

Fig-3 Changes in acid and peroxide values of waste oil during the exposure to the sun light.

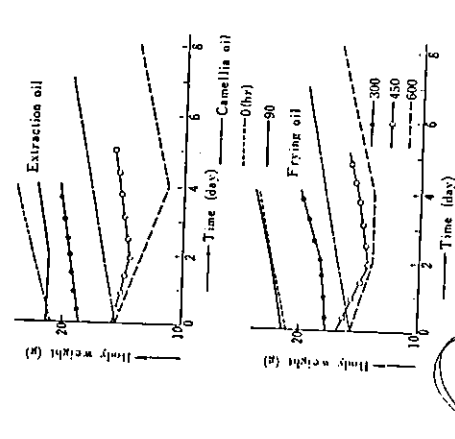


Fig-5 Changes in body weight of mice administered with the waste oil samples exposed to the sun light.

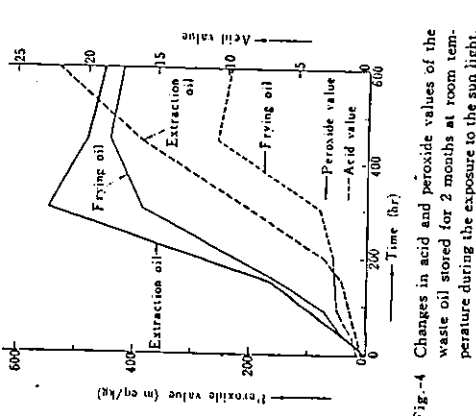


Fig-4 Changes in acid and peroxide values of the waste oil stored for 2 months at room temperature during the exposure to the sun light.

前者の方がはるかに高い値であった。なお、抽出油および抽出油は廃油使用群よりも高い値を示した。

3-2 マウスに対する急性毒性試験

3-2-1 廃油使用群
バックラマーメン抽出油および抽出油はともにバック光時間の経過に従って体重の減少および下痢などの諸症状を呈する急性毒性が認められた。

3-2-2 放置油使用群
対照のツバキ油使用群では一般に経口投与後、2-3hrで軟便を排せつしはじめ、これが数時間継続し、その後被毛粗剛などの症状はみられず、食欲もまったく異常が認められなかった。また抽出油および抽出油の両者はバック光時間の0-300hrまではツバキ油使用群とまったく同

ではさらにその激しさを増した。症状は下痢が数日経る、体重の減少、被毛粗剛、および歩行異常などが観察され、7日ごろから漸次回復を示したが、中にはへい死するものもみられた。本毒性も諸種の症状からみて抽出油よりも抽出油の方が強いようであった。

3-2-3 剖検および組織学的所見
剖検では毒性を示した原因油および抽出油との間では、主病変には大きな差は認められなかったが、対照群に比べ明らかに変化が認められた。おもな病変は腸管にみられ、小腸は全層にわたって内コウは拡張し、内容物は水様性でかなり多量に認められた。また腸壁の肥厚はまったくなく、灰白色で発赤も認められなかった。大腸では重層が拡張しており、とくに結腸から下部は内コウの拡張が認められた。内容物は水様性でふん塊の形成が不充分であった。

組織学的な腸病変としては、血管の充血、内コウにおける粘膜のはく離上成数の増大および粘性成分の増加の現象、つまりカタル性腸炎が認められた。小腸の粘膜上皮はシュエ大し、胞体内に空胞がみられ、核が淡明かつシュエ大し、ときには核の破壊像も認められた。また上皮細胞の変性は軽微のみならず、セン毛は短く、水シテが認められた。他方、大腸では上皮細胞の杯細胞化が著しく、粘膜炎による明らかな結核反応を呈した。また内コウの拡張したものでは筋層に軽度の変性がみられ、小腸病変と同様にカタル性腸炎像が観察された。

4 考 察

今回の実験において、一般にバック光時間の経過とともに過酸化物質および酸価は上昇し、さらに酸化が進行すると過酸化物質は下降しはじめるが、酸価は必ずしも各試料とも同一ではなく、引き続き上昇するもの、またそれとは逆に下降する傾向を示すものがあることを確認した。また、過酸化物質の最高値は565(廃油群・抽出油群)、酸価の最高値は22(放置油群・抽出油群)であったが、前報¹⁾の正常油を使用した実験結果と同様に抽出油よりも抽出油の方が高い値を示した。そのほか、とくに酸価において抽出油が抽出油に比して異常に高い値を示したことは、メソノ類との共存に原因するものではないかと推定されるが、その機構についてはなお不明であり、今後検討すべき課題である。また過酸化物質が最高値に達するまでのバック光時間の相違は、酸価の新鋭性に関係するとはいってもないが、これに加えてバック光条件、たとえば夏期と冬期における日射強度の違いによっても大きく左右されると思われる。

バック光のマウスに対する急性毒性は過酸化物質

の上升に比例して現われるが、さらに酸化が進み過酸化物質が下降するに伴って、その毒性は強くなる傾向を認めた。この種の毒性の本体については、すでに多くの報告があり、松尾²⁾、金田³⁾らは過酸化物質がその本体であることを認めている。一方Kaunitz⁴⁾らは過酸化物質の加熱分解産物の方がより高い毒性を示すと報告し、過酸化物質の毒性について否定的見解をとっている。われわれの今回の実験結果も前に述べたように、過酸化物質が下降した段階の方が毒性が強く現われたことからKaunitz⁴⁾らの見解と同様に過酸化物質の二次的分解産物が本毒性に大きく関与しているのではないかと考えている。

これらの毒性は外観的には下痢、被毛粗剛、体重の減少、歩行異常などの症状を呈し、また剖検、組織学的所見では急性カタル性腸炎像が認められるなど前報の報告および実験異常像の、インスタン・スバググティ⁵⁾やバク光した正常ラマーメン⁶⁾とほとんど同一の症状や所見が観察され、過酸化物質および酸価においても同様の傾向を示したことから考えて、過酸化物質の激しい下痢を伴うこの種の急性中毒事例の毒性物質も、本実験により得られたものに類似した生成物と考えられる。

以上の結果から、めん類中に含まれる油脂の質により、このように毒性を示す変質油脂の生成が原因と考えられるので、めん類の製造時に用いる油脂は品質の良いものを使用すべきであることはいままでもないが、製品の保蔵条件によっても品質の劣化が誘起される可能性が高いといえるので、この点についても深く考慮しなければならないと思う。

また、とくに揚げ油よりも、めん類中に含まれている油の方が毒性が強いことから、めん類中に含まれている原料成分との協同作用により一層毒性が増強される可能性も大いに考えられる。

一般に油脂を多量に含む食品については、製造および製品管理に充分留意することが、この種の食中毒を防ぐ一つの重要な点であることを強調したい。

(昭和44年3月20日受理)

文 献

- 1) 三浦 武彦, 伊野, 高木, 食衛誌, 7, 67 (1966)
- 2) 三浦 俊野, 宮木, 油化学, 11, 9 (1967)
- 3) N. Matsuo, J. Biochem., 41, 481 (1954)
- 4) T. Kaneda, H. Sakurai, S. Ishii, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 20, 50 (1954)
- 5) T. Kaneda, H. Sakai, S. Ishii, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 20, 658 (1954)
- 6) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, J. Am. Oil Chemists' Soc., 33, 630 (1956)
- 7) H. Kaunitz, Food Technology, 21, 278 (1967)

油脂含有食品の酸化変性に関する研究 Studies of Oxidizing Denaturation of Fat Contained in the Food

即席ラーメンの光線と温度による影響について
Effects of Light and Temperature on the "Instant Lamen"

(昭和44年7月24日受理)

日下兵衛* 深沢輝* 松尾登*
(Hyozi Kusaka) (Akira Fukazawa) (Noboru Matsuo)

Preservation of commercial "instant lamen" has been studied from a practical point of view with special regard to oxidizing denaturation. "Instant lamen" was wrapped with color cellophane (red or green) as filter and then was exposed to sunlight and fluorescent lamp. The peroxide value of fat that was extracted with ether from the sample was measured at regular time intervals.

Consideration of the transmittance of the color cellophane in ultraviolet and visible regions and of the relative energy of sunlight and the fluorescent lamp showed that 450~550m μ and ultraviolet region near 385 m μ had considerable influence on the denaturation of the lamen. The denaturation of the lamen was also carried out about the influence of various temperatures (room temp., 30, 40 and 50°C) under sealed condition in a paste-board box—that is, in the same condition as in that of transportation and storage.

As the result, in the case of the room temperature and 30°C, the fat extracted did not show any great change of the peroxide value. Under conditions of 40 and 50°C, however, the peroxide value gradually increased. As above mentioned, it has been found out that no matter how high the surrounding temperature may be, for instance, during the summer season, if the light of 450~550 m μ of visible portion and ultraviolet region near 385 m μ are eliminated the preservation of the "instant lamen" under vacuum, is possible without oxidizing denaturation over a period of a month.

緒言

近年大衆食品として普及している即席ラーメンの品質に関し種々の問題がおきている。即席ラーメンは大部分が油揚げ処理されていることから品質面での問題は脂質の変性にもとづく製品の劣化がそのほとんどであると考えられる。

市販即席ラーメンの脂質の酸化程度を調査した(山下)の報告によると、ラーメン中の脂質含量は14~26%の範囲にあり、これらの過酸化物質は大部分が10me/kg以下であったが、あきらかに不良品と判断しうるものは過酸化物質、酸化とも非常に高く、過酸化物質の濃度を示したものは50-1me/kgの市販品もあつたと報告されている。

* 成城大学工学部

たと述べている。

渡辺¹⁾はフィルム包装における光線の影響に関して、大豆油をスポンジに吸収させ、7種類のフィルムで食料原料したものについて光線による変性を調べた結果、385m μ の紫外線はいずれのフィルムにおいても直射日光、赤外線も過酸化物質にして約3倍の変性を与えることを示し、250m μ の紫外線ではほとんど影響はなかつたと報告している。また同報告によると、真空包装の場合は紫外線の透過率を考慮するよりも、包装フィルムの酸素透過率の方がより考慮されるべきであり、非酸化酸素量が高い場合は紫外線の透過性が問題となると言及している。これらのごとく食品中に含有する脂質の変性に関する研究は数多くなされているが、著者はより実地的な場合を想定して、市販即席揚げめんの保存条件を検討するため、色セロハンのフィルム効果を自然光線下と白色蛍光灯線下による影響と、さらに温度による変性を、主に過酸化物質をその指標として同時に測定した結果について報告する。

実験

1. 光による影響とフィルム効果

(1) 実験に供した試料はM社製の即席ラーメンであつて、同一製造過程のもので製造直後のものを直接工場より購入して使用した。これはスープ部分は粉末として別添されているので実験の対象より除外した。サンプルはすべて販売時と同様に包装されたままの状態での保存実験を行なった。原料よりエーテル抽出した油脂をケン化、酸分解、メチルエステルとしたものについてGLC分析を行なった結果の脂肪酸組成を表1に示す。

表1 ラーメン抽出油脂の脂肪酸組成

成分	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
含有量						
%	3.7	29	8.5	4.5	45.1	9.3

(2) 太陽光線下におけるフィルム効果

試料即席ラーメンを二階層面の風雨を避け得る場所に日光が均等に照射されるように配列し、これらの半分に赤色セロハンを、他の半分に緑色セロハンをもちいて覆い覆光した。実験期間は7月から9月にかけて行なつた。

(3) 蛍光灯線下におけるフィルム効果

図1に示した蛍光灯照射装置を2台自作し、そのうち1台に試料をフィルムに置き、その上を赤色セロハンで完全に覆つた。2台の蛍光灯照射装置は同時に点滅出来るようにして1日平均8時間の照射を行なつた。これらの実験にフィルムとして用いた赤色セロハン

図1 蛍光灯照射装置

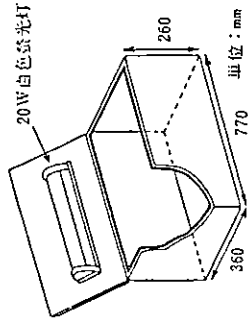


図2 色セロハンの可視部スペクトル

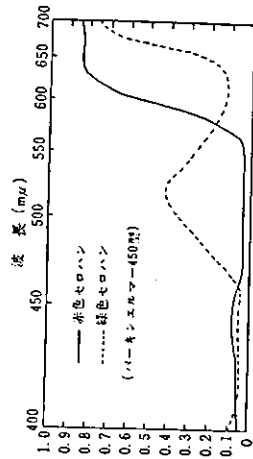
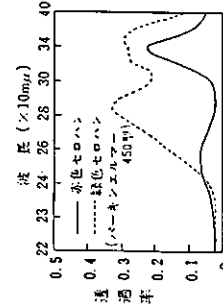


図3 色セロハンの紫外部スペクトル



および緑色セロハンの可視部および紫外部の吸収スペクトルを図2、図3に示した。

2. 加熱変性実験

(1) 試料はM社製即席ラーメンの市販されているものを購入して実験に供した。これは製造後すでに2カ月を経過したもので購入時のPOVおよびAVはそれぞれ11.8, 0.7であった。

(2) 加熱条件

上記即席ラーメンを高出時と同状態のバボールケースに入れたまま各温度の恒温器に格納し、測定のためケースを開封した場合はテープで前と同状態に密封した。恒温条件は、室温放置、30°C、40°Cおよび50°Cの室温とし、室温以外には恒温器とも各々の電気恒温器中に設置した。

フィルムにより真空包装されて、しかも暗所に保存されるならば夏季のような時期でも数カ月の保存は可能であるが、明所における保存、照射は550mμより短波長の光線を除くことが必要である。
(本論文の要旨は昭和42年5月第21回日本栄養・食糧学会総会(西宮)において発表された)

文 献

- 1) 山下太郎:油化学 14, 754 (1965)
- 2) 渡辺 涉, 小林 晃, 久米海昭, 川北 益:日本食誌 32, 327 (1966)
- 3) 照明学会編:照明のデータブック改訂増補版 P. 118 (1962) (オーム社)

