

は去に *in vitro* における酵素活性作用¹⁰⁾、タンパク質
 変性作用¹¹⁾、溶血作用¹²⁾であり、また *in vivo* にお
 いては PO の吸収機構を探索したものであり、吸収
 機構に關しては、そのまゝの形で吸収され、分解
 分解後吸収される¹³⁾、か、排泄されるものが多い¹⁴⁾と
 する説と、吸収され、肝臓に蓄積されるといふ説¹⁵⁾と
 に分かれています。後者は、PO の毒性は、吸収さ
 れた後、肝臓に蓄積され、肝臓の諸作用を及ぼすもの
 と解される。このように、PO の毒性発現機構は、見
 解を異にしちがらも、研究が進展してきている。一方、
 吾等らにより、HPA は最も毒性が強いことが明らかと
 なった。いかなる成程、毒性が発生するか不明であ
 る。本報では、HPA の毒性発現機構を推定し、PO の
 それと、比較検討したものである。なお、本研究では、
 PO としてリノール酸、オレフィン、ステロイド、MLP、
 HPA を選んだ。

2 実験および結果

2-1 HPA と MLHP の LD₅₀
 前述のように、吾等らは、第 1 報で、自動酸化リノ
 ル酸オレフィンの種々の酸化生成物の中 HPA は PO 以上
 に強い毒性を有することを明らかにしたが、この HPA
 と PO の毒性発現機構を比較検討する一手段として、両
 物質の経口投与方法、経口内注射法の二法による、マウ
 スに対する LD₅₀ を求めた。

2-1-1 HPA、MLHP の経口
 第 1 報で述べた方法を、HPA と改題した。すなわ
 ち、リノール酸を 60°C で自動酸化させ、過酸化
 物油 (P.O.V.) が最大値を通過 (約 1,500) 付近にまで下がり、
 カロチノール値 (CO.V.) が約 1,500 付近にまで下が
 り、オレフィン分子蒸留し、低分子化合物を分離した。さら
 に、この低分子化合物 10g を、ブライカラムアロマト
 グラフイーソシリカゲル 320g をつめた 2cm x 2.2
 m のナイロンチューブに充填し、ベンゼンで洗
 脱し、ベンゼンが下流に達したとき層間を終わらせ、22
 の区分に切り分けた。各区分をニテール抽出し、IR、
 TLC によりその組成を検討し、22 区分のうち 1 区分に
 HPA を得た。本 HPA の P.O.V. は 14.4 eq/kg であり、
 IR より、3,450 cm⁻¹ に -COOH 基または -OH 基によ
 る吸収、1,665 cm⁻¹ の共役アルデヒド、980 cm⁻¹ に
trans-二重結合が認められた。また、SnCl₄ で -COOH
 基を -OH 基に変換後、2,4-ジニトロフェニルヒドロ
 ン誘導体とし、phenoxynol imprinted Wakogel
 B-0 アレート上でフェニルニトロシノノル、ヒドロ
 キシオクテナール、ヒドロキシヘキセナール、ヒドロ
 キシペンテナールに相当する四つのスポットを得た。ま

た、その mol 比は 2.3:3.5:1:0.3 であった。これよ
 り平均分子量は 146 であることがわかった。

2-1-2 MLHP の調製

5°C で 20 日間、徐々に吹き込み自動酸化させ、P.O.
 V. が約 800 に達したリノール酸オレフィンを、HPA 同様
 の方法でブライカラムアロマトグラフィーにより、石
 油ニテール、エチルニテール (4:1) で分離した。本
 MLHP の P.O.V. は 6,118 (理論値 = 6,125) であり、
 石油ニテール、エチルニテール (4:1) を用いて
 洗脱し、Wakogel B-0 の共役アルデヒドアロマト上
 で、単一のスポットを得た。また、IR より、-COOH
 基が認められた。*trans*-二重結合を 980 cm⁻¹ に認め
 た。UV 吸収は共役二重結合に基づく 260 mμ の ϵ_{max}
 が 28,500 であった。

2-1-2 HPA と MLHP のマウスに対する LD₅₀
 2-1-1 で得た HPA、MLHP をリノール酸オレフィ
 ンから、1 群 8 匹より成る 20g 程度の 14D 系雌マウ
 スに経口投与方法、経口内注射法によりそれぞれ、48 hr 経過
 し、Behrens 法に於いて LD₅₀ を求め、Table-1 の結
 果を得た。

Table-1 LD₅₀ of HPA and MLHP.

