した酸化生成物の過酸化物量はあまり減少せず、これが体内に吸収されて毒性が考えられる。

事実 Dubonche<sup>3)</sup> 等によれば白鼠に投与した過酸化物は 1.5 時間後、消化管中に残るその半量が見出されている。なお東京医大松尾氏<sup>4)</sup> はワサギに不飽和酸自酸化生成物を投与すると、腸管の弾力がなくなつてしまうことを認めているが、これらの結果から考えると、腸管に過酸化生成物が通過あるいは過酸化物から二次的に生じたものが腸管をおかすたはらに毒性が生ずるとも考えられる。

II 実験の部

A 共脱アーマー油液特種エチル： 常法により製したアーマー油液各成分に5倍量のセレンを添加し、15°C に一夜放置し、析出する固体物を濾別し、アモトンを減圧で除いた後エチル・エタノールとし、更に沃養油に附加したものを石油エーテルに溶かし、アルミナを用いてクロマトグラフを行い、抽出物とした。エチル・エタノールを3mm 厚の厚さにシャーレに流し、30° 恒温器中に設置し自酸化せしめた。

本自酸化物 100 g をとり、これを原薬 700 g を蒸かした無水メタノール H に投入し、50°C でよく均質化せしめた後一度蒸し、原薬附加物を濾別した。(Fr. 1) 濾液は水を加えてメタノールを 85% まで稀釈し石油エーテルを用いて抽出をくりかたし石油エーテル可溶物を分別した。(Fr. 2)

石油エーテル可溶物を除いたメタノール液は更にエーテルを用いて抽出を行った。(Fr. 3)

Table 5. アーメ油液体酸自脂肪酸エステル試験結果  
Feeding records of autoxidized esters of linseed oil  
(Period: From March 16 to April 5, 1954)

Type of fat fed	系統 Brood series	性別 Sex	体重 Body weight (g)	生存日数 State of mortality
			試験開始時 Initial	死亡又は終了 Last day
アーメ油液体酸自脂肪酸 Autoxidized esters of linseed oil 6.5g	C	♀	49	死亡 on 4th day
	C	♀	41	死亡 on 3rd day
	A	♀	39	死亡 on 3rd day
第1区分 Fraction 1 0.4g	C	♀	46	生存 survived over 20 days
	C	♀	48	生存 survived over 20 days
	A	♀	51	生存 survived over 20 days
第2区分 Fraction 2 0.2g	C	♀	46	死亡 on 2nd day
	C	♀	39	死亡 on 2nd day
	A	♀	53	死亡 on 2nd day
第3区分 Fraction 3 0.2g	C	♀	48	死亡 on 2nd day
	C	♀	45	死亡 on 2nd day
	A	♀	52	死亡 on 2nd day

本結果を見るにアーメ油液体酸自脂肪酸は高度不飽和酸の時と同様の毒性を示し、白鼠は何れも死亡した。一脂肪酸中 75% を占める未変液体酸 (Fr. 2) は全く毒性を示さなかつた。また脂肪酸混合物を作らぬ Fr. 2, 3 は 1 日 1 回 0.2g の投与により何れも劇しい下痢症状を呈し、白鼠は 6 日以内に死亡した。  
Exp. 2. 高度不飽和脂肪酸エステル混合物の脂肪酸自脂肪酸生成物中の重合体の毒性の有無を調べた。以前記述エチル・エステルを用いて試験を行い、Table 6 の如き結果を得た。

Table 6. 高度不飽和脂肪酸エチル重合体の毒性試験結果  
Feeding record of polymerized ester of highly unsaturated acids  
(Period: April 16 to May 1, 1954)

Type of fat fed	性別 Sex	15日間の増加体重 Body weight gained in 15 days (g)	平均増加体重 Mean weight gained (g)
無 None (Fat-free basal)	♀	8	8
オレイン酸エチル (对照) Ethyl ester of oleic acid (control) 0.5g	♀	16	13
高度不飽和脂肪酸エチル Original ethyl ester of highly unsaturated acid 0.5g	♀	19	17.5
	♀	17	
	♀	16	
重合体 Polymerized ester of above acids 0.5g	♀	20	18.7
	♀	17	

本結果を見るに従来の試験で毒性を示した自脂肪酸と同程度まで脂肪酸を下げた高度不飽和脂肪酸エチル重合体は、さかも毒性を示さぬことを認めた。即ち本結果により多量分于量が増しても、過酸化化合物量の少ない不飽和脂肪酸エチル重合体は、さかも毒性を示さぬことを知った。  
さらに桐油を用い、脂肪酸の呈する毒性の程度を調べたが、アーメ油と桐油の自脂肪酸混合物中に含まれる程度では問題とするに足らぬことを知った。

本結果を見るに原薬添加物を作る区分 (Fr. 1) は過酸化化合物の含有少く、原アーメ油液体酸及びそれが多少重合したもので成るようと思はれる。また脂肪酸混合物を作る Fr. 2, 3 は多量の過酸化化合物を含む。二重合体の移動が速い共融性を含む。なお Fr. 3 はアルキドを含んでいない。  
高度不飽和脂肪酸エチル重合体: 第 3 区分において報じたと同様の方法により製した高度不飽和脂肪酸エチル重合体は石油エーテルに溶し、アルミナを用いてクロマトグラフを行って精製した。本エチル重合体に脂肪酸として酸性当量 2% を加え、120°C に 6 時間真空重合せしめた。得たる重合体の性状は次表の如くである。

Table 3. 高度不飽和脂肪酸エチル重合体の性状

性質	N <sup>o</sup>	元素分析 Elemental analysis	過酸化値 Peroxide Value (a. e./Kg)
オレイン酸エチル (对照) Ethyl ester of oleic acid (control)	1.4440	82.70	154.25
高度不飽和脂肪酸エチル Original ethyl ester of highly unsaturated acids	1.4846	348.79	158.14
重合体 Polymerized ester of above acids (120°, 6 hrs. in CO <sub>2</sub> )	1.4954	310.62	156.23

B 動物試験法: 白鼠を用い、大群第 8 群と同方法により試験を行った。即ち体重 70g 程度の白鼠に下記組成の基本飼料 1 日 9.5g を投与し、これに試料エチル重合体 0.5g、各区分は自脂肪酸混合物に含まれる量に等しい 0.2-0.4g を添加し、体重を測るとともに白鼠の状態を観察した。なお吉田等は高度不飽和脂肪酸の毒性は多量の脂肪を与えることにより消失すると述べているところから、試験の確実を期するため、脂肪を与えることは止め、各飼料成分の結晶を混合投与したが、とくにアラミンについては白鼠の最低必要量を投与することに留意した。

Table 4. 基本飼料組成  
Composition of diets

成分 Ingredient	量 Amount (%)	成分 Ingredient	量 Amount (mg/100gm diets)
Polished rice powder	83	Vitamin A (Iscopherol)	80 U.S.P.U
Casein (Lithar extracted)	10	Thiamine	3
		Riboflavin	0.125
		Pyridoxine	0.1
McCullum Salts mixture	3	Pantothenic acid	0.1
		Niacin	1.5
		Choline	100
Sample lipids	2-5	Inositol	200
		p-Aminofenzoic acid	0.5
		Vitamin B <sub>12</sub>	0.0015

C 動物試験結果:  
Exp 7. アーメ油液体酸自脂肪酸及び各区分を投与した結果は Table 5 の如くである。なお試料は少量なため Tween 85 の 5% 溶液に溶解せしめたものを用いた。



### 高度不飽和酸の栄養価といわゆる魚油毒の本態

Nutritive Value of highly unsaturated Fatty Acids and the Origin of Toxicity of Fish Oils

金田尚志 酒井壽恵 石井清之助  
(Takashi Kinoshita) (Hisao Sakai) (Seinosuke Ishii)

#### I. 緒言

従来の報告によれば、魚油中に含まれる高度不飽和酸は有害とされてきた。この結果は廣く一般に信じこまれ、魚油の栄養価が劣るのは、主として魚油中に含まれる高度不飽和酸のためとされた。

ところで、われわれは日常高度不飽和酸をふくむ魚類をさかんに食べているが、高度不飽和酸に起因する害作用をうけたという話をきいたことがない。

そこで、筆者等は新鮮な魚体内に存在するような高度不飽和酸は何ら毒性を示さず、魚體より分離した魚油中の高度不飽和酸が弱るは、主として有害となるのであると豫想した。即ち高度不飽和酸は空気にすすみやかに酸化される故。従来の報告は純粋な高度不飽和酸について動物試験を行っているつもりが、實は、自動酸化生成物の試験を行つてしまつたのではないかと考えた。某、筆者等は高度不飽和酸を褐色瓶に貯藏し、閉鎖のたみに炭酸ガスを注入し、強力酸化を防止した場合でも、かなり酸化が進むことをすでに認めている。

そこで純粋な高度不飽和酸は決して毒性を示さぬといふ豫想を証明するため、イワシ油よりソリドアセトン法を用いて分離した高度不飽和酸をエチルエステルとして石油エーテルに溶し、アルミナを用いてクロマトグラフ法を行い、出来るかぎり純品を作つた。この高度不飽和酸は製造時に一部自動酸化をうけて共酸化及び過酸化物等を生ずるが、これ等は殆んどクロマトにより除去得るのでかなり純粋と思われるものだけである。またこのことは炭素部の取除を調べた結果からも証明できる。