カフェイン含有飲料がシロネズミの成長血漿脂質などに及ぼす影響

コーンスターチを基本とし乾燥コーヒーなどを補足した飼料を体重 120g の雄シロネズミに54日間与え、体重、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、甲状腺の重量を計るとともに、血漿中のコーレステロール、リン脂質、およびトリグリセリドを測定した。飼料 100g 当たり乾燥コーヒー 2.3g、凍結乾燥茶 1g、あるいは純粋カフェイン140mg である。この添加量は、体重70kg の人が1日に12杯のこれらの飲料を飲んだらばおおよそ相当する。なおでんぷんを餌に置きかえた飼料についても同様の試験を行なった。その結果、これらカフェイン飲料物の添加は、成長率や臓器重量には影響を及ぼさなかったが、血漿脂質は飼料中のカフェイン量に比例して変化した。すなわち、カフェインの摂取量が増すにつれて血

漿中のコーレステロールとリン脂質は増え、トリグリセリドは減少した。しかし、でんぷんを餌に置きかえた飼料ではカフェインの摂取量が増すにつれてトリグリセリドが増し、コレステロールやリン脂質は変りなかった。このような相違は、肝臓における脂質合成の割合の異なることに起因するものである。脂質合成の指標として用いられるパイルベイトキナーゼの活性は、でんぷん食糧はコーヒーを添加しても変りなかったが、でんぷん食糧に置きかえたと倍加した。
Influence of Caffeine-containing Beverages on the Growth, Food Utilization and Plasma Lipids of the Rat. by Naismith, D.J., et al.: J. Nutr., 97, (3): 375~381 (1969) (編井)

日本栄養・食糧学会

- 会長 櫻井芳人
 副会長 小池五郎
 理事 阿部達夫
 幹事 神立誠男
 大塚敏雄
 古武雄一郎
 田村盈之輔
 安田久守
 久野希久
 正田和太

「栄養と食糧」誌投稿規定

1. 本誌には栄養、食糧に関連ある総説、報文、抄録、記事などを掲載する。寄稿者は本会會員に限る。
2. 報文は刷上りが5頁(図、表、写真などを含め、本会専用原稿用紙15枚程度)以内とする。この頁数を超える場合は超過分に要する費用(刷上りが1頁当たり4,500円)を申告する。
3. 報文その他の掲載は受理順による原則とするが、その採否ならびに順序は編集会議の判定による。また、編集会議は原稿中の字句について加除修正を行なうことがある。なお、印刷に要する経費の全額(刷上りが1頁当たり4,500円)をあらかじめ著者より提出された場合は、原稿の長短にかかわらず、可及的速かに掲載する。
4. 原稿はひらがなが交り口語体で撰書とし、数字、単位符号は cm, cm², ml, mg%, g/dl, 37°C などと書き、外国語は明瞭なる数字またはタイプライターにて記されたい。
5. 表題ならびに所属には敬語を付し、内容に関し300語内外の原文抄録をつけられたい。また、著者氏名にはローマ字をつけられたい。
6. 表と図は重複しないようにし、図と写真は明瞭なものを提出されたい。
7. 引用文献は研究事項に直接関連するものにとどめ、著者氏名、誌名、巻数、頁数(西暦年)の順に記し、原稿の終わりにまとめられたい。
8. 別刷は総説、報文に限り30部を贈呈し、それ以上は著者負担とする。(1部1頁当たり4円表紙をつける場合は表紙代6円)。別刷所要部数は原稿送付時に朱書きされたい。(郵送料は別に申受ける)。
9. 原稿送付先は次の通り。
 113 東京都文京区弥生1丁目 東京大学農学部栄養化学教室内 日本栄養・食糧学会

なお、この規定は昭和43年8月以降到着のものに適用する。

1. 半年会費 1,800円(含誌代)
 (会員以外は頒布せず)
 発行経理編集者 櫻井芳人 印刷所 城北整版印刷株式会社
 日本栄養・食糧学会内 東京都文京区関口1-32-8
 昭和44年11月1日発行
 東京都文京区弥生1~11
 東京大学農学部栄養化学教室内
 電話東京(812) 2111 (代)
 最寄番号 東京 31551番

が最も $C_{18:2}$ の減少割合が多い。したがって、補充効果が最も低いことになり、生長阻害防止力と逆になる。もちろん、生長試験と生体内代謝、とりわけ脂肪酸代謝のみから評価することはいまいかもしれない。ただ、生長阻害と $C_{18:2}$ 量から比較考察したのは、 TOC が生体内で生理作用と biological antioxidant としての高作用がある場合、 α - TOC は生理作用が大きいが、逆に酸化防止作用は最も低い。したがって、脂肪酸質の $C_{18:2}$ の減少割合が多くなったものと推測される。反対に生理作用が大なので生長阻害の防止効果が高く現われ、最も生長がよいといえる。ところで、 $C_{18:2}$ の代謝作用と生長度合との間に相関関係を有するからはいまだ明白にはされていないが、一般に脂肪酸中の必須脂肪酸が減少すれば、酸化リン酸化⁽¹⁾ および種々の酵素⁽²⁾ が影響を受け、swelling の割合も増加し、肝臓ミトコンドリアの減少⁽³⁾、上記の観点からすると、肝臓中の必須脂肪酸の割合が発育にどの程度望ましいかが問題になる。また、発育を左右するものとして、摂取必須脂肪酸および肝臓脂肪中の必須脂肪酸の占める割合に一定の幅と限界が考えられる。発育上、肝臓脂肪中の必須脂肪酸に幅があると考えられ、 $C_{18:2}$ の酸化分解をある程度防止しても、その値が幅内にある場合、 TOC の効力の評価もできがたい。したがって、 $tocol$ 誘導体の場合は、生理作用と biological antioxidant としての高作用力

総和になるものと思われる。このことから、熱酸化重合油に対する $tocol$ 誘導体のそれぞれについて、生長阻害の防止効果には、それほど大差はないものと考えられる。

今後、油脂の種類（脂肪酸組成の相違）および TOC 含有量と油脂の栄養価、熱酸化重合油に対する TOC の補充量と生長阻害防止作用、抗脂肝物質（メチオニン、コリン）と TOC の組合せによる熱酸化重合油の解毒作用などについて検討したい。

終わりに種々貴重な献報を採録していただいたエヌ・ザイ株式会社ならびに昭和産業株式会社様にお礼申し上げます。

(昭和47年1月20日受取)

文 献

- 1) 阪本, 吉川, 油化学, 21, 307 (1972)
- 2) J. Griewahn, B.F. Drubert, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 25, 35 (1948)
- 3) P.D. Klein, R.M. Johnson, J. Biol. Chem., 44, 380 (1954)
- 4) P.D. Tuipule, Jr., J.N. Williams, J. Biol. Chem., 211, 229 (1955)
- 5) H.O. Kunkel, Jr., J.N. Williams, J. Biol. Chem., 149, 755 (1951)
- 6) T. Hayashida, O.W. Portman, J. Nutr., 81, 103 (1963)
- 7) E. Levin, R.T. Johnson, S. Albert, J. Biol. Chem., 224, 15 (1957)
- 8) T. Hayashida, O.W. Portman, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103, 655 (1950)
- 9) R.T. Holman, "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids", T, p. 275 (1968)

自動酸化油脂の毒性に関する研究 (第1報)

有毒成分の分離と同定 (その1)

吉岡 倭子・金田 尚志

東北大学農学部薬理化学科 (仙台市青葉区町1-1)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. I

The Fractionation of the Toxic Compound and Its Identification. (1)

Masako Yoshizuka and Takashi Kaneda

Department of Toxic Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University (1-1, Tsutsumi-1-dori, Azaemiyu-cho, Sendai)

It has long been believed that the toxicity of autoxidized oils was due to hydroperoxides. On the other hand, there are several reports that some other secondary oxidation products such as hydroxyl and carbonyl compounds make greater contribution to the toxicity than hydroperoxides. However, the major toxic compound still remains to be elucidated and despite of much research

on the mechanism of the toxicity, it has not been clarified yet. Authors made some attempts in this paper to cast light on the toxic compounds and their mechanism of the toxicity. Methyl linoleate was autoxidized at 60°C and the toxicity of this deteriorated ester on mice was examined. It was found that the longer the ester was oxidized, the more toxic it became. In order to fractionate the toxic substance, this oxidized ester was molecular-distilled first for the separation of low molecular weight compounds (I). The residue was washed with dil. alkali to remove the free fatty acids (II) and then column chromatographed on silicic acid to fractionate into four fractions (III-A, B, C, D). Fractions (I), (II), (III-A, B, C, D) were fed through stomach tube on mice to investigate the degree of toxicity. Fr. (I) was found the most toxic followed by (II), (III-D) in the order. Fr. (I) was further fractionated into six fractions (I-A, B, C, D, E, F) on silica gel. Fr. (I-D) appeared the most toxic on mice. Fr. (I-D) was identified as 4-hydroperoxy-2-en-1-ol with carbon chain ranging from five to nine by means of IR, UV, elementary analysis, melting point, MS and NMR.

1 緒 言

著者らの1人はさきにも不飽和脂肪酸の毒性はヒドロペルオキシドによることを報告したり、その後自動酸化油の毒性の本態に関しては、多くの報告が出され、なかにはヒドロペルオキシド以外に、ヒドロキシ化合物⁽¹⁾、カルボニル化合物⁽²⁾を有するものもある。また、有毒成分の毒性発生機構についても、いくつもの報告があるが、これを分類してみると、I) 肝臓より吸収されたヒドロペルオキシドによる種々の酵素の不活性化⁽³⁾、ビタミンの破壊⁽⁴⁾、タンパク質との copolymer 形成⁽⁵⁾によるという説と、II) ヒドロペルオキシドがリンパ液や体脂に混入され、そこから肝臓で感作され、2次分解物として吸収され、毒性は2次分解物による^(6,7)という説に分かれている。

以上のように自動酸化油中の有毒成分についてはいくつかの意見があり、統一的な見解は出されていない。さらに、毒性物質の本態に關し、種々の異なる見解が報告されているが、これは報告により試料油の種類、酸化方法、酸化条件および酸化程度に差があり、酸化生成物が異なるためとも考えられる。また毒性物質の精製度も問題があると思われる。以上の点、すなわち毒性物質の本態および毒性発生機構を明らかにするため、種々の酸化生成物の分離法に重点をおきつつ検討を加えたので、その結果を報告する。

2 実験および結果

2-1 酸化程度と毒性

2-1-1 試料油(リノール酸メチル)の調製
サフラワール油をエチルエステル交換し、得られた混合脂肪酸メチルエステルを減圧蒸留、炭素付加法により精製し、ガスクロマトグラフィーによりチェックし、純度 98% のリノール酸メチルを得た。本リノール酸メチルに 60°C で酸素を吹き込み 90 hr 酸化した。酸化油の性状の

変化を過酸化値 (P.O.V.), カルボニル値 (CO.V.) に よって観察した。Fig-1 に示すように P.O.V. は酸化の初期ではゆるやかな上昇カーブを描いたが、誘導期を過ぎると急激に上昇し、最高値は 2450 を示し、その後減少した。一方 CO.V. は P.O.V. が最高値を示す付近から急激に増加し、常に上向きカーブを描いた。試料油として P.O.V. がピークに達する前より 3 試料 (No. 1~3)、ピークを過ぎ、むしろ減少する傾向にある部分より 5 試料 (No. 4~8) を採取した。

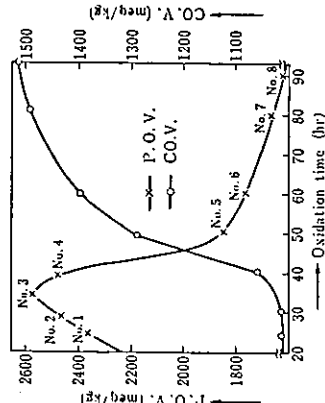


Fig. 1 Relationship between oxidation hours and P.O.V., CO.V.

2-1-2 毒性試験

前述の酸化油 No. 1~No. 8, および対照群としてリノール酸メチルを体重 20g 程度の DA 系雄マウス 1 群 5 匹に 1 日 1 回 0.25 ml ずつ stomach tube を用い 1 日 1 回投与し、毒性の程度を比較した。死亡率は Table-1 のように、P.O.V. の減少時の方が高いことが明らかとなった。さらに生存時間で比較してみると酸化時間の長いものほど短時間で死亡するものが多いことがわかった。

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

Table with 4 columns: Oxidized ester No., Total mice killed, Numbers killed within 15 hr, 36 hr, 48 hr.

Five mice were used for each group.

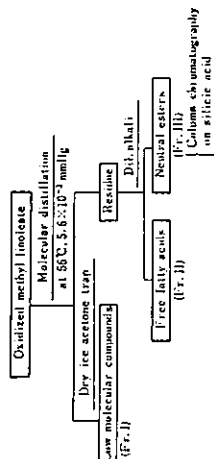


Fig-2 Fractionation of autoxidized esters.

3 自動酸化油脂の毒性区分の分離

3-1 分離法
自動酸化エステル中のいかなる成分の毒性が最も強いかを検索するための分離を試みた。すなわち、2-1-2で最も強い毒性を示した No. 8 (P.O.V., 1630, CO.V. 1530) を Fig-2 に示すように 56°C, 5.6 x 10^-3 mmHg で分子蒸留し、ドライアイス-アセトントラップで低分子区分 (I) を捕集した。残留分をアルカリで処理し、遊離脂肪酸 (II) を除き、さらに吸着カラムクロマトグラフィにより毒性の差を利用して、石油エーテル-ジエチルエーテル系で4区分 (III-A, III-B, III-C, III-D) に分離した。

3-2 各区分の化学特徴

3-1 で分離した各区分の性状を推定するため、P.O.V., CO.V. および平均分子量を測定した。その結果 Table-2 に示すように、I 区分の CO.V. は約 8000 と高い値を示し、低分子カルボニル化合物を主とする。また III-A 区分はリノール酸メタルジドロペルオキシド単量体、III-D 区分はリノール酸二量体が主成分であろうと思われる。II 区分の平均分子量はリノール酸よりも大きいことが注目された。

Table-2 Characteristics of fractionated compounds.