Oral administration	LD ₅₀	
	g/mol/30g mouse	μmol/kg mouse
HPA	9	32
MLHP	9	36

Table-2 P.O.V. and CO.V. of tissue lipids of mice administered orally toxic compounds yielded in autoxidized methyl linoleate.

Compound administered	Time after administration (hr)				
	3	24	P.O.V. CO.V.	P.O.V. CO.V.	
Stomach	HPA ¹⁾	10.1	80.9	11.0	55.8
	MLHP ²⁾	2.3	10.7	2.1	5.7
	HA ³⁾	1.3	49.3	1.4	13.8
Small intestine	A ⁴⁾	1.2	43.5	0.3	12.5
	ML ⁵⁾	0.8	1.1	0.3	1.3
	HPA	9.1	85.5	10.8	43.2
Liver	MLHP	1.3	12.0	1.1	3.2
	HA	1.2	38.1	1.3	8.8
	A	1.7	49.8	1.6	6.6
Liver	ML	0.8	1.2	0.1	1.2
	HPA	12.0	73.7	15.4	51.3
	MLHP	2.6	5.3	2.3	1.7
Liver	HA	1.5	13.8	1.3	7.9
	A	1.3	15.6	1.0	5.1
	ML	0.8	1.1	0.7	1.8

1) Hydroperoxyketenal
 2) Methyl linoleate hydroperoxide
 3) Hydroxyketenal
 4) Alkenal
 5) Methyl linoleate

2-2 自動酸化油の酸化生成物である HPA、MLHP は

消化器管で分解されるが、MLHP には、かなりの量が
 消化器管で分解されるが、MLHP には、かなりの量が
 消化器管で分解されるが、MLHP には、かなりの量が
 消化器管で分解されるが、MLHP には、かなりの量が

2-3 *in vitro* における HPA、MLHP の酵素・赤血球凝縮

2-3-1 酵素 (lipase, succinate dehydrogenase, thiokinase) に及ぼす影響

2-3-1-1 lipase 活性
 眼イオン水 (pH=6.0) に溶解したリノール酸 (4mg/ml) 5 ml にインキエニール溶液に於ける赤血球凝縮

2-3-1-2 赤血球凝縮 (ステアリン酸) タイプ II

2-2 *in vivo* における HPA、MLHP の体内に及ぼす影響

HPA、MLHP による代謝障害の一現象として、両物質を
 経口投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法

2-2 *in vivo* における HPA、MLHP の体内に及ぼす影響

HPA、MLHP による代謝障害の一現象として、両物質を
 経口投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法

2-2 *in vivo* における HPA、MLHP の体内に及ぼす影響

HPA、MLHP による代謝障害の一現象として、両物質を
 経口投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法

2-2 *in vivo* における HPA、MLHP の体内に及ぼす影響

HPA、MLHP による代謝障害の一現象として、両物質を
 経口投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法
 により投与方法、経口内注射法により投与方法、経口内注射法

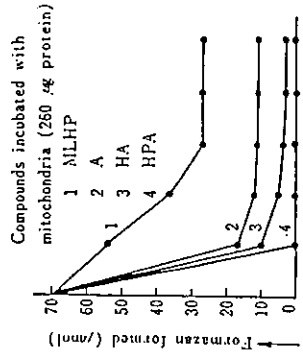


Fig. 2 Effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on succinate dehydrogenase activities.

succinate dehydrogenase 活性の測定時と同様に調製したミトコンドリア懸濁液 5 ml にインキキムベーション溶液における最終濃度が 0.5~2.0 x 10⁻⁴ M となるように 85% エタノールに溶解した酸化生成物 0.1 ml を加え、37°C で 5 min、インキキムベーションを行った。インキキムベーション後、succinate dehydrogenase 活性と同様に方法でミトコンドリアを分離し、0.25 M sucrose sol. に再懸濁後、Mabier らの方法で CoA の -SH 基の減少量をニトロプロピルナトリウムにより比色定量し、活性度を測定した。すなわち、0.15 ml 中に 0.17 μM-CoA, 1.1 μM-ATP, 2.5 μM-MgCl₂, 10 μM-グリシルグリシン (pH=8.0), 1 μM-KBH₄, 5 μM-butylate を含む懸濁液に、1 ml の酵素ミトコンドリア懸濁液 (1 g 肝臓 1 ml シュ糖液) を加え、38°C, 10 min、インキキムベーションした。10 min 後、2.0 ml 飽和 NaCl sol. (27 mg sodium nitroprusside/ml) を加え、遠心分離後、520 mμ の吸光度を測定し、Table-3 の結果を得た。本結果より、lipase, succinate dehydrogenase 同様、thiokinase は HPA によって、最も強く共活を受