本試料をドライアイスを含めた凍法瓶中に貯藏しつつ白鼠に與へると、白鼠は全くいやがらずにより食下し、しかも優秀な成長を示した。

なおこの試験を行う際、従来の報告によれば、高度不飽和酸の毒性は多量の脂肪を與へることにより消失するといわれているところから、脂肪の影響をさけるため、ビタミン類は必ずしも結晶を用い、とくにフラベンチンについては、白鼠の最低必要量とされる程度を與へた。

以上の結果から従来の報告は、純粋の高度不飽和酸で

はなく、高度不飽和酸から二次的に變化したものを單独つていたうたが、か多分に生じた。

そこで、筆者等は所謂高度不飽和酸と高度不飽和酸自動酸化生成物とを考慮し、上記純高度不飽和酸を室温に放置し、自動酸化を行わせ、これを試料として動物試験を行つたところ、果して本自動酸化物は極めて烈しい毒性を示し、白鼠の口邊、四肢及び肛門のまわりの毛はいぢるしく脱毛し、いずれも死亡した。この試験の結果、従來信じられていた高度不飽和酸と高度不飽和酸そのものではなく、その自動酸化生成物であるらしいと思われたのだが、この結果は高度不飽和酸ばかりとは考えず、不飽和酸全部についていえるのではないかと考えた。つまり、不飽和酸は高度不飽和酸に属して、自動酸化をうける程度に差があるが、ある程度酸化されたものは、たとえ二重結合数が高度不飽和酸より少ない場合でも同様の毒性を呈するだろうと考へた。この考え方を證明するためアマモ油より分離した液體酸のエチル・エステルを用い、高度不飽和酸と同様に自動酸化せしめて動物試験を行つたところ、豫想したごとく酸化生成物と異なり、高度不飽和酸の場合と同様の症状を呈し、いずれも死亡した。

そこでつきにこれ等不飽和酸自動酸化生成物中に生ずる毒性の本態を探索せよと試みた。

不飽和酸を自動酸化させる場合、酸化があまり進んでおらぬ初期の段階では不飽和酸の全部が酸化物に變るわけではなく、もとの不飽和酸が未酸化のままかなり残っている。このようにならぬ程度に自動酸化生成物を分離する方法としては、いままでにいくつもの報告があるが、最近のもの分選してあげると、まずPrivett等は Skellysolve F とアルコールを用いて分選を行い、Chang<sup>1)</sup>等は Skellysolve F とエーテルとの混合比を變えて分選を試みている。また Atherton, Hilditch<sup>2)</sup>等はシリカゲルを用いるクロマトグラフにより分選を行い、更に數年來炭素附加物による分選法が Catravas<sup>3)</sup>, Coleman<sup>4)</sup>, Sverm<sup>5)</sup> 等により報告されている。この他

向流分選法による分選も行われている。

そこで筆者等もこれ等の方法を用いて、アマモ油液體自動酸化物の分選を試みた。すなわち、まず Privett 等の行つた方法に従ひ、石油エーテルと 85% 酒精を用いて分選を試みた。ところが酸化生成物の大部分はアルコールに可溶となるが多少は石油エーテル可溶部にも残る。また動物試験により毒性の程度を調べると兩者とも、白鼠に對し有毒であつた。つまり、この方法は不飽和酸自動酸化生成物を濃縮しその性質を調べには有効だが、筆者等の望む完全に無毒な部分の分離には役立たぬことになる。そこで Atherton, Hilditch 等の行つたシリカゲルを用いるクロマトを試みたが、シリカゲルに吸着される部分にも多少有毒成分が入りこみ、不成功に終つた。ただしシリカゲルの代りにアルミナを用いると無毒部分の分離は可能となる。ところがアルミナに吸着された有毒部分を完全に溶出せしめるのは困難で、各種の溶劑を用いても完全には回収できない。しかも處理の途中で試料がさらに酸化されてしまふ恐れが多分にあつた。

そこで炭素附加物による分選を試みたところ、試料の 75% は炭素附加物を作り、動物試験の結果は全く無毒であつた。一方附加物を作りぬ部分の毒性は極めて強く、白鼠は向れも死亡した。

炭素附加物を作る無毒部分は、未酸化不飽和酸及び比較的低分子の重合體、アルデヒド等を含むが酸化物及び共酸化物は僅かである。一方附加物を作る部分はアルデヒドの存在は僅かであるが酸化物量は高く、共酸化物を多く含み、分子重もやや大きい。この結果から、自動酸化生成物の一つであるアルデヒドはたいして毒性を示さず、毒性の本態は剛性を有する脂肪酸、ラクトン、重合物、共酸化、過酸化物ということになる。ところで不飽和酸が重合する場合、低温と高温とでは重合物の性質が異なり、低温の場合には過酸化物量は高く、高温ではあまり高くなりぬことが Hilditch<sup>2)</sup> 等によりすでに認められているし、筆者等も同様の結果を得ている。そこで高度不飽和酸を高温で重合させ、その炭素價を有する低溫自動酸化物と同程度まで下げ、動物試験を行つてみると、毒性は全く現れず、白鼠はよく成長する。この結果から過酸化物を含ませた重合體はたとえ分子重が増しても無毒なことがわかる。また炭素二重結合を有する化合物には有毒なもの知られていないが、筆者等の取致つた不飽和酸低溫酸化物も、自動酸化の結果、6% 程度の共酸化を生じている。これは白鼠 1 日 1 匹當り 0.03g の共酸化を與へることになるが、試みに精油を用い共酸化をこの 5 倍くらい與へてみたが白鼠に毒性はほとんど現れない。このことから共酸化は不飽和酸の主要因とは考えられぬことになる。

これ等の結果から、酸化生成物中に存する毒性の本態は剛性を有する脂肪酸ラクトン、あるいは過酸化物に歸せざるを得ない。草炭炭素附加物を作る部分には分子重が原脂肪より多少増大するにもかかわらず酸化價は大きくなり、アルコール性苛性カリにより切り易いようになりぬ。あるいはラクトン化合物を分子中に含むようと思われ。そこでこうした化合物の毒性の有無はひとまずおき、酸化生成物の毒の本態を過酸化物構造として實驗を進めてみた。即ちもしも過酸化物構造が毒性の主原因であるとすると、自動酸化生成物から過酸化物を除いたものは毒性が全くないか、あるいはごく微弱となるはずである。

そこで過酸化物定量の際と同一の方法を用い、炭酸カリを酸化生成物に加えて、過酸化物構造の大部分を除き、毒性の程度を調べたところ、豫想のごとく毒性は問題とならぬほど弱まり、白鼠には多少下痢はおこすものもいるが死せず長く生存した。

同様の試験を高度不飽和酸自動酸化物についても行つたが全く同様の結果が得られた。以上の結果から不飽和酸自動酸化物中最も毒性の強いものは過酸化物であることとを確認した。

またこの結果より、従來信じられていた不飽和酸は二重結合を増やすにつれ炭素價が低下するという考えには相當検討の餘地があるように思われた。つまり不飽和酸の間に見られる炭素價のちがいは實は純粋な不飽和酸そのものちがいがではなく、自動酸化をうけやすいか否かという點に起因するところもあるように考えられる。

なお筆者等は不飽和酸自動酸化物中に生ずる過酸化物のマウスに對する致死量 (LD<sub>50</sub>) を求めたところマウス 1kg に對し Total Peroxide Oxygen として大略 278mg 程度で供試マウスの半数を死亡せしめることを知つた。ただしオレイン酸エチル自動酸化物の場合は高度不飽和酸と同一量の過酸化物を投與すると烈しいセボレヤ症候を呈するが、死にかたは少く、供試マウスの半数を死亡せしめるには高度不飽和酸の約 1.5 倍量の過酸化物を必要とした。

またオレイン酸自動酸化物より尿素を用いて酸化物のみを分離したもので、20g のマウスに、0.2g の試料 (過酸化物含量 6mg) を 2 日連續投與すると 6 匹中 4 匹が死亡した。

このオレイン酸は酸化がかなり進んだ段階でも二重結合は消失せず、過酸化物價のみが增大している。即ちオレイン酸酸化物の毒性については高度不飽和酸やアマモ油液體酸化物と同一に論じられぬ點もあるように思へる。

さて發された問題は不飽和酸自動酸化物中の過酸化物



がどのような作用を認め、また白鼠に反応を興えるかといふことである。この問題を探索する第1手段として、東大醫學部病室野矢野、宇野氏にお願ひし、自動酸化物を興え、野矢野氏となつた白鼠をつかひ、その内臓各部組織の切片をこしらへてもらつた。その結果野矢野氏等の所見によれば、腎臓は腫脹と皮質との境界部附近で細尿管が高度に拡張し、また小腸の組織に細胞変質を認められている。

また筆者等は白鼠肝臓よりサツカロウズ溶液を用いて、沈法によりミトコンドリアを分離し、本溶液に高度不飽和酸自動酸化物を1滴滴下し、振盪したところ、ミトコンドリアは急速にその数を減少することを認めた。

肝臓中のミトコンドリアには Tri-carboxylic acid cycle の酵素系が結合してゐるとされるが、もしも上記のごとき反応が生体内においても行われるものとすれば、脂肪酸の代謝は完全に進行できないことになり、當然毒性を呈すると考へられる。

また不飽和酸自動酸化物を投與した白鼠の肝臓及び筋肉油中にはかなりの過酸化物が蓄積されることを認めた。即ち以上の結果をまとめて考へると、脂肪酸の自動酸化物中に存在する過酸化物が直該白鼠の消化管を犯すか、あるいは消化管を通じて体内に吸収された過酸化物が、そのままの形か、または二次的に分解し、これ等のうちのどれかが組織や酵素系に作用して毒性を呈すると思われ。