Table with 5 columns: Fractions, P.O.V., CO.V., M.M.W.*

* Mean molecular weight

** The reaction was carried out in sealed ampoules.

3-3 各区分の毒性試験

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

4 低分子区分 I の毒性

4-1 低分子区分の分離
低分子区分中のいかなる物質が強い毒性を示すかを明らかにするため、極性の差を利用して分離を試みた。前述の通り本区分の P.O.V. は 603, CO.V. は 7983 であり、平均分子量は小さく反応性に富むものと考えられた。そこで分画中の変化を最少限におさえるため、短時間で分離可能な方法としてドライカラムクロマトグラフィを用いた。すなわち 2cm x 2.2m のナイロンチューブに、10% の水を加え活性度を落としたドライカラムクロマトグラフィ用のシリカゲル 310g を詰めサンプリング 12g を吸着させ、ベンゼンで展開し、ベンゼンが下端に達したとき展開を終わり、下端より 10cm の間隔でカラムを切り、22 の区分に分け (I-1 ~ 22)、各区分をエーテルで抽出した。おのおの区分につ

Table-3 Toxicity test of fractionated compounds on mice.

Table with 6 columns: Fractions, Total mice killed, Numbers killed within 2 hr, 10 hr, 16 hr, 24 hr.

Five mice were used for each group.

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

Table with 5 columns: Dry column No. and subfractions, Functional groups by IR, Staining reaction on TLC, Total mice killed.

* Saturated aldehyde ** weak

** Unsaturated aldehyde *** medium used for each

*** 2,4-Dinitrophenylhydrazine *** strong subfraction.

いて、IR, TLC を行ない、その組成を推定した (Table-4)。

4-2 低分子区分 (Fr. I) の毒性

4-1 で分離した各区分のうち、IR で同一官能基を持つものと思われた区分は、Table-4 に示すように I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F とし、これら各区分の毒性を比較した。すなわち、体重 15g のマウスに 0.1 ml ずつ投与したところ Table-4 のような死亡率を示した。これより I 区分中に -OOH 基とカルボニル基を有すると思われる物質 (I-D) の毒性が最も強いことを認めた。I-D 区分に続きヒドロキシ・カルボニル化合物区分 (I-E), (I-F) が強い毒性を示した。おのおの分画区分投与群の死亡直後の内臓を顕微鏡で観察すると、I-D と与えたもの胃は黒ずんだ赤色で半透明状に変化しているのに対し、I-C 区分では胃・腸に異常な膨脹が見られた。これは hex-3-en-1-ol, oct-2-en-1-ol を投与したものと同様に一致した症状であった。I-22 は、-OOH, -OH, -COOH などの混合物であるが、この区分が胃腸の内臓は著しく黄カッ色に変化していた。

4-3 I-D 区分の同定

I-D 区分の IR 図 (Fig-3) より 3450 cm^-1 の -OH または -OH による吸収、1685 cm^-1 の共役アルデヒド、980 cm^-1 の trans 二重結合が推定された。一方 P.O.V. を測定したところ 14,138 eq/kg であった。また同区分をベンゼンにより TLC 上で展開したところ、KI-star-

ch, および 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNP) 陽性の単一のスポットが認められた。この区分を ZnCl2 により -OOH を -OH に還元し、2,4-DNPH により 2,4-dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) 誘導体とした。得られた 2,4-DNPH 誘導体を phenoxethanol impregnated Wacogel B-O 上で hexane により多重展開し、四つのスポットを得、Rf 値の大きいものより、I-D-1, I-D-2, I-D-3, I-D-4 とした。おのおのスポットをかきとり蒸留し、定および元素分析を行った結果、I-D-1, mp=153°C, C=53.63%, H=5.91%, N=16.60%, I-D-2, mp=145°C, C=52.09%, H=5.55%, N=17.43%, I-D-3, mp=197°C, C=48.78%, H=4.75%, N=18.59%, I-D-4, mp=171°C, C=47.10%, H=4.23%, N=20.10% であった。元素分析の結果はおのおの hydroxynonenal, hydroxyoctenal, hydroxyhexenal, hydroxypentenal に近似するものであった。またいずれのスポットも、クロホルム中の可視部吸収率は 375 mμ にあった。これより二重結合は共役して

いるものと思われた。一方 I-D-2, I-D-3 の質量スペクトルを測定した。(Fig-4) I-D-2 と比較した m/e=294 同位体とした。Fig-4 の上部に示した m/e=294 は hydroxyhexenal の分子重であり、m/e=276, 269 はおのおの [M-H2O]+, [M-(H2O+OH)]+ に相当するものと思われる。また m/e=57, 237 は本薬の再配列およびアルデヒド炭素値の C2 と C4 の開裂に基づいて生じたものと思われる。Fig-4, 中央チャートにおいて m/e=336 は hydroxyhexenal の acetate の分子重であり、276, 275, 258 はおのおの [M-CH3COOH]+, [M-CH3C(OH)]+, [M-(CH3COOH+H2O)]+ である。Fig-4, 下段チャートにおいて m/e=364 は hydroxyoctenal の分子重であり、304, 303, 286 は Fig-4, 中央と同様に [M-CH3COOH]+, [M-(CH3C(OH))]+, [M-(CH3COOH+H2O)]+ である。Fig-4, 中、下段における m/e=42, 154, 202, 246 のピークの帰属は明らかでないが、Esterbauer, Shennan, Gardy らの方法により合成した 4-hydroxyoctenal acetate のピークと一致した。さらに、hydroxyl 基の位置を明らかにするために核磁気共鳴スペクトルを測定した (Fig-5, 6)。Fig-5 において τ=9.1 は CH2-β の 3 個のプロトンに τ=8.5 は -CH2-γ の 2 個のプロトンに、τ=5 は -N-H-α のプロトンに、τ=2.3, 1.7, 1.2 は芳香環の 3 個のプロトンに、τ=1.8 は -N-CH-β のプロトンに帰属されたと見られた。重水置換による NMR (Fig-5, 中段) で Fig-5 上段に見られた τ=1.3 のピークが消失したことに

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

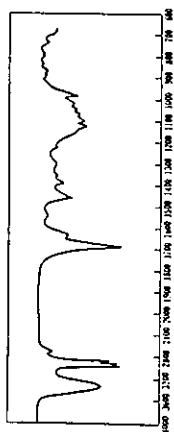


Fig. 3 IR spectrum of 1-D fraction.

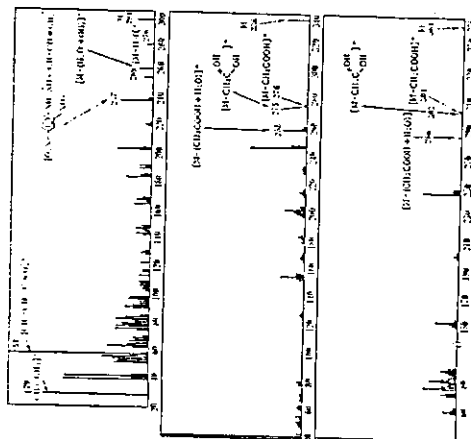


Fig. 4 Mass spectra of 1-D-3 (top), acetate of 1-D-3 (middle) and acetate of 1-D-2 (bottom).

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

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

Oxidized ester No.	P.O.V.	C.O.V.	Numbers killed**		Yield of low molecular compds. (%)
			Refor. M.D.	After M.D.	
1	1,820	1,320	0	0	0.9
2	1,621	1,532	1	0	1.1
3	421	1,719	5	1	1.8

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

5 考 察

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

数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-ol が最も強い毒性を示すことが明らかとなった。有毒物質の毒性発生機構に関しては、病理学的研究を必要とするが、マウスから判断すると、種々の有毒物質はおのおの異なる作用機構を有するのではないかと思われる。

6 要 約

1) リノール酸メチルの毒性は、酸化程度により、成分および量比が異なり、一概にいかなる物質が最も強い毒性を示すとはいえないが、P.O.V. がピークに達する前においては、従来から指摘されたヒドロペルオキシドが毒性に著しく関与するものと思われる。一方 P.O.V. がピークに達し、C.O.V. が急激に上昇し始めるとヒドロペルオキシドの二次分解産物である低分子化合物のうちでも炭素数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-ol の毒性が最も強いことを見いだした。
2) 種々の有毒物質の毒性発生メカニズムは、マウスの死亡時の症状よりすると、異なるように思われた。(昭和47年2月25日受理)

文 献

- 1) 金田ら, 日本産油誌, 19, 171 (1953); 20, 50, 68 (1954) 産油と食糧, 7, 84 (1954), J. Biochem., 41, 327 (1954); 42, 561 (1955), 東海水産報, No. 12, 1 (1955)
- 2) 土田ら, 油化学討論会, 昭和44年, 大阪
- 3) E. Schauenstein, J. Lipid Res., 6, 417 (1967)
- 4) P.J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 5) R.C. Mcknight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 6) B.O. Christophersen et al., Biochem. J., 100, 95 (1966)
- 7) C. Little et al., Biochem. J., 102, 10 P (1966); 101, 13 P (1966), C. Little, Biochem. Biophys. Res. Comm., 31, 145 (1968)
- 8) P.J. O'Brien et al., Biochem. J., 103, 32 P (1967)
- 9) J.D. Dessai et al., J. Lipid Res., 4, 204 (1963)
- 10) J.S. Andrews et al., J. Nutr., 70, 199 (1960)
- 11) 竹内, ビタミン, 35, 187 (1967)
- 12) R.T. Holman et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 702 (1965)
- 13) P. Debonbail, Biochim. Biophys. Acta, 3, 371 (1949)
- 14) H. Esterbauer, Monatshefte Fur Chemie, 98, 1944 (1967)
- 15) J.C. Sheehan, J. Amer. Chem. Soc., 71, 1437 (1949)
- 16) M. Grand, Ann. de Chim., 10, 336 (1930)

8. 酸化脂質と栄養

8-1. 脂肪酸過酸化物の毒性とビタミンEの作用

表 卷 豊 輔*

脂肪酸過酸化物の急性毒性については広く認められているが、経口投与の場合に限ってみると、吸収されにくい点、摂取した動物が下痢やセボリアのような症状のほか、特有な症状を示さず、死亡した動物にこれといった病理組織学的変化が認められぬ上、死亡をまぬがれた動物が回復後後遺症を示さぬ点、ラウリン酸過酸化物など成長低下以外に病理的变化を示さぬ過酸化物の知られていない点などから、いわゆる急性毒性が過酸化物構造の直接作用でなく、吸収されにくい脂質の摂取による症状、あるいはビタミンや必須アミノ酸、必須脂肪酸を破壊することによる劣化状態ではないかと考えられ、また毒性物質の本体が過酸化物構造そのものでなく、2次的分解によりこれより生ずる物質によるのではないかとこの主張も行なわれている。

著者は以上の点を考えつつ、主としてリノール酸メチル過酸化物の経口投与による致死量、吸収および体内分布、リパーゼ活性の阻害などについて実験し、あわせてビタミンEの作用との関連をみたので、ここに実験結果を報告し、誌氏の御批を願う次第である。

1. 精製度を異にする脂肪酸過酸化物の経口投与による致死量

従来発表された致死量としては、金田ら¹⁾による高度不飽和酸エチル過酸化物のLD₅₀は体重1kg当り活性酸素として278mgであつたが、リノール酸メチル過酸化物の致死量としてOLCOTTら²⁾による体重100g当り1600μM(活性酸素として512mg/体重1kg)という値がある。またHOLMANら³⁾は体重1kg当り活性酸素に換算して640mg程度の投与で死亡しないことを報告した。

著者は予備試験としてPOV, 5735 me/kg 濃精製したリノール酸メチル過酸化物を60g前後のラッチャに対し、活性酸素として1500~2450mg/体重1kgを1日1回3日間連続投与したが1匹も死亡しなかつた。この点精製によつて毒性が少すような現象が観察されたので、これが脂肪酸の種類、過酸化物の精製法、動物の種類など異なるのではないかと考え、15~20g程度のマウスに対し、製法、精製度を異にするリノール酸および高度不飽和酸メチル過酸化物を経口投与したところTable 1のような結果が得られた。すなわち致死率に試料の種類、精製度などによつて異なり、単に活性酸素量のみで致死量を規定できなかつた。製法または精製度を異にする過酸化物の毒性が異なる点は、徳垣ら⁴⁾による過酸化物のアスコルビン酸誘導体阻害および経口毒性の試験結果とも一致しており、過酸化物の種類および精製度と毒性の関連は今後なお詳細に検討する必要がある。

2. リノール酸過酸化物の吸収および体内分布

ANDREWSら⁵⁾はリンパ液自体は過酸化物を破壊しないが、経口投与でリンパ液中に過酸化物が見出された例は25例中1例に過ぎず、しかも共役ジエンの存在が認められるところより過酸化物は2次分解物として吸収されるのではないかと、NISHIDAら⁶⁾もほぼ同様な現象を観察した。またGLAVINDら⁷⁾は過酸化物がリンパ液でなく胆汁または腎臓リパーゼにより破壊されることにより、HOLMANら³⁾は過酸化物の毒性が経口投与より腹腔内注射の方がはるかに強く現われることにより、過酸化物自体は吸収されず腸壁などで破壊されるとした。DUBOULOZら⁸⁾も経口の摂取された過酸化物がネズミの体腔に現われず、微量が糞中に見出されることより研究を進め、同じような結論に到達した。一方PARTESHO⁹⁾は過酸化物を多量に含むマウリ油を与えたネズミでは肝臓および腎臓に高度の蓄積が見られること、腸には過酸化物の見出しぬことなどを報告している。

* 東海区水産研究所 (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)

Table 1. Relation between the oral lethality of different hydroperoxides in mice and the dose on the basis of active oxygen.

Sample tested Kind	Dose on the basis of active oxygen (mg/kg)		Lethality (%)	Weight ratio to body wt.			No. of mice killed of shock
	POV (me/kg)	3811		Heart (%)	Liver (%)	Kidney (%)	
Methyl polyenoate hydro-peroxide* (Me. fr.)	811	3811	100	1.06	5.65	1.70	
	545		80	0.87	5.74	1.83	
	283		0	0.51	6.88	1.84	
	143		0	0.61	7.69	1.99	
Methyl linoleate hydro-peroxide** (Me. fr.)	795	4656	80	1.13	6.17	2.06	2
	528		40	0.82	7.61	2.25	
	261		0	0.37	5.86	1.52	
	150		0	0.54	5.70	1.64	
Methyl linoleate hydro-peroxide** (Petr. et. fr.)	1505	2120	25	0.67	6.87	1.99	
	1131		50	0.61	6.28	1.86	
	754		0	0.49	6.22	1.75	
Methyl polyenoate hydro-peroxide prepared by thin layer oxidation.	785	1120	25	0.73	6.66	1.70	
	580		25	0.54	7.02	1.91	1
	387		0	0.56	6.23	1.51	
Methyl linoleate (Control)	0	0	0	0.43	6.93	1.80	
	0	0	0	0.55	7.03	1.86	
	0	0	0	0.66	6.57	1.75	

* Methanol fraction in the chromatographic purification¹⁾ of hydroperoxides of methyl polyenoate concentrate prepared from squid liver oil fatty acids.

** Methanol and petroleum ether fractions in the chromatographic purification¹⁾ of methyl linoleate hydroperoxide.

¹⁾ KOKATNUR et al., Anal. Biochem. 12, 325 (1965).

著者は精製したリノール酸より調製した過酸化物を投与すれば、少くとも過酸化物は由來する物質の吸収、分布がみられると考へた実験を行なつた。すなわち、1の位置を1°Cで精製したリノール酸よりリノール酸メチル過酸化物を作り、さらにクロマトグラフィーで精製したものを試料とした。このほか、この試料の一部をN:ガス中で100°Cに加熱し、過酸化物を分解した試料を調製した。つぎに、これらの試料をラッチャに胃管をもつて、毎日1回、3日間経口投与し、1日後ラッチャを殺し、体各部より脂肪を抽出し、放射能を測定し、放射能の体内分布を見た。その結果はTable 2に示すとおりで、対照に比し、過酸化物は吸収が悪く、大部分が排泄物中に見出され、ついで消化器に分布していた。また加熱分解物は過酸化物に比しPOVが低く過酸化物濃度をほとんど有しないと考へられるのに放射能分布は過酸化物の分布にきわめて類似してゐた。このことより見るに過酸化物はそのまま吸収されるのではなくて、2次分解物として吸収されたと考へてよいように思われる。

この際、ビタミンEをあらかじめ飼料に混入して与えておくと、過酸化物および加熱分解物の吸収および分布を変へる作用を示した。すなわちTable 3に示すとおり、ビタミンEとしてDL-α-トコフェロール(遊離型)またはDL-α-トコフェリアセテート(エステル型)を飼料1kg中5g、フラビン24mgを加えた飼料で3日間ラッチャを飼育してから、精製リノール酸メチル過酸化物または加熱分解物を投与した後の放射能分布と回収率を見るとTable 3のような結果が得られた。過酸化物および加熱分解物は対照に比し、

Table 2. Distribution of radioactivity (%) in rat bodies fed methyl linoleate-¹⁴C, its hydroperoxide and the heat decomposition products of the peroxide.

Tissue	Control*			Hydroperoxide**			Heat decomposition products***		
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
Feces	26.4	25.9	22.4	65.5	67.7	71.8	61.9	64.5	-
Digestive tract	6.7	9.4	2.7	10.4	10.7	4.8	10.1	11.2	-
Liver	2.3	3.8	4.0	1.3	2.9	1.6	1.5	3.3	-
Heart	0.4	0.1	0.8	0.2	0	0.5	1.3	0.4	-
Kidney	0.9	0.7	0.8	0.5	3.6	0.2	0.2	0.6	-
Other viscera	1.4	1.2	1.4	0.4	0.2	0.7	1.1	0.2	-
Brain	0.5	0.1	0.5	0.5	0	1.0	0.2	0	-
Gonad	1.6	0.9	3.8	0.4	0.5	0.9	0.2	0.6	-
Muscle	13.8	15.9	22.2	5.1	5.5	7.1	4.5	4.4	-
Skin and depot fat	30.4	30.9	31.4	9.4	5.9	7.6	12.6	10.0	-
Bone and others	15.5	11.1	10.0	6.9	2.9	3.8	5.6	5.4	-
Total	99.9	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	99.8	100.0	-
Recovery of radioactivity ($\frac{\text{Radioactv. in lipid}}{\text{Radioactivity administered}} \times 100$)	31.5	33.7	42.0	30.7	20.8	23.0	19.7	22.8	-

POV Radioactivity

- * Methyl linoleate Test 1 2 (me/kg) 44,889 cpm/g
Test 2 0 332,068
Test 3 0 18,636
- ** Methyl linoleate Test 1 2789~4328 (me/kg) 178,765~140,642 cpm/g
hydroperoxide Test 2 5130 19,726
Test 3 5620 17,702
- *** Heat decomposition Test 1 183~195 (me/kg) 159,698~139,596 cpm/g
products Test 2 50 21,534

Table 3. Effect of vitamin E in diet on the distribution of radioactivity in rats fed hydroperoxide and heat decomposition products.

Group	Sample administered	Distribution of radioactivity (%)		Recovery of radioactivity* (%)
		Feces	Body tissue	
1 (Control)	Methyl linoleate	22.4	77.6	38.6
2	Hydroperoxide	71.9	28.1	19.5
3	Hydroperoxide + free vitamin E	39.6	60.4	39.5
4	Hydroperoxide + vitamin E ester	54.6	45.4	31.0
5	Heat decomposition products	61.9	38.1	19.7
6	Heat decomp. products + free vitamin E	71.9	28.1	28.5
7	Heat decomp. products + vitamin E ester	66.4	33.6	31.9

* = $\frac{\text{Radioactivity in lipid}}{\text{Radioactivity administered}} \times 100$

吸収が悪いばかりでなく、放射能の回収率も悪いので対照に比し分解も大きいのではないかと考えられる。ビタミンEはこのような分解を防ぎ回収率を対照区の値に近づける作用を有し、この作用はビタミンEの型による違いは少ない。一方、ビタミンEは過酸化脂質の放射能分布を対照区の分布に近づける作用を有し、その作用は遊離型の方がエステル型より強かつた。しかし、このビタミンEの作用は加熱分解物に対してはほとんど認められなかつた。また著者らと殆んど同様な実験結果を竹内¹³⁾はコイについて得ているので、動物が違つても過酸化脂質の吸収の機構は同じと考えられる。

3. リノール酸過酸化脂質の体内分布の経時的変化と肝臓の脂質組成に対する影響

KAUNITZ¹⁴⁾ は酸化油脂およびその画分を与えたラットの脂質含量、脂肪酸組成などを調べ酸化油脂が中性脂肪の沈着を阻害する結果、脂質の蓄積および脂肪酸組成に変化が生じたことを報告し、DECKWITZ¹⁵⁾ は酸化油をビタミンEと共にラットに与え、臓器の脂肪酸組成がEを加えないと変化しないことを発表した。著者らは標識リノール酸メチル過酸化脂質をラットに3日間経口投与し、放射能の体内分布の経時的変化と肝臓の脂質組成の変化を見た。すなわち Table 4 に示すように第1日目の排泄物のカウント数を100とした相対的放射能強度は肝臓において特に顕著な変化を示し、第1日目に高く2日目に減じた。また筋肉、皮下および皮下脂肪の放射能強度は緩やかに増加した。また Table 5 に示す肝臓の脂質では、トリグリセリドが過酸化脂質を与えたラットにおいて日を経るにつれて増加するのに対して、対照群およびビタミンE投与群では3日目において増加の傾向が認められなかつた。一方対照群ではジモノグリセリドのようなる分解中間体が認められたが、過酸化脂質投与群ではこれらは全く見出されず、ビタミンE投与群は対照群に類似した状態を示した。このことから、過酸化脂質は肝臓に何らかの形で運ばれ、肝臓における脂質の蓄積と分解の過程の内、分解過程における酵素作用を阻害するように働き、ビタミンEはこの阻害作用を除去するのではないかと想像される。

Table 4. Periodical change in the relative radioactivity in rat organs fed with methyl linoleate-¹⁴C hydroperoxide.

	Relative radioactivity		
	1st day	2nd day	3rd day
Feces	100	137	170
Liver	90	8	10
Skin and depot fat	0	0	1
Digestive tract	8	3	13
Muscle	0	0	1

Table 5. Lipid composition of liver fed with methyl linoleate-¹⁴C hydroperoxide.

	Control	Group of rats			
		Hydroperoxide			
		1st day	2nd day	3rd day	
Phospholipids	+	+	+	+	+
Monoglycerides	+	-	-	-	±
Diglycerides	±	-	-	-	-
Sterols	+	+	+	+	+
Triglycerides	+++	++++	++++	++++	++++
		++++	++++	++++	++++

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

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

4. 過酸化脂質ラッチャ肝臓におけるリパーゼ活性
 脂質過酸化物が生体内の種々の酵素系の作用を抑制することについては多くの報告^{5, 10, 11)}があるが、著者らも過酸化脂質を与えたラッチャの肝臓にトリグリセリドが蓄積する原因がリパーゼ活性の阻害によるのではな
 いかと考へ、つぎの試験を行つた。飼料に過酸化ラッチャに、試料を管理により1匹当り0.15 mlを強
 制投与してから1日および6日経過後ネズミを殺し直ちに肝臓を取出してリパーゼ活性を測定した。その結
 果はTable 6のとおりで、過酸化脂質はリパーゼ活性を低下させ、ビタミンEはこの活性低下を回復させる能
 力があるものように考えられる。

文 献

- 1) 金田・石井・荒井・荒井：東海医学雑誌 (12), 18 (1955).
- 2) H. S. OLCOTT and A. DOLEV: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 114, 830 (1963).
- 3) R. T. HOLMAN and S. J. GREENBERG: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 707 (1965).
- 4) 橋垣・堀場・古賀：第118回脂質生体化学委員会発表，1969年3月29日；ビタミン，39 (5), 350 (1969).
- 5) J. S. ANDREWS, W. H. GRIFFITH, J. F. MEAD, and R. A. STEIN: *J. Nutr.*, 70, 199 (1960).
- 6) T. NISHIDA and F. A. KUMMEROW: *J. Lipid Res.*, 1, 450 (1960).
- 7) J. GLAVIND and N. TRYDING: *Acta Physiol. Scand.* 49, 97 (1960).
- 8) P. DUBOULOZ, J. LAURENT and J. DUMAS: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1740 (1951).
- 9) P. DUBOULOZ, J. FONDARAI, and C. LAGARDE: *Biochem. Biophys. Acta*, 3, 371 (1949).
- 10) V. G. PARESHKO: *Vopr. Pitaniya*, 23 (5), 20 (1964).
- 11) 竹内昌昭：原子力平和利用研究報告書，昭和41年度4頁，昭和42年度2頁，昭和43年度2頁；ビタミン36 (2), 187 (1967).
- 12) H. KAUNITZ: "Biological Effect of Autoxidized Lipids" in *Lipids and Their Oxidation* ed. by H. W. SCHULTZ, 260, The Avi Publ. Co. Inc., Westport (1961).
- 13) E. DEGWITZ and K. LANG: *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 64, 893 (1962).
- 14) F. BERNHEIM, K. M. WILBUR, and C. B. KENASTON: *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 117 (1952).
- 15) A. PHIL and R. LANGS: *J. Biol. Chem.*, 237, 1356 (1962).
- 16) E. SCHAUBENSTEIN: *J. Lipid Res.*, 8, 417 (1967).