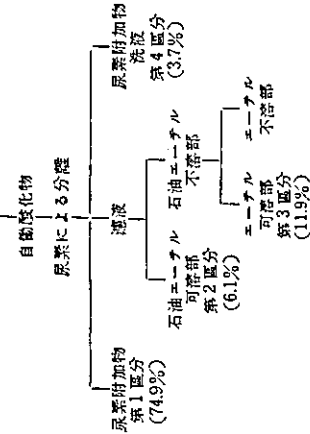
この問題については今後も試験を續けるつもりである。

## II. 實 験 の 部

### 實驗 1:

A. 供試品: 高度不飽和酸エチル・エステル: 従来高度不飽和酸の製法としては Bromination による方法が廣く行われてゐるが、この方法は異性體を生じやすく、製した高度不飽和酸が魚肝油に含まれる場合とは異つてしまふので採用できない。そこでソーダアセトン法を繰返し試料を作つた。すなわち、マイワシから蒸留してイソ油を採取したものを出発油とし、本油より常法により製した混合脂肪酸に10倍量のアセトンを加へ、-15°C に一夜放置し、析出する固體酸を濾別し、ソーダアセトン法を2回繰返しアセトンは炭酸ガスを吹

第 1 表 原薬附加物によるアーマー油液體酸自動酸化物の分離  
原アーマー油液體酸エチル自動酸化 (30°C, 50 時間)



メタノールを85%まで稀釋し、石油エーテルを用いて抽出をくりかえし、石油エーテル可溶物を分つた(第2區分)。第2區分を除いたメタノール溶液はさらにエーテルで抽出を行つた(第3區分)。なお原薬附加物は尿素飽和冷メタノールで十分沈澱した。(沈澱液は第4區分とす。( ) 内は得量)

第2表に示すごとく第1區分は過酸化物及び共軛酸含量少く、原アーマー油液體酸及びそれが多少重合したものであり成ると思われる。第2~3區分は多量の過酸化物を含み、二重結合の移動に伴ひ共軛酸を多く生じてゐる。なお第3區分はアルデヒドを含んでおらぬ。

オレイン酸エチル: アパキ油より得た混合脂肪酸より精製アルコール法により固體酸を分つた後エチル・エステルとし、これを真空蒸溜に附した。

B. 動物試験法: 體重 80g 程度の白鼠に脂質を除いた第3表の如き基本飼料 1日1匹當り 9.5g を投與し、體重ほぼ恒量となつた時試料エチル 0.5g を添加し、以

後大略 30 日間の體重増加を測定するとともに白鼠の状態を観察した。なお吉田氏は高度不飽和酸の毒性は多量の酵母を興えることによつて消失すると述べているところから、酵母は使わず、各種ビタミン類の結晶を混合投與した。この際とくにフラビンについては白鼠の最感必

第 3 表 飼 料 組 成

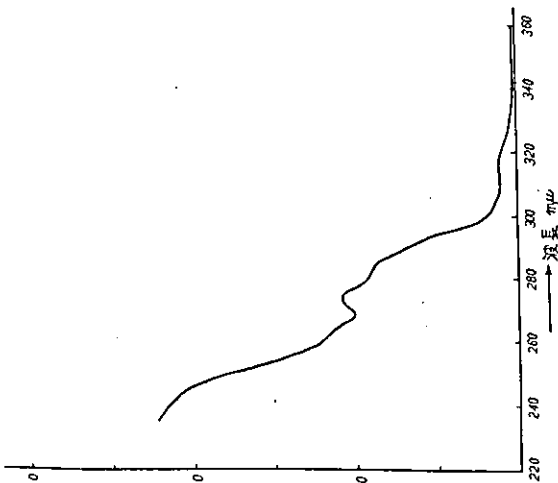
%	ビタミン類	飼料 100g 中の mg
精製白米粉 83	ビタミン A	80 (U.S.P.U)
脂肪カゼイン 10	トコフェロール	3
マ氏鹽 3	チアミン	0.125
供試油 2-5	リボフラビン	0.1
	ビロキシン	0.1
	パントテン酸	1
	ニコチン酸	1.5
	コリン	100
	イノシトール	200
	P-アミノ安息香酸	0.5
	ビタミン B <sub>12</sub>	0.0015

第 4 表 純高度不飽和酸エチル投與結果 (δ)

供 試 油	10月1日~11月10日 (1954)		同平均 (g)
	開始時	終了時	
無 添 加	102	115	13
	116	135	19
オレイン酸エチル (對照)	109	147	38
	85	112	27
	110	150	40
高 度 不 飽 和 酸 乙 基 酯	107	143	36
	116	143	27
	105	132	27

第 2 表 供 試 エ チ ル の 一 般 性 状

No.	試 料	試 料 價 値 (M.M./kg.)	過 酸 化 物 價 値 (%)	
			デ イ エ ン	ト リ エ ン
(I)	高 度 不 飽 和 酸 乙 基 酯	370.27	5	0
(II)	同 自 動 酸 化 物	255.74	4.97	—
(III)	アーマー油液體酸エチル	160.23	6.07	0
(IV)	同 自 動 酸 化 物	137.45	1.01	—
(V)	同 第 1 區 分 (原薬附加物)	143.44	30.15	0
(VI)	同 第 2 區 分	116.43	17.63	—
(VII)	同 第 3 區 分	77.53	—	—
(VIII)	同 第 4 區 分	106.91	—	—
(IX)	オレイン酸エチル (對照)	82.70	—	—
(X)	パルミチン酸エチル (對照)	0	—	—



第 1 圖 高度不飽和酸エチル・エステル吸光曲線

酸化を防止した。また自動酸化物は上記精製エチルをシヤールに入れ、4mm 程度の薄層とし室温中に放置し酸化せしめた。

アーマー油液體酸エチル: 常法により製したアーマー油混合酸にアセトンを加へ、上記同様に處理して固體酸を除いたのち、エチルエステルとし、同様クロマトグラフを行つた。

アーマー油液體酸エチルの自動酸化物: 前記アーマー油液體酸エチルをシヤールに入れ、30°C の恒温器中に放置し、自動酸化せしめた。またこの酸化生成物 40g をとり、これを原薬 700g を溶かした無水メタノール II 中に投入し 50°C でよく均質化させた後、一夜放置し、原薬附加物を濾別した(第1表第1區分)。濾液は水を加へ



第9表 過酸化物を除いたアマニ油液酸自動酸化物の性状

供試油	試油	液酸	酸化	物價	過酸化物價 (M.M./kg)
原アマニ油液酸自動酸化物	137.45	184.85	-	-	415
同過酸化物を除いたもの	136.28	-	-	-	45

第10表 動物試験結果

供試油	性別	試油開始時	死亡又は終了時	量 (g)	生存日数	
					3週間以上	生存
原アマニ油液酸自動酸化物 0.5g	♀	50	50	50	死亡 2日目	
	♂	61	61	61	死亡 3日目	
	♀	89	89	94	死亡 11日目	
同過酸化物を除いたもの 0.5g	♂	53	55	55	生存 3週間以上	
	♀	50	50	50	生存	
	♀	91	100	100	生存	

第11表 高度不飽和酸自動酸化物及び過酸化物を除いたものの性状

試油	液酸	物價	過酸化物價 (M.M./kg)	共 同 酸 度 (%)	
				アイニエン	トリエン、テトラエン
原高度不飽和酸	320.57	156.79	14		
同自動酸化物	291.00	179.87	485	7.3	0
同過酸化物を除いたもの	301.04	170.64	33	7.25	0.43
					4.63

第12表 動物試験結果

系 統	性別	開始時	終了時	量 (g)	生存日数	
					18日間における増加量	生存
添加 (対照)	♂	76	92	16	生存 18日以上	
	♀	67	77	10	生存	
高度不飽和酸自動酸化物	♂	72	72		死亡 7日目	
	♀	73	70		死亡 4日目	
	♀	71	61		死亡 3日目	
	♂	77	96	19	生存 18日以上	
同過酸化物を除いたもの	♀	71	84	13	生存	
	♂	75	84	9	生存	

第13表 高度不飽和酸自動酸化物のマウスに対する致死量 (LD<sub>50</sub>)

用 量 (Total Peroxide oxygen mg.)	1.79	3.58	5.017	7.16
死 亡 率	0/12	2/12	6/12	10/12

第14表 不飽和酸自動酸化物を授與した白鼠の肝油及び筋肉油中の過酸化物

供 試 油	供試油の過酸化物價 (M.M./kg)	肝 油	筋 肉 油
無 添 加	-	-	3
オレイン酸エチル (対照)	0	-	2
原高度不飽和酸エチル	40	-	14
同自動酸化物	1405	-	37
アマニ油液酸エチル酸自動酸化物	409	20	
アマニ油液酸エチル酸自動酸化物	3170	89	

知るためマウスをつかつかつてその致死量を究めた。即ち體重 18g のマウスに高度不飽和酸自動酸化物を 0.12~0.5g の範囲で経口授與し 24 時間以内に死亡する状態を観察した。その結果は第 13 表の如くである。

本結果は 7.16mg の Total Peroxide Oxygen を與えたものも 2 匹生き残つてしまつたため、正確な致死量を求め得ないが、かりに 5.17mg をとつて LD<sub>50</sub> (50% 致死量) を求めてみると LD<sub>50</sub>=278mg Total peroxide oxygen/kg. となる。