討 論

金田尚志(東北大学)：白ネズミ，マウスに酸化油脂を与えた場合，致死率は試料の種類，投与量などに
 より異なるとする著者の御意見には異議である。私も高度不飽和酸，リノール酸などの酸化物を上記動物に
 与えた場合，たとえPOVが同じであつても，毒性に差があり，これは，二次酸化生成物に起因すると考へ

ている。

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

本巻：著者の使用した過酸化脂質はリノール酸のカルボキシル基にある炭素をラベルしたものであり，調製した
 リノール酸メチルヒドロ過酸化脂質であるため，体内より回収した脂質の放射能はこの炭素の存在を示し
 ている。従つてTable 4の結果も，一旦は過酸化脂質の形でネズミに経口的に与えられた試料であつても
 カルボキシルの炭素が見出されたことを示すに過ぎず，この物質が依然として初期の過酸化脂質を考へて
 いるかどうかは不明である。著者もできれば過酸化脂質を調製する際の炭素に¹⁴Cを用いることを考へて
 いるが未だ実験に着手していない。またこの方法によつても当初過酸化脂質中に含まれた炭素の
 存在が判るだけで，過酸化脂質がそのままの形で残つていないことは証明にはならない。多くの研究書による報告
 でも，過酸化脂質の投与後，動物体内より回収した脂質中に炭素に見出され，あるいはTBA反応陽性物質
 を見出した例はかたがたあるが，直接POVの測定などにより，過酸化脂質の存在を示した例はほとんどな
 い。これらと著者自身の実験結果から，著者は体内に存在する形は初期の過酸化脂質のエステルより過酸化脂質
 であるときに出来た，長夜構造や，二分子の重合などであるべき構造を有し，POVの測定などで証明でき
 るような活性の構造よりなる過酸化脂質構造を持つた物質例えは高分子のカルボキシルなどを想像している。従
 つて，著者自身の実験結果は相互に矛盾するものとは考へないが，毒性の本体が二次分解物であるといつ切
 りには今後の検討が必要であらう。

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

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

114) *ma, J. Atherosclerosis Res.*, 7, 708 (1968)
 115) B. Bronte-Stewart "Recent Advances Nutrition", J.F. Brock editor, Ciba Churchill London
 116) K. Kuba, A. Soolowiew, *Frankfurt* 40, 302 (1980)
 117) W.F. Enos, R.H. Holmes, J. Beyer, *J. Am. Med. Assoc.*, 152, 1090 (1953)
 118) C.W. Woodruff, J. Coniglio, *A.M.A. J. Diseases Children*, 100, 644 (1960)
 119) J. Mendez, B.S. Savits, M. Flores, N.S. Scrimshaw, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1, 595 (1958)
 120) A. Goalwin, J. Pomeranze, *Arch. Pediatr.*, 79, 58 (1962)
 121) S.J. Fomon, D.J. Bartels, *A.M.A. J. Diseases Child.*, 99, 27 (1960)
 122) L. Swell, D.F. Elick, H. Field, C.R. Treadwell, *Am. J. Physiol.*, 180, 124 (1955)
 123) A. Phil, *Acta Physiol. Scand.*, 34, 197 (1955)
 124) V. Vahouny, C.R. Treadwell, *Am. J. Physiol.*, 186, 881 (1959)
 125) K.G. Pinter, O.N. Miller, J.G. Hamilton, *Federation Proc.*, 21, 2, Part II, p. 376 (1963)
 126) E. Karvinen, I.M. Lin, A.C. Ivy, *J. Applied Physiol.*, 11, 8 (1957)
 127) G.E. Clément, J.F. Mead, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 100, 295 (1959)
 128) R.J. Morin, S. Bernick, J.F. Mead, R.B. Alford, *J. Lipid. Res.*, 3, 432 (1962)
 129) D. Kritchevsky, A.W. Moyer, W.C. Teas, J.B. Logan, R.A. Brown, M.C. Davies, H.R. Cox, *Am. J. Physiol.*, 178, 30 (1954)
 130) L. Swell, M.D. Law, P.E. Schools, C.R. Treadwell, *J. Nutr.*, 75, 181 (1961)
 131) R. Okey, A. Shannon, J. Tinoco, R. Ostwald, P. Miljanic, *J. Nutr.*, 75, 51 (1961)

統計

昭和44年塗料・印刷インキ生産実績

品名	生産量(1)	品名	生産量(1)
油	7,770	印刷インキ	252,329
溶剤	1,351	インキ	131,206
塗料	32,986	インキ	26,863
油	31,295	インキ	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,747
塗料	3,433	油	103,767
溶剤	30,320	塗料	18,122
油	8,009	溶剤	52,201
塗料	52,436	塗料	70,323
溶剤	185,222	溶剤	16,887
油	16,662	油	3,433
塗料	252,329	塗料	30,320
溶剤	131,206	油	8,009
塗料	26,863	塗料	52,436
油	157,569	溶剤	185,222
合計	476,967	油	16,662
油	7,770	塗料	252,329
溶剤	1,351	油	131,206
塗料	32,986	塗料	26,863
油	31,295	油	157,569
塗料	8,073	合計	476,967
油	10,545	油	7,770
塗料	11,747	溶剤	1,351
油	103,767	塗料	32,986
塗料	18,122	油	31,295
溶剤	52,201	塗料	8,073
塗料	70,323	油	10,545
溶剤	16,887	塗料	11,

50°C以上と考察してある。また 350°C, 1hr 加熱したコレステリンでは陽性であったが、未処理コレステリンは陰性であった。ところが、ジェポキシブタンは陽性であるのにモノエポキシドの 16g, 17g-epoxy-ostratin en-3-ol では陰性である。しかし常法の発がん試験ではモノあるいはジェポキシブタンアリン酸あるいはジェポキシコレステレンなどはいずれも発ガン性が立証されていない。

また、ラクトリンの 2 の位置に二重結合をもったラクトン (4-オキシシクシヘンテラクトンや、4-オキシシクシネンテラクトン) が見いだされているが、これは自然界に広く分布しており、これに属するグループの中で発ガン性を有するものがあることが、その安定性を確かめようとする必要からもうかがうことができよう。たとえばラクトンの酸化油添加飼料による発ガン作用や、Schwartzman 反応の高活性¹¹⁾などから推定されることにより、加熱劣化油は発ガン作用に対して毒性が強いことが判明¹¹⁾された。これらの生物学的な作用については Reuland¹²⁾ によって、最近の記載は詳しく述べられている。また、病態学的な観点によって、成育の阻害が現われることや細胞レベルではミトコンドリアの電子伝達系を阻害すること、膜透過性に変化を与えることなど様々な作用が報告されている¹³⁾。

しかし、いまだに人に対する危険性についての評価は充分なものではなく、それぞれに報告されているものはいずれも本質的なものでないようである。人に対する主要な問題の一つとして、繰り返し使用され、消費される deep-frying 油脂の危険性である。しかしまた deep-frying からの煙などを日常吸いこんでいることがはたして安全であるのであろうか¹⁴⁾。いずれにしても、悪性腫瘍の本態が固定されるまでは明確な証明は不可成である。

Perkin と Van Abkerten¹⁵⁾ は綿菜油を用いて、各種条件下で deep-frying を行なって、その劣化をみていく。175°C で連続的に加熱すると、重合度は進行的に増大するが半減した。また、市場では製品に吸着して減じた油を毎日少量ずつ添加する習慣になっているが、これはかなり有効な手段ではないし、断続的な加熱劣化を早める結果となる。さらに連続加熱によるポラチオップの frying はとくに遊離脂肪酸や重合含有量の増加を伴い劣化度が増大する。この原因は原料含有中の水分によるもので、ポテトの代わりに少量の水を 1 回添加しただけで、ポテトフライングよりも油の劣化が促進されることが確認された。しかし Nolen¹⁶⁾ は

部分的に水添した綿菜油、大豆油および豚脂などで野菜、魚介類を揚げたフライ油をラットに 2 ヶ月間投与した結果、明らかに病状は観察されず、ただ吸入の低下から成育阻害の一部の動物にみられた程度であるとしている。

最近、deep-frying 中に種々な化学的反応によって生成する揮発性物質についての報告¹⁷⁾もあるが、揚げ食品の風味と深い関係があることもまた、これらの多くの化合物について実験と毒性との関係について安全性を確立しておくことは、人の健康、とくに摂取や吸入によって発生する可能性のある危険性について知るために大変重要なことである。日常、deep-frying によって揮発性物質を吸入する人では、たとえアクリレンがほとんど存在しなくとも、結核や呼吸器に慢性の炎症をもたらす危険性もあるといわれている。

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

2 自動酸化劣化油の毒性

油脂と含有した飼料は長期間の保藏中にしばしば自動酸化を起すことがある。Carpenter¹⁸⁾ は、このような飼料を動物に投与して、その安全性を検討した結果、市販品で充分栄養的に適したものであれば、ビタミン D や E の損失を最少限にとどめるか、あるいはこれらとビタミンを補充さえすれば、少しも有害なことではないと述べている。また、市販の飼料に 5% 酸化牛脂 (P.O.V., 9%) を添加したもので、ラットを飼育したが、発育には阻害作用は認められず、一部に肝のビタミン A 含量が低下したものがあつたが、成育は正常で、とくにビタミン A, E の欠乏症は認められなかった¹⁹⁾。七面鳥の場合には各種条件下で自動酸化したアンチオキソイド油を 1.5% 添加飼料で飼育してもほとんど影響が現われなかった²⁰⁾。またポテトでは高い P.O.V. (100 μmol/g) の油脂を 17% 添加した飼料で飼ったが成育にわずかながら低下がみられる程度であった²¹⁾。

以上の結果から、かなり低いレベルの酸化油脂でも、ある種のビタミンととくに A や E の欠乏した飼料で飼育した場合、急速な劣化症状を呈するものがある。他方、Waravdekar²²⁾ は酸化油脂の毒性について異なった見解を述べている。紫外線照射したリノール酸の抽出物をマウスの腹コウ (雄) 内に注射して、肝の硬化 (線状、皮膜の炎症、肥厚など) や肝のタンパク量増大などを観察している。この照射油脂はイオン化放射線照射したもの²³⁾と同様なペルオキシドやカルボニル化

合物が含まれているが、はたしてこれらの病変に對し、これらの化合物が何ほどの作用を及ぼしたかは明確な証明もないし、またこのような手法も毒性を知ることには効かない。効かないが、この動物実験でただちに劣化油の生物に対する毒性をうんぬんすることはなほ危険であるように思われる。以上種々な報告についてごく簡単にふれてみたが、つぎに、著者らが最近行なってきた自動酸化油脂の毒性とその性状について紹介してみよう。

3 自動酸化油脂のサルに対する長期経口投与試験²⁴⁾

著者らは脂質過酸化物の慢性毒性に関する研究の一環として不飽和脂肪酸およびその過酸化物をサル (カンザイザル, *Macaca irus*) に対し長期間投与して、その慢性毒性の試験を行なった。飼料のリノール酸誘導体の特性および投与方法は表-1 のようであり、試験動物のクイザル (推定 2~3 才) はベトナム産の健康なものを、投与量はそれぞれ 1 日当たり 100 mg 相当量を、2~3 日おきに連続経口投与して飼育した。この間、過酸化物質 (AC-32-POR) の雌サル 1 匹は 4 ヶ月目で病

表-1 リノール酸誘導体およびその過酸化物の特性と投与方法

化 学 特 性	AC-32 (純度 99%)		AC-32-POR (純度 99%)	
	投 与 量 (mg/日)	投 与 回 数 (回/日)	投 与 量 (mg/日)	投 与 回 数 (回/日)
化 学 名	1. V. 131-139	1	127	1
特 性	P.O.V. 0	610-659		
試 験 動 物	A.V. 2-3	2		
飼 料	カニグイザル (2~3 才)	カニグイザル (2~3 才)		
投 与 量	9.3 匹	9.3 匹		
試験期間	14 ヶ月	12 ヶ月		
投 与 量 (μg/日)	100 mg	100 mg		

表-2 サルにおける慢性毒性試験 - 検査項目

A. 血液検査	4. 赤血球数
1. ヘマトクリット	5. 白血球分類 (%)
2. ヘモグロビン	
3. プロトロンビン	
B. 生化学的検査	
1. 血清タンパク	5. 血清 G.O.T.
2. 血清アルブミン	6. 血清 G.P.T.
3. 血清コレステリン	7. 血清尿酸値
4. 血清アルカリホスファターゼ	
C. 体重 (成育率)	
D. 病理、解剖学	
1. 剖検による慢性毒性所見	
2. 各臓器の病理組織学所見	
E. 発ガン、コレステリン症病変	

た 7~10 日間で多くの動物がへい死するような毒性の高いニオキシ化油 (EN, 105~112) ではコウモリが観察され、とくに豚油とほぼ同一であった。Rejz²⁵⁾ は豚油を 270°C, 8hr 加熱した落花生油、コナツ油などをラットに投与したところ、成育低下とともに肝の門脈周辺に脂肪浸潤が観察された。また加熱落花生油では肝のビタミン B 群の含有量が減少し、血清コレステリンが増加、炭水化物の摂取と吸収とが平行しなかった。

Kauniz²⁶⁾ は綿菜油、オリブ油、ワトリ、半脂などを 60°C, 40hr 通気しながら酸化させ、ラットに投与したところ、未処理油と比べ死亡率は増加したが蓄積脂肪、肝、心臓の構成脂肪酸、肝、脳のコレステリンなどには著しい変化は認められなかった。しかしながら心臓障害を発生してへい死したものが多く、とくに綿菜油にあってはその毒性は顕著であった。また空気が存在しなくとも、加熱によって脂肪酸を重合させた生油も同じような毒性を有している²⁷⁾。Poueau と Cluzac²⁸⁾ は三つの異なる方法により加熱したアマニ油の 20% 添加飼料でラットを 2 ヶ月間飼育した。その作用を調べた。最も強い加熱処理を行なった油 (空気が含まず、275°C, 40hr) はやはり毒性が強く、1~2 ヶ月でほとんどの動物がへい死した。未処理油とほかの処理油 (空気が含まず、220°C, 40hr; 空気が含まず、同一処理) との比較では、成育率、摂食率、消化率は低下したが薬物利用量は大きくはなかった。この結果から加熱によって生成した重合物と飼料中の含有脂肪酸成分との間で、消化管中において吸収阻害物質が生成しないようである。なお肝、腎の血管の寸断により腫大したものがみられたが、高温加熱処理したものでこの高濃度飼料に対し観察を起させる毒性が観察されたことと述べている。Griem²⁹⁾ はダイマー化した脂肪酸を 5% 添加した飼料でラットを飼育したが、32 週間で精子形成の障害がみられ、肝のクニペル細胞や他の組織の網内系細胞に色素の沈着が認められた。この色素は不溶性の含有セッケンであり、恐らく採取した脂肪酸と重合油との結合によって生成したものと考えられる。

つぎに加熱劣化油の発ガンについてみると、Ardmann³⁰⁾ は従来の発ガン性試験法で適当なものがないので、迅速なスクリーニングテストの開発のため、イモリの尾に抗体を注射することを提唱している。発ガン活性は表皮増生と皮膚の浸潤による生育低下によって示されるもので、加熱劣化油やニオキシ化大豆油は陰性であったが、過酸化落花生油 (P.O.V., 33~40%) では弱く、そして慢性毒性を示すリノール酸エチルエーテルオキシド (P.O.V., 750~1500) では明らかに陽性であった。この結果から過酸化の程度と発ガン作用とは関係がある

る。過酸化物の毒性については、すでに多くの報告があり松尾¹⁾、金田²⁾は酸化魚油の毒性の本体は過酸化物であることを認めている。しかるに一方、採取された過酸化物は超音波でただちに分解され³⁾、そして蒸留シンプには抽出ができていないといわれている⁴⁾。また Kaunitz⁵⁾ はオレイン酸過酸化物の投与では毒性が認められなかったが、豚脂の過酸化物を連続加熱して分解させたものにあっては、明らかに毒性を示した事実から、過酸化物自身には一般に毒性がないものと結論している。したがって脂質の過酸化物の毒性は使用油脂の種類に関係があるかも知れない。

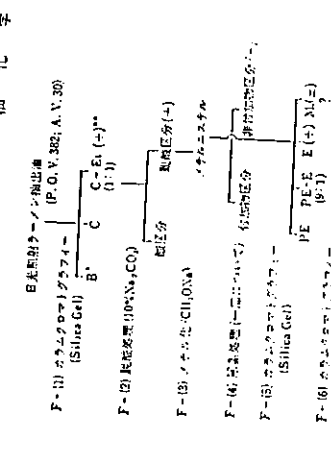
われわれの今回の実験結果においては、上述のように P.O.V. が低下した段階で毒性が強く現われることから、Kaunitz⁵⁾ の見解のように過酸化物の二次的分解産物が本毒性に大きく関与しているものではないかと考えている。

4-2-1-4 照射誘起の毒性抽出油の分別とその性状

正倉⁶⁾は魚油を直接日光にさらし、P.O.V. が最高値から徐々に低下、下降期にはいってからマウスに対する毒性が一段と激しくなる。450~850 hr 照射の抽出油を混合し、これを飼料とし、毒性物質の分別を試みた。この抽出油 (P.O.V. 382; A.V. 30) は特有の酸敗臭をもち、TLC では非照射油に比べ triglyceride が著明に減少し、より極性の高い数多くの分解産物が認められた。また IR では二重結合の減少とともに cis 型から trans 型への高比化、水酸基、カルボニル化合物による吸収の増加が認められ、GLC よりオレイン酸、リノール酸などの不飽和脂肪酸の減少が明瞭であった。さらに従来より自動酸化油の毒性物質として問題になっているとドロペルオキシンドの毒性を検討するため、ヨウ化カリウムにより還元した結果、その毒性には変化なく、むしろ促進される傾向が認められ、毒性の本体はとドロペルオキシンドからの二次的分解産物によるものであらうと推定した。

つぎにこの劣化油の毒性物質の単離を目的に、動物実験を平行させて毒性区分の分別を行なった (図-1)。

分別に伴ってマウスに対する毒性は強まり、F-(6)の各区分では、抽出油 (1.0 ml/マウス) の 1/5~1/10 量で毒性を示し、ヘイ死するものもあった。この f-1~10 区分は、いずれも TLC により、未だいくつかの成分を混入したものであるが、水酸基 1 個持つトリノール酸メチルに比べ、より極性の高いこと、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンやヨウ化カリウム-酢酸によるカルボニルやヒドロペルオキシンドの存在することが認められた。これらはいずれもマウスに對し、毒性を示したが、その強さは一様でなく、とくに F-(6)-8 は最も



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

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

図-2 放射線照射抽出油の分別と毒性

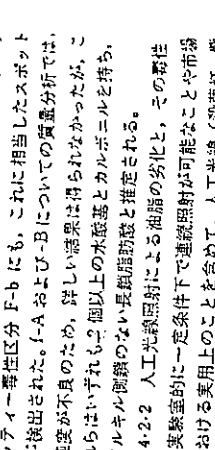
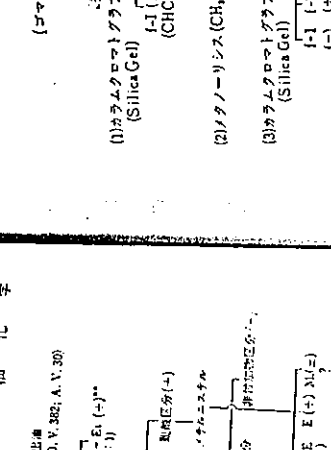
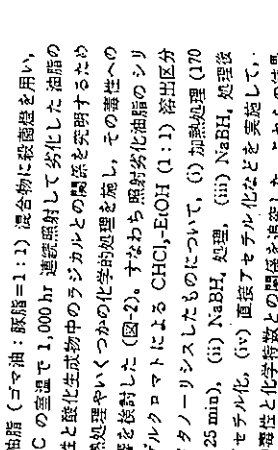


図-3 ラーメン抽出油の GLC, 日光照射の影響



収が強く現われた。また各区分とも IR および TLC での定性反応からニオキシンドは検出されなかった。毒性を有する区分 (f-2~f-7) は直接アセチル化によってその毒性は減弱したが、アセチル化の前、いずれの区分においても、P.O.V. や C.V. が低く、極性の高い区分ほど毒性が強いこと、また粘度が高いことなどから重合物による影響も関与しているのではないかと考えられる。

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

図-5 MO-1,000 の分別と毒性

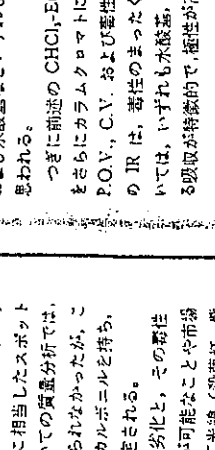
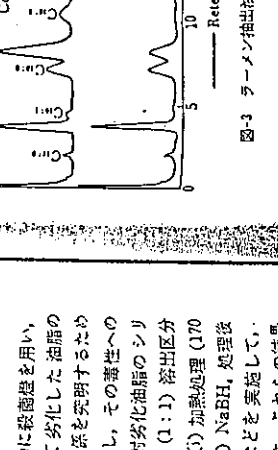


図-4 紫外線照射による P.O.V., A.V. および I.V. の経時変化 (オレイン酸メチル)



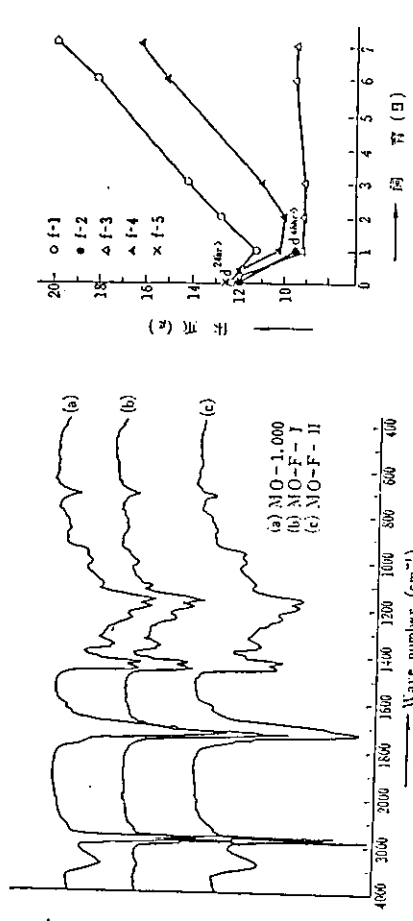


図-6 MO-1,000, -F-I, および -F-II の IR スペクトル

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

4-2-2-2 ポレイン酸メチル誘導体の紫外線照射
揚げん油の酸化と精製脂肪酸の経時的効果および毒性との関係についてみると、とくに不飽和脂肪酸の減少が著しく認められたので(図-3)、これらに用いられる油中に多く含まれるオレイン酸を並び、紫外線照射して経時的な化学構造の変化とその毒性を検討し、あわせて毒性区分の分析を行なった。

化学構造の経時的な変化は図-4に示した。またマウス(0.5 ml/経口投与)に対する毒性は、200 hr 以降にみられ上述と共通した症状を呈し、P.O.V. が最高値に達した 500 hr では5匹中4匹がへい死した。さらに P.O.V. の下降とともに毒性は高まり、1,000 hr 時間の照射時には 0.5 ml/投与で 90 min, 0.4 ml/24 hr 以内にそれぞれへい死した。これらの毒性が認められたものにおいては、一般症状および剖検から中毒後抽出油、あるいは光線照射揚げん抽出油などのものと同様に毒性化が観察された。

つぎに毒性が高く現われた 1,000 hr 照射のオレイン酸メチル(MO-1,000)を用い、毒性区分の分析を図-5に示して行った。F-I では対照同様になく毒性は認められなかったが、F-II (0.3 ml/投与)は投与後 3 hr でへい死した。これらの分析の IR は図-6に示したように毒性を示した MO-1,000 および F-II はいずれも水酸基、カルボニル、および trans 二重結合の吸収、

11) H. Kaunitz, *Food Technol.*, 21, 278 (1967)
 12) K. Lang, A. Fricker, *Z. Lebensmittelunters. u. Forsch.*, 175, 390 (1964)
 13) H. Kaunitz, C.A. Shmetz, R.H. Johnson, H.B. Knight, D.H. Saunders, D. Swern, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38, 611 (1961), *Metab. Clin. & Exp.*, 9, 59 (1960)
 14) N.V. Raju, M. Narayana Rao, R. Rajagopalou, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 774 (1965)
 15) H. Kaunitz, R.E. Johnson, L. Pegus, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41, 770 (1964)
 16) C. Sok, W. Grien, W. Kieckhefer, K.H. Beesler, K. Lang, *Z. Ernähr. Wiss.*, 5, 80 (1964)
 17) B. Poteau, R. Cluzan, *Annls. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 6, 47 (1966)
 18) W. Griem, *Z. Ernähr. Wiss.*, 7, 30 (1966)
 19) E. Arfmann, *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 61, 161 (1964)
 20) A.C. Fraser, *Chem. Indust.*, 1961, 417
 21) H. Kaunitz, D.C. Mallins, D.G. McKay, *J. Exp. Med.*, 115, 1127 (1962)
 22) J. Raulin, *Annls Nutr. Aliment.*, 21, 105 (1967)
 23) P.J. O'Brien, A.C. Fraser, *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 9 (1966)
 24) M.G. Kokarnur, J.G. Bergan, H.H. Draper, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 123, 254 (1966)
 25) *Brit. Med. J.*, 1, 157 (1968)
 26) E.G. Perkins, L.A. Van Alkeren, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 752 (1965)
 27) G.A. Nolen, J.C. Alexander, N.R. Arman, *J. Nutr.*, 93, 337 (1967)
 28) R.G. Krishnamurthy, T. Kawada, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 878 (1965)
 29) T. Kawada, R.G. Krishnamurthy, B.D. Mookherjee, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 44, 131 (1967)

30) R.G. Krishnamurthy, S.S. Chang, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 44, 136 (1967)
 31) K.J. Carpenter et al., *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 25 (1966)
 32) C.H. Lea, L.J. Parr, *Brit. J. Nutr.*, 18, 369 (1964)
 33) C.H. Lea, L.J. Parr, *Brit. J. Nutr.*, 20, 123 (1966)
 34) V.S. Waravdekar, L.D. Sadlaw, W.A. Jones, *Am. J. Path.*, 45, 899 (1964)
 35) J.R. Chipault, R. Mizuno, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41, 468 (1964)
 36) K. Matano, K. Miyaki, S. Honjo, T. Fujiwara, S. Oraki, *Symposium on Chloramide, Hakone, Aug. 16 (1967)*
 37) 福通, 食品衛生研究, 16, 72 (1966); 厚生省食品衛生課資料, 3月(1965)
 38) 三浦, 武彦, 保野, 香木, 食衛生, 7, 67 (1966)
 39) 保野, 土田, 三浦, 武彦, 香木, 油化学会 昭和 42 年度油化学研究発表会, 昭和 42 年 10 月, 名古屋
 40) 三浦, 保野, 香木, 油化学, 16, 503 (1967)
 41) 三浦, 工藤, 土田, 保野, 香木, 油化学, 18, 736 (1968)
 42) N. Matano, *J. Biochem.*, 41, 481 (1954)
 43) T. Kaneda, H. Sakurai, S. Ishii, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 20, 50, 658 (1954)
 44) P. Dobonloz, J. Fondari, C. Legarde, *Biochem. Biophys. Acta.*, 3, 371 (1949)
 45) J.S. Andrews, W.H. Griffiths, J.F. Mead, R.A. Stein, *J. Nutr.*, 70, 199 (1960)
 46) 土田, 保野, 武彦, 香木, 油化学会昭和 43 年度油化学研究発表会, 昭和 43 年 10 月, 東京
 47) 土田, 三浦, 保野, 油化学会第 8 回油化学討論会, 昭和 44 年 11 月, 大阪
 48) 保野, 土田, 三浦, 武彦, 香木, 油化学会第 8 回油化学討論会, 昭和 44 年 11 月, 大阪

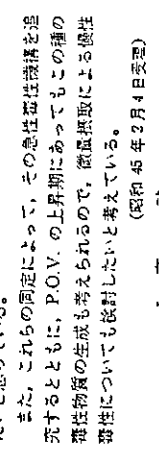


図-7 MO-1,000, -F-1, -F-5 の TLC による毒性化の検討

1) R.H. Barnes, W.O. Lundberg, H.T. Hanson, G.O. Burr, *J. Biol. Chem.*, 149, 313 (1943)
 2) F.W. Quackenbush, *Oil & Soap*, 22, 336 (1945)
 3) E.W. Crampton, R.H. Common, F.A. Farmer, A.F. Wells, D. Crawford, *J. Nutr.*, 49, 333 (1953)
 4) H. Kaunitz, C.A. Shmetz, R.H. Johnson, H.B. Knight, D.H. Saunders, D. Swern, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 33, 630 (1956)
 5) O.C. Johnson, E. Perkins, M. Luzzi, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 34, 594 (1957)
 6) M.R. Sahasrabudhe, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42, 763 (1965)
 7) 松尾: 油化学, 11, 13 (1963)
 8) E.G. Perkins, *Food Technol.*, 14, 508 (1960)
 9) H.W. Schultz, E.A. Day, R.D. Sinnhuber, Ed., (1962), "Lipids & Their Oxidation" Avi Publ. Co., Westport, Conn.
 10) C.H. Lea, *Chem. Indust.*, 1955, 244

自動酸化油脂の毒性に関する研究 (第2報)

自動酸化油脂の酵素に及ぼす影響

吉 岡 俊 子・鈴 本 勝 久・金 田 尚 志

東北大学農学部化学科 (仙台市青葉区)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. II.