この値を過酸化ベンゾイルの致死量とくらべてみると、もしも過酸化ベンゾイルの示す毒性がその過酸化物構造のみに由来するものとするれば LD<sub>50</sub>=521 mg. Peroxide oxygen/kg. となり高度不飽和酸自動酸化物中の過酸化物の方が倍近くも有毒になることになる。

實驗 5. オレイン酸エチルエステル自動酸化物の毒性の程度:

高度不飽和酸及びアマニ油液酸自動酸化物の毒性が過酸化物構造に由来するところが、二重結合一オレイン酸についてもあてはまるかどうかを確かめるため、オレイン酸エチル自動酸化物をつくつた。即ち沃素 73.5 のオレイン酸エチルを濾紙上に塗布し、一晝夜室温に放置後、エーテルを用いて回収したところ過酸化物價 319 のものを得た。本試料を體重 20g のマウスに一匹あたり Total peroxide oxygen として 6mg を授與したところ、マウスは何れも烈しいセボレー症候を呈したが死亡数は 6 匹中 1 匹に止まつた。

そこでアマニ油液酸自動酸化物の場合と同様沃素附加物をつくり、未酸化オレイン酸を分別したところ、過酸化物價 1050、沃素價 71.47 のものが得られた。この試料を用いマウスにほぼ前記同様の過酸化物量にたたくと試料 0.2g を授與すると、多少下痢をおこしたが 6 匹のマウスは全部生存した。しかし翌日また同じ量と與えらるると 6 匹中 4 匹は死亡した。

即ちオレイン酸は自動酸化により二重結合を殆んど消去せぬ故に高度不飽和酸とは自動酸化の形式に相違があるようだがその毒性はかなり強いといえる。

實驗 6. 不飽和酸自動酸化物を授與した白鼠の肝臓及び筋肉中の過酸化物價:  
不飽和酸自動酸化物中の過酸化物價を示す毒性の本態を突きとめる一手段として、肝油及び筋肉油中の過酸化物價を測定した。即ち高度不飽和酸エチル及びアマニ油液酸エチルの自動酸化物をそれぞれ 0.5g 白鼠に授與し、犠牲寸前となつた時これを屠殺し、ただちに肝臓及び筋肉を脱水芒硝と混和し、エーテル抽出により粗脂肪を分離し過酸化物價を測定した。その結果は第 14 表の通りである。

本結果によれば基本飼料のみで飼育したもの及び純オレイン酸エチルを授與したものは過酸化物價が低かつたが高度不飽和酸及びアマニ油液酸自動酸化物授與群は試料の過酸化物價が高くなるにつれ、授與白鼠の肝油及び筋肉油の過酸化物價も高くなることを認めた。

實驗 7. 白鼠肝臓より分離したミトコンドリアに対する高度不飽和酸自動酸化物の影響:

1 日経食せしめてグリコーゲンを減少させた白鼠肝臓 (6g) に 5cc. の 0.25M 蔗糖溶液を加えてホモゲナイズした後濾材法によりミトコンドリアを分離した。本液 25cc. をとり、これに高度不飽和酸自動酸化物 (過酸化物價 530) 1 滴を加え、よく振盪し、ヤーヌスグリーン B を用いて超生體染色を行い検鏡した。また残りのミトコンドリア蔗糖溶液に Lea の方法により高度不飽和酸自動酸化物から過酸化物を除いたものを 1 滴加え、同様に処理した。

その結果過酸化物を含むものはかなりミトコンドリアの数が減少することを認めた。

III. 考 察

以上の結果から考察するに出来るだけ酸化を防止し純高度不飽和酸は栄養的に劣らぬことが認められ、さらに從來からいわれていることき多量の鮮母ないしフラビンが必要としない。ただし、高度不飽和酸自動酸化物は強弱を示し、従来信じられていた高度不飽和酸群はじつはこの酸化生成物にほかならぬと思われる。またこの結果

る。

従来のサ菌検査は人のサ菌症、とくにチフス性疾患患者からの菌の検出法をもとにして発達したものであるだけに、食品からの同菌の検出には不適當な点が多々あった。

食品中のサ菌数は一般に低いから、検出率を高めるためには多量の検体を培養に供することが重要である。

特に多数のサ菌が含有されていると考えられる検体の場合は増菌培養が必要である。増菌培養の種類は検体によって選択する必要がある。

分枝培養にさいしてはSS寒天培地のような選択性の強い培地を単独に使用することはさけ、ドリガルスキー培地やブレインハートイソフーゾン寒天培地などの非選択性培地の併用が好ましい。

分離平板上に生じたサ菌の疑いのある集落は、なるべく多数(5~10個)について確認培養に移す。培地は少なくともTSI培地、リジン脱炭酸試験培地の2種を用い、H<sub>2</sub>S産生およびlysine-decarboxylase産生の2点に重点を置く。この両者陽性のものはサルモネラまたはアリゾナと考えてよい。

血清型をきめるためにはA-E群のO血清、VI血清、および代表的なH血清10種を用いるが、これは市販品がある。

以上食品産生という面に重点を置いてサルモネラ菌について解説を試みたが、同菌について経験の浅い筆者にとつては、どのような書き方をしても従来の諸先輩の手になる文献以上のものは出来はずがなく、したがって多少なりとも御参考になれば幸いである。

# 油脂食品の変敗について

金田尚志\*

昨年、インスタントラーメンによる中毒が発生したが、その主原因はラーメン中に含まれる油脂の変敗によるとされた。この中毒事件以来、食品中にふくまれる油脂の変敗の問題がにわかに関心を集めてきた。そこで、食品中にふくまれる油脂の変敗について現在までに明らかになっている点を述べることにする。

## I 変敗油脂の毒性

変敗した油脂の栄養価が低いことは昔から知られていたが、その理由についてははつきりせず、変敗油は遊離酸を生ずるためこの遊離酸のカルボキシル基が毒だなどと考えられていた。

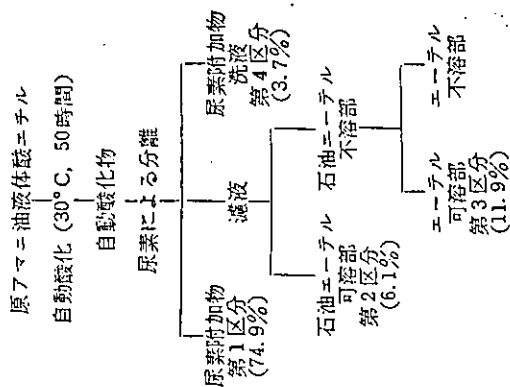
筆者は不飽和脂肪酸は酸化すると毒性を示すことを知り、その毒性の本態を追及した。すなわち、アマニ油の液体酸エチルを酸化させ、第1表のごとき方法により分別を行ない、いかなる成分が毒性を示すかを検討した。

第1表のごとく分別した各区分を、自動酸化物中にふくまれる量に応じ、0.2~0.4g シロネズミに与え、毒性の程度を比較したところ第3表のごとき結果を得た。

第3表の結果を見るに、アマニ油液体

酸自動酸化物は烈しい毒性を示し、シロネズミは1週間以内に死亡した。また尿酸附加物をつくらぬ第2、3区分は1日

第1表 尿酸附加物によるアマニ油液体酸自動酸化物の分離



\* 東北大学農学部食糧化学科教授

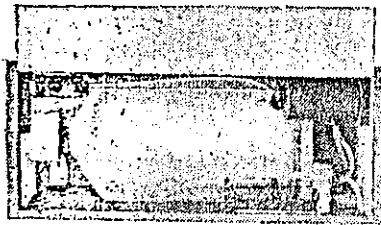
責任を以てお奨めできる

## 東管式消毒装置

- 特長
- ◎点滴は正確
  - ◎操作が簡単
  - ◎故障が無い
  - ◎価格は安い

用途 井戸水・簡易水道水など食品衛生面の殺菌消毒

種類 30ℓ入・20ℓ入・10ℓ入・5ℓ入



説明書運呈



### 東京理工器株式会社

東京都中央区銀座1の3 営業連絡所 東京都中央区西六丁目4-5  
 電話 (551) 1724・4724・6971 電話 麹地 (551) 3753番

第2表 供試エステル的一般性状

供試エステル	元素価	酸化価 (M.M./kg)	過酸化物質 (M.M./kg)		共 酸 (%)
			過酸化物質	トリエニトリエニトリアン	
アマニ油液体酸エチル	160.23	176.01	0	4.97	0
同 自動酸化物	137.45	184.85	409	6.07	0.08
同第1区分(尿素附加物)	143.44	177.30	33	1.01	0
同 第2区分	116.43	213.20	1216	30.15	0
同 第3区分	77.53	242.97	1585	17.63	0.60
同 第4区分	106.91	223.43	1203	—	—
オレイン酸エチル(対照)	82.70	184.25	0	—	—
ペルミチン酸エチル(対照)	0	196.20	0	—	—