The Effects of Autoxidized Oils on the Enzymic Activities

Masako Yoshitake, Fatsushisa Suzuki and Takashi KASEDA
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University
(Tsuwanocho, Aramaki, Sendai)

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

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

1 緒 言

吾等らは前報において自動酸化油脂に生成する有機成分中、ヒドロペルオキシドと不飽和アルデヒドの毒性が最も強いことを報告した。また酸化油脂の毒性は酸化程度により、酸化生成物およびその成分比が異なること、一様に揮じがたないこと、すなわち酸化程度を知ることは、有機成分を決定するより、酸化程度を知るより、自動酸化油脂の毒性を調べるより、酸化程度を知る手段として、P.O.V., CO.V., I.B.A.V. などの化学分析を測定する以外に、酸化脂質と酵素をインキュベートし、インキュベーション後の酵素活性を測定する方法が妥当であるかを明らかにしようとした。報告までに、酸化脂質による種々の酵素の不活性化、タンパク質の変化などに関しはる多くの報告がある。しかし、こ

れらは脂質酸化生成物、おもにヒドロペルオキシドおよびマロンアルデヒドなどの分子構造の発生機構を明らかにしようとしたものが多い。これらの報告を大別すると、1) 酵素不活性化の程度を測定し、2) 脂質とタンパク質の複合形成やマロンアルデヒドの化学変化に関する研究^{1,2)}、3) 脂質酸化生成物による酵素不活性化の反応速度論的研究³⁾ および反応速度に及ぼす温度、pH、抗酸化剤、酸化促進剤の濃度などの諸条件の研究^{4,5)}などに分けられる。本研究は酵素と酸化脂質のインキュベーション後の酵素活性を知ることに、ヒドロペルオキシド、マロンアルデヒドに限らず、種々の酸化生成物が酵素活性に及ぼす影響の強弱を比較し、さらに、この方法がマウスに対する毒性の程度と並行するものであるかどうか、すなわち毒性を調べる方法として通常用いられているマウスによる試験法に代替できる

94) G. Englert, A. Soupe, *Z. Naturforsch.*, **19**, 172 (1964)
 95) G. Englert, A. Soupe, *Mol. Crystal Liquid Crystals*, **1**, 303 (1966)
 96) G.R. Luckhurst, *Österr. Chem.-Ztg.*, **68**, 113 (1967)
 97) A.D. Buckingham, K.A. McLoughlan, *Progress in NMR Spectroscopy*, Ed 2, Pergamon Press, New York (1967)
 98) G.R. Luckhurst, *Quart. Revs.*, **22**, 179 (1968)
 99) A. Soupe, *Angew. Chem.*, **80**, 99 (1968)
 100) L.C. Snyder, S. Neilsen, *J. Chem. Phys.*, **41**, 1480 (1967)
 101) W. Meier, G. Englert, *Z. Elektrochem. Rec. Annalen, Physik. Chem.*, **64**, 689 (1960)
 102) G.P. Casari, H.B. Gray, *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 772 (1969)
 103) H. Kehlert, *Vorlesung zur 70 Hauptversammlung der Deutschen Bauerngesellschaft*, Hannover, (1971)
 104) A. Blumstein, N. Klagsowa, K. Blumstein, *Mol. Crystal Liquid Crystals*, **17**, 273 (1971)
 105) E. Sackmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2667 (1968)
 106) E. Sackmann, D. Rehn, *Chem. Phys. Letters*, **4**, 527 (1970)
 107) H.R. Falle, G.R. Luckhurst, H. Lemstra, Y. Merzbach, A. Rössel, *Proc. Molecular Phys.*, **11**, 49 (1966)
 108) P. Ferruti, D. Gill, M.A. Harwood, M.P. Klein, *J. Chem. Phys.*, **50**, 4543 (1969)
 109) G. Harvach, P. Ferruti, D. Gill, M.P. Klein, *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 7525 (1969)
 110) G. Heppke, F. Schmeiser, *Ver. Deutsches. Physik. Chem.*, **75**, 61 (1971)
 111) D.L. Uhrich et al., *Physic. Rev. Letters*, **24**, 350 (1970)
 112) *Brit. J. 1,123,117* (Westinghouse)
 113) J.L. Ferguson, *Sci. American*, **211**, 77 (1964)
 114) *Chem. Process (London)*, **16**, 44 (1970)
 115) U.S. 3,408,404 (Westinghouse)
 116) U.S. 3,439,525 (Boeing)
 117) *Brit. J. 1,138,590* (NCR)
 118) *Brit. J. 1,161,039* (NCR)
 119) *Deutsche Offenlegungsschrift*, 2,014,969 (Hoffmann-La Roche)
 120) G.V. Lukianoff, *Proc. Intern. Liquid Crystal Conf.*, **7**, 222 (1968)
 121) U.S. 3,440,382 (Westinghouse)
 122) *Deutsche Offenlegungsschrift* 2,012,493 (Liquid Crystals, Ind.)
 123) *Deutsche Offenlegungsschrift*, 2,025,730 (Bio-Medical Sci.)
 124) J.T. Crissey, E. Gordy, J.L. Ferguson, R.E. Lyman, *J. Invest. Dermat.* (Edinburg), **43**, 89 (1969)
 125) M. Gauthier, *J. Physique Radium*, **C4**, 30, 127 (1969)
 126) O.S. Schwarz, H.S. Schwarz, J.F. Holland, *Mol. Crystal Liquid Crystals*, **1**, 495 (1966)
 127) J.L. Ferguson, N.K. Gauthier, R.J. Naudin, *Abstr. Crystal Liquid Crystals*, **269** (1967)
 128) J.L. Ferguson, *Appl. Optics*, **7**, 1729 (1968)
 129) W.E. Woodhouse, *Mater. Evaluation*, **5**, 66 (1969)
 130) B. Belleher, D. Gross, E. Mundry, *Materielwertung*, **11**, 156 (1968)
 131) E.J. Klein, *Astronautics & Aeronautics*, July, 1968, 70
 132) U.S. 3,114,536 (Westinghouse)

Table-2 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on lipase activity at different incubation times.

Table with 3 columns: Autoxidized oil No., Lipase activity (%), Incubation time (min). Rows 1-6 show increasing autoxidation levels and their effects on lipase activity over 0, 60, 120, and 180 minutes.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3 x 10^-3 M

このものは0.5 mlを加えて、インキュベーションを行って、その自動酸化の程度で酵素活性を測定した。その結果、Table-2に示した通り、酸化時間の長い油ほど、酵素の失活が大きい。

Table-4 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on pepsin activity at different incubation times.

Table with 3 columns: Autoxidized oil No., Pepsin activity (%), Incubation time (min). Rows 1-6 show increasing autoxidation levels and their effects on pepsin activity over 0, 60, 120, and 180 minutes.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3 x 10^-3 M

このものは、油を Tween 20 でエマルジョンとし、1 mlを加えてインキュベーションし、前述の方法で酵素活性を測定した。Table-4の結果、酸化時間の長い油ほど、酵素の失活が大きい。

Table-1 Chemical characteristics of oxidized safflower oil.

Table with 4 columns: Sample oil No., M.M., P.O.V., COV, T.R.A.V. Rows 1-6 show chemical characteristics for different oxidation levels.

* Mean molecular weight ** Optical density

この油の酸価、過酸化数、TLCの結果を、Table-1に示す。

Table-3 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on lipase activity at different incubation times.

Table with 3 columns: Autoxidized oil No., Lipase activity (%), Incubation time (min). Rows 1-6 show increasing autoxidation levels and their effects on lipase activity over 0, 60, 120, and 180 minutes.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3 x 10^-3 M

このものは0.5 mlを加えて、インキュベーションを行って、その自動酸化の程度で酵素活性を測定した。その結果、Table-3に示した通り、酸化時間の長い油ほど、酵素の失活が大きい。

Table-5 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on pepsin activity at different incubation times.

Table with 3 columns: Autoxidized oil No., Pepsin activity (%), Incubation time (min). Rows 1-6 show increasing autoxidation levels and their effects on pepsin activity over 0, 60, 120, and 180 minutes.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3 x 10^-3 M

このものは、油を Tween 20 でエマルジョンとし、1 mlを加えてインキュベーションし、前述の方法で酵素活性を測定した。Table-5の結果、酸化時間の長い油ほど、酵素の失活が大きい。

Table-6 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on pepsin activity at different incubation times.

Table with 3 columns: Autoxidized oil No., Pepsin activity (%), Incubation time (min). Rows 1-6 show increasing autoxidation levels and their effects on pepsin activity over 0, 60, 120, and 180 minutes.

Incubation temperature: 37°C Oil concentration: 3 x 10^-3 M

このものは、油を Tween 20 でエマルジョンとし、1 mlを加えてインキュベーションし、前述の方法で酵素活性を測定した。Table-6の結果、酸化時間の長い油ほど、酵素の失活が大きい。

とペーパー活性力が大きいことがわかった。
 2-1-2-4 チトクロームc(9)に対する影響
 2-1-2-4.1 チトクロームcの化学変化測定法
 ポルフィン骨格に基づく、340~600 mμのスペクトルを測定し、吸収帯の変化を記録した後、411 mμのソレーン溶液に添加しないものを100%として、各種酸化油添加チトクロームcの吸光度を比較して、化学構造変化の目安とした。
 2-1-2-4.2 各種酸化油添加における酸化油のチトクロームcに及ぼす影響
 0.02 M, pH 7.3 のリン酸緩衝液に溶かしたチトクロームc溶液(0.01 mg・チトクロームc(1 ml) 3 ml)にインキュベーション溶液での最終濃度が 3×10^{-4} M となるように油類を Tween 20 でエマルジョンとした溶液 1 ml) を加えインキュベーターを行なった後、2 ml のエーテルを加え油層を取り除き前述の方法で吸光度の変化および 411 mμ の吸光度を測定し Fig-3, Table-5 の結果

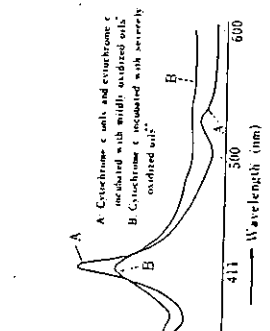


Fig-3 Absorption spectra of cytochrome c after the reaction of cytochrome c with autoxidized safflower oils.

Table-6 Effects of oxidized oils at various stages of autoxidation on cytochrome c.

Autoxidized oil No.	Percentage of O.D. at 411 mμ	
	Incubation time (min)	0
1	100	100
2	100	100
3	100	97
4	100	94
5	96	53
6	96	47

Incubation temperature: 37°C
 Oil concentration: 3×10^{-4} M

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

を得た。Fig-3 のスペクトル A は酸化油を加えないチトクロームc, および No. 1~No. 4 の程度の酸化を受けた油を加えた場合であり、B は No. 5, No. 6 の程度に酸化を受けた油を加えた場合であるが、A ではほぼ変化が見られなかったのに対し、B では 411 mμ のソレーン溶液におよび 533 mμ の吸光度の明らかな減少が観察された。一方 411 mμ における吸光度の変化は Table-6 に示した通り、インキュベーション時間が長くなる

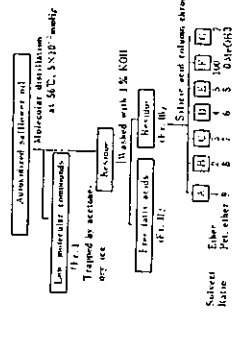


Fig-4 Fractionation of autoxidized safflower oil.

Table-7 Chemical characteristics of fractionated compounds.

Fraction	M.M.		P.O.V.		C.O.V.		T.B.A.V.	
	Wt. %	mes/kg	mes/kg	mes/kg	O.D./kg	O.D./kg	10 ² -mol	10 ² -mol
I	180	1456	416	6063	1095	35.3	6.5	
II	333	149	50	625	208	147.1	49.0	
III-A	836	41	34	45	38	0.9	0.8	
B	847	1049	889	714	605	5.8	4.9	
C	1042	930	959	669	466	7.0	7.3	
D	995	1125	1119	923	923	21.0	20.9	
E	1498	1059	1583	934	1399	14.5	15.0	
F	1951	997	1945	1103	2152	15.1	30.4	
G	2359	1111	2620	1347	3175	20.0	47.2	

* Mean molecular weight
 ** Optical density

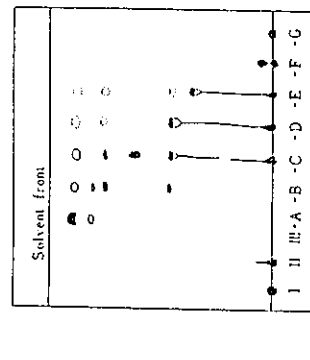


Fig-5 T.L.C. Chromatogram of fractionated compounds on WAKO GEL B-0 detected under iodine vapor.

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

Fractions	Lipase activity (%)			
	Concentration of fractionated compds. (mol)			
	5×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	2.5×10^{-2}
I	38	0	0	0
II	45	15	12	14
III-A	100	100	89	80
B	100	93	52	54
C	100	89	55	50
D	100	87	48	48
E	100	53	41	24
F	92	66	28	31
G	88	75	32	11

Incubated at 37°C for an hour

2-2-2-1 各分画区分のリパーゼ活性に及ぼす影響
 インキュベーション時間および酸化油濃度を変え、各分画区分のリパーゼ活性に及ぼす影響を検討し、Table-8, Table-9 の結果を得た。Table-8 より、インキュベーション時間 60 min, 60 min のいずれにおいても、I 区分、II 区分の酵素活性に及ぼす影響が最大であった。また Table-9 から I 区分、II 区分はかなりの低濃度でも強い失活作用を持つことが明らかであった。III-E, III-F, III-G 区分がこれに続いた。

2-2-2-2 各分画区分のペプシン活性に及ぼす影響
 酸化油濃度を変え、各分画区分のペプシン活性に及ぼす影響を検討し、Table-10 の結果を得た。すなわちどの分画区分においても酸化油を加えなかったブランクよりもむしろ高い活性を示したが、III-D, III-E 両区分による活性化作用がもっとも顕著であった。

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

Fraction	Pepsin activity (%)			
	Concentration of fractionated compds. (mol)			
	5×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-2}
I	125	107	136	
II	125	123	127	
III-A	103	109	105	
B	109	129	105	
C	120	127	125	
D	153	155	152	
E	134	146	150	
F	118	134	133	
G	115	129	125	

Incubated at 37°C for an hour

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

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

Incubated at 37°C for an hour
Oil concentration: $2 \times 10^{-2}M$

酸化油各分画区分を $2 \times 10^{-2}M$ 添加し、1hr インキュベートを行ない、活性を測定し Table-11 の結果を得た。すなわち I 区分による失活度が最も大きく、II 区分、III-D、III-E、III-F、III-G 区分がこれに次いだ。

2-2-2-4 チトクロム c の化学構造に及ぼす各分画区分の影響

各分画区分とチトクロム c とをインキュベートした後のチトクロム c の 340~600 m μ の吸収スペクトルを測定し Fig-8 の結果を得た。酸化油分画区分を添加しなかったチトクロム c のスペクトル A に比べ、III-D、III-E、III-F、III-G の各区分および I 区分を添加し

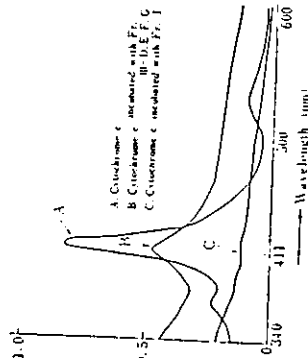


Fig-5 Absorption spectra of cytochrome c after the reaction of cytochrome c with the fractionated compounds of safflower oil.

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

Fraction	Cytochrome c O.D. at 415m μ (%)				
	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}	2×10^{-1}
I	78	12	7	5	5
II	100	100	81	82	82
III-A	100	100	100	94	95
B	100	100	80	58	58
C	100	100	82	64	64
D	100	82	40	27	27
E	100	83	36	19	19
F	100	86	44	24	24
G	100	78	38	30	30

Incubated at 37°C for an hour

Table-16 Characteristics of III-F fraction.

Original III-F Reduced III-F by KI	P.O.V. (%)		C.O.V. (%)		T.B.A.
	997	1103	230	14.4	
15.6	230	14.4			

り、リパーゼの活性度が還元前後ではほぼ同じであったのに対し、チトクロム c の吸光度は、還元することにより、約 2 倍に回復することがわかった。以上により、リパーゼは過酸化油の影響を受けにくい、チトクロム c は過酸化油の影響が大きいように思われた。

3 考 察

前報で、自動酸化油類が過酸化油類は、酸化程度が高く、二酸化生成物の量が増加するほど、マウスに対し強い毒性作用を有することを報告したが、本実験においては、*in vitro* でリパーゼ、パルパイン、チトクロム c、ペプシンを用いた酸化油とインキュベートした後、これらの酵素活性、あるいはタンパク質の化学構造の変化を測定した結果、ペプシンを除き、より高度に酸化された油とインキュベートしたものは、その失活度または化学構造の変化とマウスに対する毒性の程度が並行するように思われた。さらに自動酸化油より分離した各酸化生成物の酵素に対する失活作用の強弱はマウスに対する毒性試験と必ずしも一致しなかったが、前報で報告した、もともと失活度で急激に毒性を示す低分子化合物がペプシンを除く各酵素またはタンパク質に対し、低濃度でしかも短時間で失活作用を及ぼすという結果は、*in vitro* の両実験が並行しているものと推定された。また、遊離脂肪酸区分もマウスに対し低分子区分につき報告を示したことを報告したが、酵素活性においては、リパーゼがこの傾向をもっともよく示していた。チトクロム c は、遊離脂肪酸により大きな影響を受けなかった回復することから、高い T.B.A. 値を示した遊離脂肪酸よりは過酸化油による影響が大きいものと思われた。このように、個々の酸化生成物が種々の酵素に及ぼす失活作用の強弱は、マウスに対する毒性と必ずしも並行したものでないが、酸化程度を知る手段として、リパーゼ、パルパイン、チトクロム c などの酵素の酸化油による失活度を測定し比較することは可能であるように思われる。また、低分子化合物のこれらの酵素に対する強い失活作用は、マウスに対する毒性発生源を推定するものであるからもしれない。ペプシンに関しては、酸

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

4 要 約

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

(昭和 47 年 8 月 29 日受理)

文 献

- 1) 吉岡 安正, 油化学, 21, 316 (1972)
- 2) R.C. Mcknight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 3) P.J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 4) C. Little et al., Biochem. J., 101, 13 p (1966)
- 5) E. Schauenstein, J. Lipid Research, 8, 417 (1967)
- 6) C. Little et al., Biochem. J., 108, 419 (1968)
- 7) L.A. Wittig, J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 905 (1965)
- 8) D.D. Henoley et al., Federation Proc., 20, 298 (1961)
- 9) W.T. Foubal et al., Arch. Biochem. Biophys., 113, 5 (1966)
- 10) F. Andrews et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 42, 779 (1965)
- 11) A.W. Venolia et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 35, 135 (1958)
- 12) I.D. Dessi, J. Lipid Res., 4, 204 (1963)
- 13) K.S. Chio, Biochemistry, 8, 2821 (1969)
- 14) C. Little et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 145 (1968)
- 15) R.E. Marcuse et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 48, 448 (1971)
- 16) C.E. Eriksson et al., J. Amer. Oil Chemists' Soc., 48, 442 (1971)
- 17) G. Marchis-Mouren et al., Arch. Biochem. Biophys., 81, 303 (1959)
- 18) S. Matsushita et al., Agr. Biol. Chem., 34, 825 (1970)
- 19) J.R. Kimmel et al., J. Biol. Chem., 201, 515 (1954)

自動酸化油の毒性に関する研究 (第3報) ヒドロペルオキシアルケナールの毒性発生機構

吉岡 倭子・金田 尚志
東北大学農学部食品化学科 (仙台市:通函町1-1)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. III The Toxicity of Hydroperoxyalkenals

MASAKO YOSHIOKA and TAKASHI KANEEDA
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University
(1-1, Tsutsumidori, Aramaki-cho, Sendai)

It has long been believed that a peroxide (PO) such as methyl inoleate hydroperoxide (MLHP) was the major contributor to the toxicity of autoxidized oils. It was found however, in a previous paper¹⁾ that hydroperoxyalkenals (HPA) ranging in carbon chain from five to nine were the most toxic when the toxicity was compared in terms of a single compound. Furthermore, low molecular weight compounds yielded in autoxidized oils were found to have powerful enzyme-deactivating abilities in the succeeding paper²⁾. Although studies on the toxicity of PO were conducted extensively, no information is available on the toxicity of HPA. Some attempts were made in this paper to cast light to the toxicity of HPA in comparison with that of MLHP.

1) LD₅₀ of HPA and MLHP was determined by both oral administration (OA) and intraperitoneal injection (IJ). HPA was found to be 87 times as toxic as MLHP in the case of OA. There was no discrepancies in LD₅₀ between OA and IJ for HPA, whereas MLHP was found less toxic in OA than IJ.

2) P.O.V.s and CO.V.s of tissue lipids of mice to which maximum amount for survival of HPA and MLHP were administered, were determined. Although the amount of HPA administered to mice was far smaller than that of MLHP, P.O.V.s and CO.V.s were found much higher in HPA-administered mice than in MLHP.

3) The enzyme-deactivating activities of HPA and MLHP were compared *in vitro* using lipase, succinate dehydrogenase and thiokinase. It was evident that HPA deactivated these enzymes more severely than MLHP.

4) Hemolysis rates of red blood cells by HPA and MLHP were determined *in vitro*. HPA was found to have greater hemolytic potentials than MLHP.

From these results authors concluded that HPA appeared to be absorbed from intestine to some extent and transported into tissues where it exerted adverse effects such as deterioration of tissue lipids, deactivation of enzymes and destruction of membranes. MLHP, on the other hand, seemed to be absorbed with greater difficulty than HPA. MLHP also had far less significant effect on enzymes and membranes, if absorbed entirely.

Yoshioka and Kaneda, *Yakugaku Zasshi* 21, 28 (1972) ** Yoshioka, Suzuki and Kaneda, *ibid.*, 21, 88; (1972)

1 緒 言

著者は、本研究の第1報¹⁾において、自動酸化油中の種々の酸化生成物のうち、低分子化合物はペルオキシド (PO)よりも強い毒性を有し、なかでもヒドロペルオキシアルケナール(HPA)は著大なことを報告した。

さらに、*in vitro*の実験において、低分子化合物は酵素失活作用が強いことを報告した²⁾。POの毒性発生機構に関しては多方面から研究が進められているが、これら(注1) ペルオキシド(PO)と関連する場合は、従来から動物実験自動酸化油の毒性の本質といわれてきたPOのよう³⁾に、第1報で述べた、炭素数5-9の HPA に比べ高分子のPOをさす。

CaCO₃が、(M.I):C.V.=562 mg-CaCO₃/g⁴⁾と大きくなり効果的であると思われる。またオキサジリオン酸とオキサジリオン酸では分子量の相異のほかは、キレート環を考えた場合、オキサジリオン酸は5員環となり、一方オキサジプロピオン酸は6員環を形成することが予想される。これらの5員環もしくは6員環は通常安定であるとされているが、双方のキレートの安定性のわずかの差が洗浄力に影響を与えるのではないかとと思われる。

次に、Table-3, Table-5 より STPP とこれら試料との二種のビルダーを混合した場合、明確な相乗効果は認められなかった。逆に STPP と (N) のナトリウム塩、および STPP と (X) のナトリウム塩の組み合わせでは、かなり大きな洗浄力の低下現象が見られた。しかしこれらの現象は単体の洗浄力と同様、他のビルダーの配合、洗浄条件その他によって変動するものであり、本実験のみでは二種の混合には必ずしも相乗効果を期待できない事実を示すにとどまるものと思われる。

著者は、この点、系統に調査いたしました山内一臣、正村健二氏、白根卓氏に、また元素分析を依頼し、たまたま、併用三部式原子吸光法の測定を要します。

(昭和48年12月25日受理)

文 献

- 1) G. Zen, *Chemiker Zeitung*, 96, 685 (1972)
- 2) C.A. Wilhelm, C.L. Medinette, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 48, 682 (1971)
- 3) V. Lamberte, *Can. J. Chem.*, 55, 547 (1977)
- 4) K. Schube *et al.*, *Ger. Offen.*, 2,115,875 (1992)
- 5) G.P. Laubus, *Seifen, Öle, Fett, Wachs*, 99, 89 (1972)
- 6) H.A. Rusem *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 65, 25 (1943)
- 7) R.V. Christian, Jr., R.M.Hixon, *J. Amer. Chem. Soc.*, 70, 1333 (1948)
- 8) J.F. Walther *et al.*, *U.S. 3,382,671* (1964)
- 9) 岡部, 加藤, 肥後, 鈴木, 岩田, 油化学, 18, 81 (1969)
- 10) E. Harrison, *R. Max. Brit. Pat.*, 628,499 (1950)
- 11) 阿部, 菅本, 宮田, 油化学, 22, 156 (1971)
- 12) *Pat.*, 879,682 (1957)
- 13) R. Fuhrmann *et al.*, *U.S. 3,340,858* (1967)
- 14) A.F. Gallagher, H. Hbbert, *J. Amer. Chem. Soc.*, 58, 813 (1936)
- 15) W.J. Poppel, *J. Polymer Sci.*, 51, 864 (1961)
- 16) 菅田, 岩田, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 49, 161 (1972)
- 17) R.R. Rolland, *Soap & Chemical Specialties*, 1965 (9), 58

Table-5 Detergent effects of binary compounds. (%)

(1) STPP	(VI)-Na	Detergent effect
100	0	0.55
70	30	0.150
30	70	-0.50
0	100	-0.65

(2) STPP	(VII)-Na	Detergent effect
100	0	0.45
70	30	0.15
30	70	0.15
0	100	0.15

(3) STPP	Sodium rosinate	Detergent effect
100	0	0.25
70	30	0.10
30	70	-0.10
0	100	-0.25

さらには STPP-(VI)-Na, STPP-(VII)-Na, STPP-X ナトリウムビルダーのおおの二種のビルダーの混合物を試験ビルダーとして用いた結果を Table-5 に示した。

3 実験結果の考察

以上の実験結果よりこれら二種並置のナトリウム塩の洗浄力はトリポリリン酸ナトリウムに比べていくらか劣るが、(N)のみのナトリウム塩はビルダーとしての機能を充分もたらすに値するものと思われる。またこれら二種並置ナトリウム塩の中では、オキサジリオン酸の方が一般にオキサジプロピオン酸よりも洗浄力がすぐれていることが認められた。さらに同系列のオキサジリオン酸では分子量の小さいものの方がすぐれているが、これは常盤⁵⁾がポリエチレングリコールで得た傾向と一致している。本実験では二種並置の二種並置ナトリウム塩を STPP のかわりに単独で用いた場合、(N) のナトリウム塩が最もすぐれた洗浄力を示した。洗剤の洗浄力に及ぼすトリポリリン酸ナトリウム (STPP) の作用は、水の硬度を下げるキレート作用、油粒の付加、微生物の抑制、汚物の再付着防止作用、油粒の乳化作用などが考えられているが、これらの中で水の軟化作用について考えると、試験ビルダーが類似の構造を持つ場合には、分子量の小さい (N) の塩の方が (X) の塩に比べて全炭素イオンとのキレート価 (N):C.V.=746 mg.