第3表 アマニ油液体酸自動酸化物投与試験結果

供試エステル	系統	性別	体 重 (g)		生 存 日 数
			試験開始時	死亡又は終了時	
アマニ油液体酸 エチル自動酸化物 0.5g	C	♀	49	40	死亡 4日目
	C	♀	41	30	〃 3日目
	A	♀	39	44	〃 3日目
	A	♂	38	37	〃 7日目
同 第1区分 0.4g	C	♀	46	56	生存 20日以上
	C	♀	48	64	〃 20日 〃
	A	♂	51	79	〃 20日 〃
同 第2区分 0.2g	C	♀	46	46	死亡 2日目
	C	♀	39	39	〃 2日目
	A	♂	53	53	〃 2日目
同 第3区分 0.2g	C	♀	48	48	死亡 2日目
	C	♀	46	46	〃 2日目
	A	♀	43	43	〃 6日目
	A	♂	52	52	〃 2日目

1匹当り0.2gの投与にかかわらず自動酸化物と同様の症状を呈して死亡した。一方、酸化物中75%を占める未変化液体酸(第1区分)にはまったく毒性が現れなかった。

さらに筆者は不飽和酸の重合物の毒性は弱いこと、また自動酸化の結果生じた共役酸の毒性も少いことを認めた。こうした結果から、不飽和酸化物中もつとも毒性の強いものは過酸化物らし

第4表 過酸化物を除いたアマニ油液体酸自動酸化物の性状

	元素価	酸化価	過酸化物質 (M.M./kg)
原アマニ油液体酸自動酸化物	137.45	184.85	415
同過酸化物を除いたもの	136.28	—	45

という推定がなりたつた。そこで、アマニ油液体酸自動酸化物を過酸化物質と同方法により処理し、果して毒性が消失するかどうかを検討した。

すなわち、アマニ油液体酸自動酸化物にクロロフォルム：氷酢(1:2)混液20倍量を加え、供試エステルと同重量の沃度カリを投入し、CO<sub>2</sub>中で加温し、遊離ヨードを除き、残存するヨードをチオ硫酸ソーダで除去つたのち十分水洗し、減圧下にクロロフォルムを除去した。本試料の性状は第4表のごとくである。第4表の試料をシロネズミに与えたところ、第5表のごとき結果を得た。すなわち、過酸化物の大部分を除去したものの毒性はまったく薄れ、シロネズミは死亡しなかつた。本結果からして、不飽和酸化物のうち過酸化物の毒性がもつと

も強いことになる。

II 変敗油脂の毒性発生の経路  
変敗油脂を摂取した場合、どのような経路により毒性が発生するかについて、2, 3の予備的な試験を行なった。まず、変敗油脂を与えたネズミの肝臓およ

第5表 動物試験結果

供 試 油	性別	体 重 (g)		生 存 日 数
		試験開始時	死亡又は終了時	
原アマニ油液体酸自動酸化物 0.5g	♀	50	50	死亡 2日目
	♂	61	61	〃 3日目
	♀	89	94	〃 11日目
同 過酸化物を除いたもの 0.5g	♂	53	55	生存 3週間以上
	♀	50	50	〃 〃
	♀	91	100	〃 〃

第6表 不飽和酸自動酸化物を投与した白ネズミの肝油及び筋肉油中の過酸化物質

供試油	供試油の過酸化物質 (M.M./kg)		筋肉油
	肝油	筋油	
無添加	—	—	3
オレイン酸ニチル (対照)	0	—	2
原高不飽和酸ニチル	40	—	14
同 自動酸化物	1405	—	37
アマニ油液体酸ニチル 堅度自動酸化物	409	20	—
アマニ油液体酸ニチル 自動酸化物	3170	89	—

及び筋肉中に蓄積される過酸化物質の量を定置したところ第6表の如き結果を得た。第6表の結果によると、基本飼料だけで飼育したものおよび純オレイン酸ニチルを与えたものの過酸化物質は低かったが、高度不飽和酸ニチルおよびアマニ油液体酸ニチル酸化物を与えたものは試料の過酸化物質が高くなるにつれ、筋肉および肝中の過酸化物質も多くなった。すなわち、過酸化物質はシロネズミの作中に蓄積されることを認めた。

またシロネズミの肝より分離したミトコンドリアに不飽和酸ニチルおよび過酸化物質を加えたものをそれぞれ加えると、酸化物質を加えた際は著しくミトコンドリアの数が減少することを認めた。また酸敗油を与え、窒素寸前となつたネズミの腎臓は、髄質と皮質との境界部付近で細尿管が高度に拡張し、小腸の粘膜に細胞浸潤が認められた。

なお不飽和酸ニチルと同時、試料油の付着した口のまわり、四肢あるいは肛門附近の毛は抜けることを認めている。以上のよりなる点を総合して考えれば、過酸化物質の示す毒性はネズミの胃や腸の内

壁に直接作用し、組織を犯すとともに、肝中のミトコンドリアの数を減少させたように、ミトコンドリア中にふくまれる酵素およびその他の酵素を不活性化するためのようになっている。

「酸敗油の毒性が主として過酸化物質による」という筆者らの報告が出されて以来、過酸化物質の毒性に関する報告は多数出されるようになった。例えば Duboulog, S は酸化オレイン酸中の過酸化物質は徐々にタンパク質の SH 基を酸化するとし、また, Otholenghi らは紫外線照射により酸化したリノール酸およびリノレン酸のメチルニステルはシロネズミ肝中のミトコンドリアにふくまれる Succinoxidase 作用力を阻害すると述べている。Polling らは過酸化物質の高い純度油を与えたネズミの肝に肥大することを認め、Kaunitz らは腎、心の肥大も認めている。Audreus らは酸化大豆油は腸管のクサンチンオキシダーゼを不活性化するという。

Ⅱ 各種食品にふくまれる油脂の過酸化物質

第7表 各種食品にふくまれる油脂の性状

区分	食品名	水分 (%)	粗脂肪 (%)	粗脂肪の性状	
				酸価	過酸化物質 (M.E./kg)
ライオン類	即席ラーメン	9.5	15.4	4.1	74.0
	〃	11.0	13.1	3.3	65.5
果類	チーズクラツカー	6.8	34.3	3.1	49.3
	バターピーナツ	11.0	37.0	1.4	54.4
	〃	13.8	35.4	1.1	140.5
	ポテトチップス	5.1	41.9	1.7	74.8
子類	〃	6.1	39.7	2.2	100.6
	かりん糖	6.5	8.6	—	67.3
	〃	12.3	18.1	3.7	120.8
干物類	揚げせんべい	9.8	7.2	12.9	68.4
	アマロジ (開き)	57.4	6.0	5.9	121.1
	サンマ (開き)	41.1	16.9	13.6	151.3
	イワシ (丸干し)	54.8	16.1	7.6	149.7

れている。

POV の低いポ

テトチップスは米国製であり、酸敗してはいないかりん糖および揚げせんべいは有名メーカーの製品、他のポテトチップスおよびかりん糖は製造者が不明のものである。製造者が不明の製品に酸敗度がひどく、とくにかりん糖は異臭を帯びていた。

バターピーナツ、ポテトチップスなどは油の表面積が大きくなり、酸化を受けやすいから、油の酸化防止について製造者は十分留意する必要がある。

魚の干物は一見、油焼けをおこしていないような状態だったが、いずれも POVI は高かった。筆者は、干物の油の POVI は油焼けを生ずる以前に高くなることをかつて報告したが、この結果も同様であった。

油脂中に生成した過酸化物質は熱に対し

て不安定で、干物を焼くと過酸化物質はかなり減少するが、それにしてもこのような食品を摂取することには問題があり、継続摂取した際の毒性の詳細な研究、および毒性が認められた際は、なんらかの行政的処置をとる必要がある。

以上のほか油脂の酸化機構、酸化防止法などについて述べてい。なお、酸敗油に関する筆者の報告は下記の通りである。

日本水産学会誌 vol. 19 No. 3 (1953)  
 vol. 20 No. 1 (1954)  
 vol. 20 No. 7 (1954)  
 vol. 20 No. 7 (1954)  
 vol. 7 No. 4 (1954)  
 vol. 16 No. 3 (1953)  
 vol. 41 No. 3 (1954)  
 vol. 42 (1955)  
 栄養と食糧誌  
 欧生化学

付 過酸化物価定量法

(A) 過酸化物価 (その1)

(1) 定 義 規定の方法に基づき試料にヨウ化カリウムを加えた場合、遊離されるヨウ素をチオ硫酸ナトリウム溶液で標定し、試料1kgに対してミリ当量数で表わしたものをいふ。

(2) 適用範囲 油脂一般  
(3) 試 薬 炭酸ガス発生装置一組  
(4) 試 薬

(a) 酢酸 (JIS K 8355)  
(b) クロロホルム (JIS K 8322)  
(c) ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム (JIS K 8913) を水に飽和させたもの

(d) N/100 チオ硫酸ナトリウム溶液：

正確に力価を標定したもの

(e) 1% デンブンプン溶液

(5) 方 法 内容250ccの共せん三角フラスコにビベットを用いてクロロホルム 10cc をとり、これに清浄な乾燥炭酸ガスをとおして溶媒内および器内の空気を置換する。ついて炭酸ガスを通しながらフラスコに試料約1gを正確にはかり取り、しずかにふりまぜて試料を溶かす。この場合、試料は完全に透明に溶解するか、あるいはわずかにこる程度でなければならぬ。さらに試料溶液にビベットで水酢酸 15cc とヨウ化カリウム水溶液 1cc を加え、炭酸ガスをとめ、共せんをなし1分間ふりまぜた後そのまき暗処に5分間放置する。5分後共せんをあけて75ccの蒸溜水を加え、ふたたび共せんをし、はげしくふりまぜた後デンブンプン溶液を指示薬としてN/100チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し無色になる点をもつて滴定の終末点とする。なお本試験と並行して空試験を行なう。

$$\text{過酸化物価} = \frac{(A-B) \times F}{C} \times 10$$

ただし

A = 本試験のN/100チオ硫酸ナトリウム溶液使用量 (cc)  
B = 空試験のN/100チオ硫酸ナトリウム溶液使用量 (cc)  
F = N/100チオ硫酸ナトリウム溶液力価係数  
C = 試料採取量 (g)

備 考

① 本試験法は International Chemical Union (Meeting of International Commission on Fats and Oils, London, July 1947) の方法 (J. Am. Oil Chem. Soc., 26, 152(1949)) によるもので Lea 法の改良法である。Lea C. H., Proc. Roy. Soc., B 108, 175 (1931)

② 空試験の過酸化物価はなるべく小さいことが好ましい。また溶剤はすべて冷暗所に保存する。

③ デンブンプン溶液はヨウ素溶液にはじめから加えずに滴定の終末点の少し前まで加える。これは吸着によるヨウ素の損

失を避けるためである。なおデンブンプンがヨウ素によつて着色するかどうかは測定前に確認しておく。

④ 普通の市販の油は過酸化物価が1~10の範囲のものが多いので、試料の採取量は上に指示した量で充分であるが、精製直後の油のように特に過酸化物価の低いもの、あるいはある程度酸化の進んだ過酸化物含量の極端に大きい油ではその採取量を適当に増減するか、滴定に使用するチオ硫酸ナトリウム溶液の濃度をかえることが好ましい。

(B) 過酸化物価 (その2)

(1) 定 義 過酸化物価 (その1) と同じ

(2) 適用範囲 油脂一般

(3) 試 薬

(a) 酢酸 (JIS K 8355)  
(b) クロロホルム (JIS K 8322)  
(c) ヨウ化カリウム (JIS K 8913)：使用前にあらかじみ粉末にしておく。  
(d) N/100 チオ硫酸ナトリウム溶液：正確に力価を標定したもの。  
(e) 1% デンブンプン溶液

(4) 方 法 内容250ccの共せん三角フラスコに試料約1gを正確にはかり取り、これにクロロホルム 10cc をビベットを用いて加えずにふりまぜて試料を溶かす。この場合、試料は完全に溶解するか、あるいはわずかにこる程度でなければならぬ。さらに試料溶液にビベットで水酢酸 15cc とヨウ化カリウムの粉末 1±0.1g とを加え、逆流冷却器を付し湯浴上で加熱し溶媒が還流しはじめ

めてから正確に3分間沸騰をつづける。つぎに三角フラスコを流水中において急速に冷却し、これに蒸溜水 75cc を加え共せんをし、はげしくふりまぜた後デンブンプン溶液を指示薬としてN/100チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し無色になる点をもつて滴定の終末点とする。なお本試験と並行して空試験を行なう。

$$\text{過酸化物価} = \frac{(A-B) \times F}{C} \times 10$$

ただし

A = 本試験のN/100チオ硫酸ナトリウム溶液使用量 (cc)  
B = 空試験のN/100チオ硫酸ナトリウム溶液使用量 (cc)  
F = N/100チオ硫酸ナトリウム溶液力価係数  
C = 試料採取量 (g)

備 考

① 本試験法は International Chemical Union (Meeting of International Commission on Fats and Oils, London, July 1947) の方法 (J. Am. Oil Chem. Soc., 26, 152(1949)) によるもので Wheeler 法の改良法である。Wheeler D. H., Oil & Soap., 9, 89 (1932)

②③④ A. 過酸化物価 (その1) 備考②  
③④ 参照

⑤ (その1) に比しバラツキが多い。

⑥ いずれの方法によつたかを測定値に併記する。

解 説





Chem., 186, 763 (1950)  
 15) Berger, L., Stein, M. W., Colowick, S. P., Cori, C. F.: *J. Gen. Physiol.*, 29, 379 (1946)  
 16) 今本文男, 奥沢一男: 化学の領域, 増刊 20, 39 (1955)  
 17) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934)

18) 大石哲也: 生化学, 27, 653 (1956)  
 19) Nussajo, L., Minchilli, M.: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 74, 1839 (1941)  
 20) Price, J. M., Dodge, L. W.: *J. Biol. Chem.*, 223, 699 (1957)  
 (受付 1957. 10. 9)

〔原 著〕 魚油の毒性に関する研究 (V)  
 高度不飽和脂肪酸の酸化に関する 2, 3 の考察

松 尾 登\*

結 言

油脂の自動酸化はその工業的利用, 殊に食用油脂の貯蔵および包装材料において特に重要であるので, 食用油の酸敗, 塗料油の乾燥については古くから数多くの研究が行われている。

油脂の自動酸化はそのグリセリド内の不飽和結合が主として閉鎖する反応である。今までの研究においては, 動物性油脂そのものについて行われ, 天然油脂は多数の脂肪酸が混在するグリセリドなるため, 複雑な酸化反応機構を究明する試料としては不適當であり, 明確な結論がえられなかった。

近年にわたって, 自動酸化した油脂の生化学的作用についての関心が従来よりその方面の研究が進展するにいたったが, 一方構造の明らか不飽和脂肪酸およびそのエステルを用い, 新たな研究方法によって, その自動酸化機構がかなり深く明らかにされてきたので, 難解なる酸化油脂の生化学的意義に關しても, いよいよ新たな知見がえられつつある。

自動酸化した油脂はビタミンの作用を破壊し, 酵素的な作用を抑制するが<sup>1)</sup>, さらに高度不飽和脂肪酸の自動酸化物ははげしい毒性を示すことよりしても<sup>2)</sup>, またビタミン E が顕著なる抗酸化性を有することとの関連に<sup>3)</sup> おいても, 油脂の酸化とその毒性の問題は特に重要なりと考ふる。

著者は魚油より分離した高度不飽和脂肪酸の自動酸化物がはげしい毒性を示し, その毒性は酸化において生ずる過酸化物によることの詳細なる報告を行ったが, さらに高度不飽和脂肪酸の酸化によるヨウ素価の変化および過酸化物質の消長についてもすでに究明した<sup>4)</sup>。

イカ油から分離した高度不飽和脂肪酸をエチルエステルとし, これを用いて, 自動酸化物の毒性の研究に閉連

\* 武蔵大学化学教室, 東京医科大学生化学教室  
 Studies on the toxicity of fish oil (V).  
 By Noboru Matsuo (Chemical Department, Seikei University; Biochemical Department, Tokyo Medical College).

して行った下記のごとき実験結果について記述する。

高度不飽和脂肪酸 エチルエステルの, 1) 室温酸化における重量変化について, 2) 室温酸化における抗酸化剤の影響について, 3) 室温酸化における酸化促進剤的作用について (a. 酸化時における重量変化, b. 酸化時における過酸化物質の変化), 4) 自動酸化物の紫外線吸収スペクトルについて, 5) 自動酸化物の紫外線吸収スペクトルについて。

実 験

1) 高度不飽和脂肪酸エチルエステルの室温酸化における重量変化について

長期間の自動酸化による重量変化についての研究は外山氏の報告<sup>5)</sup>があるだけなので, 高度不飽和脂肪酸エチルエステルおよびそれに 2, 3 の抗酸化剤を添加したものの長期にわたる酸化による重量変化について実験を行った。應用した高度不飽和脂肪酸エチルエステルの性状は第 1 表のごとくである。

第 1 表

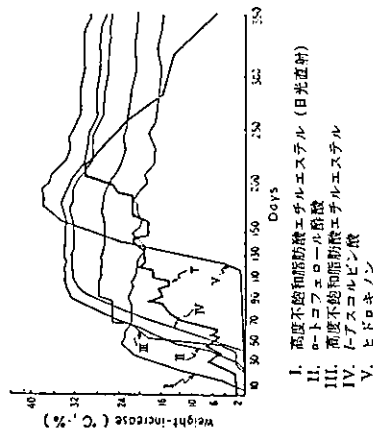
試 料	ヨウ素価 (Wits)	ケン化価	酸 価
1.4823	338.7	163.9	—

直徑 4.3 cm のシャーレ 5 コに, この高度不飽和脂肪酸エチルエステル各 5 g をとり, これにヒドロキノン, p-アスコルビン酸, o-トコフェロール酢酸, 10<sup>-4</sup> モルを添加し, 他の 2 コは対照とした。このシャーレを, セロファン膜を覆った木枠に納めて, 塵埃の入ることを防ぎ, 直射日光の当たらない場所におき (対照の中 1 コは日光に曝露した) 1 年間にわたって, 酸化による重量の変化を測定した。

シャーレの高度不飽和脂肪酸エチルエステルは, 重量測定の前後かくはんし, 酸化が進みエステルがペースト状になったものは, 1 日 1 回 ガラス棒でよくかくはんした。

試験結果は第 1 図の通りであり, 縦軸は日数を示し, 横軸は重量増加の % および温度を示す。曲線 I は室

第 1 図



温度の変化を示す曲線で、最低温度 2°C、最高温度は 31°C である。(実験開始は 1 月 15 日)

曲線 I は、高度不飽和脂肪酸のみを照射 (これは日光にさらしたもので、1 年間の曝露時間は、合計 700 時間に当る)。II は  $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加、III は高度不飽和脂肪酸のみを照射 (室内放置)。IV は  $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加、V はヒドロキノン添加を示す。

まず、日光照射を行った I の曲線についてみると、誘導期は 3 日余りであり、ただちに急激な重量増加があり、25 日くらいで粘度が高まり、30 日をすぎると次第に固化する。47 日には最高の重量増加、約 24% となり以後は少しずつ減少する。曲線の立ち上りの急な時期においては過酸化物の生成が急激に行われるが、次第にその分解が起り、揮発性物質の生成と重合が促進される。最高値に達した後は分解、重合の時期に相当する。

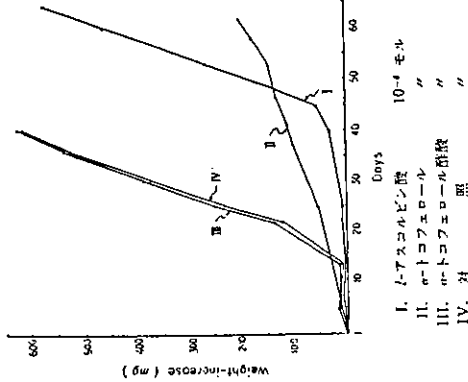
次に III の曲線、すなわち高度不飽和脂肪酸エチルエステルのみを室内に放置したものにおいては、その誘導期が 18 日位で曲線は上昇する。55 日目まで固化する。90 日ほどで重量増加の最高値に達する。曲線の変化については、大体 I と同様であるが、最高値は I の場合よりも高く、その後、80 日間はあまり重量変化がない。すなわち室内の場合には直射日光にさらしたものに比較して、揮発性物質の生成および範囲がごくゆるやかであるゆえと考えられる。

II は  $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加の場合であって誘導期は III のときと大体同様であり、最高値は 34% 重量増加量で、それ以後 90 日間はさしたる重量変化はなかった。

IV は  $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加の場合であって、この

(14)

第 2 図



曲線 I は  $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加、II は  $\alpha$ -トコフェロール添加の場合であって、40 日ごろまでは特に急激な重量増加がなく、いずれも抗酸化剤としての効果が良好であるのに対して、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸添加のもの (II) は、対照 (IV) とほとんど同様に、13 日目に急激な曲線の上昇を示している。

実験 1) および本実験の結果を合せ考察すると、抗酸化剤としての効果はヒドロキノンの最高であり、次に  $\alpha$ -トコフェロール、次に  $\alpha$ -トコフェロール酢酸であり、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸はさしたる効果を示さない。

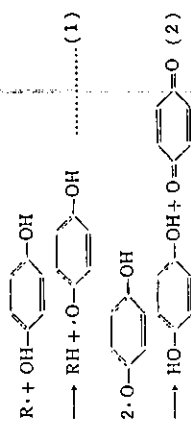
Ivanov らは、テトラリンおよびそのヒドロキシメチル誘導体の Hydroperoxide を生成して、それらにヒドロキノン、 $\alpha$ -ナフトールなどの抗酸化剤を作用させたところ、Hydroperoxide はこれらの抗酸化剤によってほとんど分解されないことを確認し、抗酸化剤の抗酸化作用は、それが Hydroperoxide を破壊することによるのではなく、抗酸化剤から水素原子が離脱して、基と結合することにより、連鎖反応を阻止するのであるとした。Switt ら<sup>10)</sup>もオレイン酸メチルヒドロペルオキシドと  $\alpha$ -トコフェロールとが反応しないことを認めている。

Bolland ら<sup>11)</sup>はさらにヒドロキノンの存在下におけるリノール酸エチルの自動酸化について、動力学的研究を行い、ヒドロキノンは R-基を反応点から排除することによって連鎖を断ち切るとした。

かくしてヒドロキノンはセスキノン基に変化するが、

第 29 卷 第 11 号

この基は不飽和脂肪酸の  $\alpha$ -メチレン基から水を奪うほどの反応性をもっておらず、その 2 分子が次式のように反応して 1 分子のキノンを生じ、未酸化のヒドロキノンが残っている間は自動酸化が抑制されるのであるとされている。



ヒドロキノンは非常によく、また  $\alpha$ -トコフェロールが効果を現わすのに対して、 $\alpha$ -トコフェロール酢酸がさしてきかないのは、ベンゼン核についた水酸基がふさがれていることにもよるのであると考えられる。

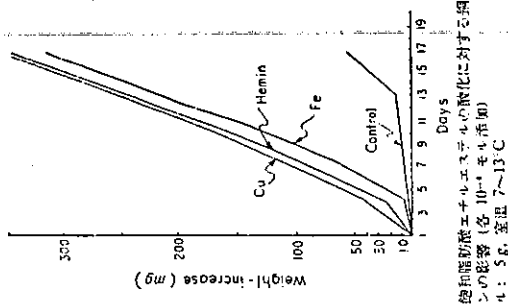
3) 高度不飽和脂肪酸エチルエステルの室温酸化における酸化促進剤の作用について

1) 酸化時における重量変化: 第 3 表のごとき性状の高度不飽和脂肪酸エチルエステルを用い、酸化促進剤の

第 3 表

試 料	ヨウ素価 (Wijs)	ケン化価	酸 価
1.4891	309.6	157.3	1.37

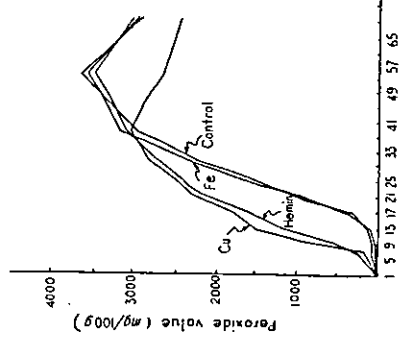
第 3 図



高度不飽和脂肪酸エチルエステルの酸化に対する銅、鉄、ヘミンの影響 (各 10<sup>-4</sup> モル添加)  
エステル: 5.6、室温 7~13°C

(15)

第 4 図



4) 高度不飽和脂肪酸エステル自動酸化物の赤外線吸収スペクトルについて  
 高度不飽和脂肪酸エステル自動酸化物の赤外線吸収スペクトルについて、最高値は 3000 mg/100g まで上昇し、曲線は下降している。初期においては、鉄粉末添加の場合、IV の対照として曲線は下降する。初期にあまり差がないが、30 日近くを経過した後、幾分の上昇を示している。  
 最高値の場合には、もつと対照との差が顕著に現われるのではないかと想像されるが、鉄

第 4 表

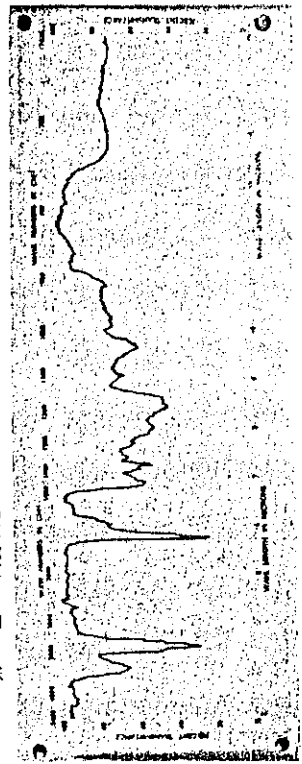
ヨウ素価 (Wijs)	ケン化価	酸価
1.4771	320.0	168.7

第 5 図 高度不飽和脂肪酸エステル(酸化前)赤外線吸収スペクトル



(16)

第 6 図 高度不飽和脂肪酸エステル赤外線吸収スペクトル



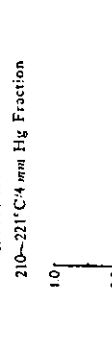
真型蒸留直後にとった赤外線吸収スペクトルは第 5 図のごとくであり、過酸化物質 2100 mg/100g まで酸化した後に撮ったものは第 6 図のごとくである。  
 以上の 2 つを比較すると酸化を受けていないものにおいては 3 μm における吸収が全然みられないが、酸化を受けたものにおいては Hydroperoxide 基、ヒドロキシ基の生成による 3 μm の吸収がやや弱かに認められる。3 μm における吸収によって過酸化物質の量も判断できるとする。その他の部分においては、2 つを比較するにき

したる変化はない。  
 5) 高度不飽和脂肪酸エステル自動酸化物の赤外線吸収スペクトルについて  
 この実験は第 5 表のごとき高度不飽和脂肪酸エステルとその他の酸化物について赤外線吸収スペクトルをとり比較検討した。  
 溶液はメチルアルコールを使用し、酸化を受けないものの曲線は第 7 図のごとくで、274 μm に弱い吸収が認められる。

第 5 表

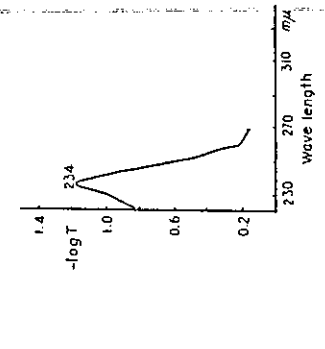
ヨウ素価 (Wijs)	ケン化価	不ケン化物 (%)	過酸化物質 (mg/100g)
320.6	139.8	Trace	0
215.5	249.2	Trace	1376

第 7 図 高度不飽和脂肪酸エステル(210-221°C 4 mm Hg Fraction)赤外線吸収スペクトル



この結果は、東海区水産研究所、金田技曹らの報告<sup>(1)</sup>と同様であった。  
 酸化したものにおいては第 8 図のごとく、234 μm に

第 8 図 高度不飽和脂肪酸エステル(酸化前)赤外線吸収スペクトル



(17)

2, 3 について行って行った実験結果を記述する。実験 1), 2) と同様な方法により、エステル 5g に対して、銅粉末、鉄粉末、ヘミンを 10<sup>-4</sup> モル添加し、その誘導期がどのように変化を受けるかをみた実験結果は第 3 図のごとくである。

この図は、横軸は日数を示し、縦軸は mg で示した重量増加である。実験開始後約 20 日間の状態を示したものである。実験中の室温は 7-13°C であって、15 mg の増加を示すまでに要する日数は、大体、銅においては 1 日余、ヘミンにおいては 3 日、鉄においては 4 日余である。酸化促進の作用は、銅、ヘミン、鉄ともに顕著で、17 日までは銅、ヘミン、鉄の順であるが、37 日目にはヘミン、鉄、銅の順となり、52 日目においてもヘミン、鉄、銅の順であった。

ii) 酸化初期における過酸化物質の変化: 直径 9.3 cm のシヤレーに高度不飽和脂肪酸エステル 20g を入れ、酸化促進剤 10<sup>-4</sup> モルを添加して日数の経過とともに過酸化物質の変化する状態を観察した。エステルは 3i) の実験に用いたものと同様であって、シヤレー中のエステルは、過酸化物質を測定するごとにガラス樽をもってよくかくはんした。室温 7-13°C。

第 4 図は横軸に日数、縦軸に過酸化物質 (mg/100g) をとった変化曲線であって、誘導期については、重量変化のときの結果と大体同様である。

曲線 I は、銅粉末添加の場合であって、最高値は 3000 mg/100g まで上昇し、曲線は下降している。

曲線 II のヘミン、III の鉄、IV の対照ともに大体 3500 mg/100g を最高値として曲線は下降する。初期においては、鉄粉末の触媒作用がさして現われず対照とあまり差がないが、30 日近くを経過した後、幾分の上昇を示している。

重量変化の場合に比較して考えれば、もつと対照との差が顕著に現われるのではないかと想像されるが、鉄

第2表 使用せる市販肝油の性状

ヨウ素価 (Wij's)	酸 価	ケン化価	過酸化物質 (mg/100g)
1.4741	0.53	181.0	0

せしめた。酸化肝油の性状は第3表に示す通りである。一般に、酸化による過酸化物質の変化は、はじめに誘導期があり、それを過ぎると直線的に急激に増加し、最大点に達し、以後は分解、重合によって次第に低下する。すでに報告したごとく、重合物は過酸化物質とはまた異なる特性を示すので、一応本実験においては重合物の影響が現われないように、過酸化物質が急激に増加しつつある状態における酸化物質、すなわち第3表に示すように1000 mg/100g以下程度のもを使用した。ヨウ素価は、117.8まで低下している。

第3表 酸化肝油の性状

ヨウ素価 (Wij's)	酸 価	ケン化価	過酸化物質 (mg/100g)
1.4777	1.12	190.9	775

白ネズミは、60~80%程度のもを用い、第4表のごとき基礎飼料に、10% 宛混合して、動物実験を行った。(イカ油から分離した高度不飽和脂肪酸をエチルエステルとなし、その酸化物を用いて行った実験)においては、口から注ぎ入れたが、本実験の場合は基礎飼料に混合投与した。

第4表 基礎飼料組成 (%)

チ ン 粉 (米粉)	75%
カゼイン (エーテル抽出処理)	9%
ソツカラム塩類混合物	3%
酵 母	3%

第1回はその成長曲線であって、総量は白ネズミの体重、順軸は日数を示す。酸化を受けておられない肝油を与えたものはよく成長しているが、酸化肝油を与えたものはほとんど発育しない。

実験日数は34日であるが、あるものにおいては、20g近い体重の減少を示し、大体重いずれも10g以上の減少を示している。さらに臭味を結けたならば、あるものは死したであろうと思われる。白ネズミは少しdirtyになったと思われる程度で外見上の変化は特に認められなかった。

部：油脂化学協会誌, 1, No. 2 (1952)  
 2) Holman, R. T.: *Archives Biochem.*, 26, (1950); 85, 21 (1949); Barnes, R. H., et al.: *Arch. Sci. Physiol.*, 2, 313, 326 (1948)  
 3) Bernheim, F., et al.: *Archives Biochem. Biophys.*, 38, 177 (1952); Ottolenghi, A., et al.: *Archives Biochem. Biophys.*, 56, 157 (1955)  
 4) Matsuo, N.: *J. Biochem.*, 41, 481 (1954)  
 5) 金田, 石井: 日本水産学会誌, 19, 171 (1953)  
 6) Matsuo, N.: *J. Biochem.*, 41, 647 (1954)  
 7) 外山: 日本化学会誌, 63, 1165 (1942)  
 8) 外山, 小野: 日本化学会誌, 65, 611 (1944)  
 9) 外山, 平林: 油脂化学協会誌, 3, 3, 113 (1954)  
 10) Swift, C., et al.: *Oil & Soap*, 23, 355 (1946)  
 11) Bollard, J., et al.: *Trans. Faraday Soc.*, 43, 201 (1947)  
 12) 金田, 酒井, 石井: 栄養と食糧, 7, 4 (1954)  
 13) Farmer, E. H.: *J. Chem. Soc.*, 541 (1943)  
 14) 浅田: 生化学, 24, 129 (1952) (要付 1957. 8. 14)

文 献

1) Holman, R. T.: Autoxidation of fats and related substances, Progress in the chemistry of fats and other lipids, Vol. 2, 51 (1954); Morris, S. G.: Recent studies on the mechanism of fat oxidation in its relation to rancidity. Agricultural and food chemistry, Vol. 2, 126 (1954); 石井義

極大吸収が現われる。これはジェン結合の生成にもとづくものであると考えられる<sup>1)</sup>。東邦医科大学、浅田氏<sup>2)</sup>はリノール酸をリボキシダーゼをもって酸化した場合に、やはりこの234 mμの吸収の現われることを報告し、この234 mμにおける吸収生成量をもって酵素活性度を現わすことを行っている。

本研究の要旨は、昭和22年3月第87回日本生化学会東京部会において発表した。終始御厚意な御指導を賜わった徳島大学長、児玉博士(先生)に衷心より感謝の意を述べる。なお東京医科大学化学教室において種々御配慮いただいた三高先生(先生)に厚くお礼申し上げる。スペクトルの測定については、東京大学理学部、水上市博士、東京大学総合試験所、田中基之氏(先生)のお世話になった。深謝の意を表す。あわせて発表に協力された香川敏博、畑中子阿君に感謝する。

魚 油 の 毒 性 に 関 す る 研 究 (VI)

酸化せる市販肝油の毒性について

松 尾 登\*

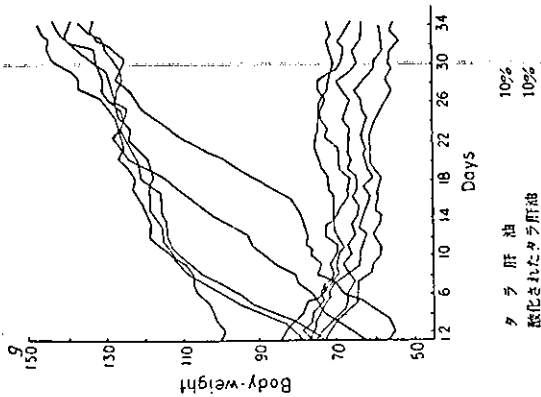
第1表 高度不飽和脂肪酸

分子式	名 称	二重結合の数	所 在
C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	ステアリン酸	4	イ ン 油
C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	アラヒドン酸	4	イ ン 油, クラジラ油
C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	イ ン 酸	5	イ ン 油
C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	ヒラガシラ酸	5	ヒラガシラ油
C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	シ ビ 酸	5	マ グ 油
C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	ニ シ ン 酸	6	イ ン 油
C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	マ グ 酸	6	マ グ 油

れた市販肝油(メガキ印)を使用した。これは第2表のごとき性状を有する淡黄色透明の液体である。

ヨウ素価は Wijis 法による値で 168.9、過酸化物質は含有しない。これをシャーベットに7:1、塩類、空気酸化

第1回 白ネズミの成長曲線



肝油中のビタミンA, Dは酸化によって、次第に破壊され減少してゆくが、このビタミンの破壊は、空気酸化による結果であって、このことも、酸化せる肝油の毒性の中に包括せしめたいと考える。新鮮な肝油から、A, Dを除いて実験は行っていないが、以上のような意味において新鮮な肝油混合の場合の成長曲線と酸化肝油混合の場合の成長曲線とを対比せしめたいと思う。過酸化物質による毒性は高度不飽和脂肪酸エチルエステル酸化物の場合を考へ合わせると、その作用が急激であって、単なるビタミンの問題ではないと考へられる。

次に、市販肝油中に含まれる高度不飽和脂肪酸を分離し、その分留状況を明らかにした。

第5表は、外山, 土屋氏のソード塩アセトン法により、肝油より高度不飽和脂肪酸を分離する方法を示す。

まず、肝油をケン化し、ソード塩となし、それにアセトンを加えて低温に一昼夜放置、飽和脂肪酸、低沸点不飽和脂肪酸のソード塩はアセトンに不溶解なので、これを濾過し、アセトンを除去するためにエーテルをもって洗滌し、ケン化物を除去するためにエーテル(HClを触媒とする)を、次にエチルアルコールと混合(HClを触媒とする)水浴上に加熱して、エチルエステルとなし、真空蒸留する。市販肝油100よりえられた各留分量は第5表に