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

Oxidation products	Percentage of O.D. at 520 mμ	
	2 x 10 ⁻⁴ M	0.5 x 10 ⁻⁴ M
MLHP	74.0	87.8
HPA	4.8	8.9
HA	33.7	68.8
A	49.0	72.7
ML*	98.1	98.8

incubated at 37°C for 5 min
incubated with mitochondria (560 μg protein)
* methyl linoleate

ことが明らかとなった。
2-3-2 赤血球膜に及ぼす影響 (溶血率の測定)
HPA, HA, A, MLHP の溶血率を Capalina らの方法に基づいて求めた。すなわち、Iseu らの方法で得た赤血球を 0.9% NaCl で洗浄後、0.2 M-リン酸緩衝液に懸濁した (1~5%)。この赤血球懸濁液 0.2 ml を、一定量の HPA, HA, A, MLHP に加え、37°C, 30 min インキキムベーションした。30 min 後、対照 (R₀) には、水を加え、3,000 回転で 5 min 遠心分離後、上清を 550 mμ で比色し、溶血率を下記の Iseu²¹⁾ の公式で求め、Table-4 の結果を得た。
% hemolysis = $\frac{R_1 - R_0}{R_2 - R_0} \times 100$
(R₁: 試験液に酸化生成物を加えた場合、R₂: 酸化生成物を加えない場合)
(R₀: 水により 100% 溶血をおこした時)

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

Compounds	% mol to produce 50% of hemolysis
MLHP	11
HPA	0.037
HA	4.3
A	8.7

本結果より、HPA の溶血作用が著しく強いことが明らかとなった。

3 考 察

自動酸化油の種々の酸化生成物のうち、最も毒性が強いと考えられた PO は、HPA の毒性に比べて、著しく弱さを有することが第 1 報で明らかとなったが、さらに、これは、本報告の *in vitro*, *in vitro* の両系統に於いて、比較することから明らかとなった。HPA と PO (MLHP) の作用を比較する場合は、おのおの分子の化学的性質も同時に考慮することは重要深いことであると思われる。すなわち、HPA は MLHP 同様、-OOH 基を有し、かつ、取り扱われる際、分解を免れるため、細心の注意が必要であったことが明らかとなった。不安定、即ち反応性に富んでいて、これは、分子量の差からくるものと考えられた。HPA, MLHP を投与した際の代謝産物の一現象を観察したにすぎないが、HPA の高い反応性による、脂質変性の表れであるものと思われる。また、この反応性は、脂質変性以外に、HPA 投与時の胃、小腸の出血、および脂質以外の組織結核生成物との反応 (表 2-2-2)。さらに、*in vitro* の実験 (2-3) においては、強い HPA の酵素共活力の他にも、リパーゼとイン

4 要 約

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

キムベーション開始後、直ちに、インキキムベーション溶液不透明物質が沈降したこと、ミトコンドリアの変色が認められたことなどから明らかであった。また、化学的性質の相違の一つとして、HPA は MLHP より hydrophilic であった (実験 2-3-1) が、この性質は、体内作用機構を考慮する場合、重大な意義を持つものと思われた。実験 2-2, 2-3 より、HPA は MLHP より取り除かれやすいこと、体内組織への移動が易いこと、脂質失活作用が強いことなどが明らかとなったが、これは、上記のように、HPA が MLHP より hydrophilic であることも一原因であると思われる。さらに、2-1-1 で LD₅₀ を求めた際、致死量を投与した HPA には、経口投与法によっても、経口内注射法によっても、投与後、直ちに、行動が異常になり、外見上の変化はなく、死亡したことを述べた。この症状は Findrey らによって報告された気体状酸化油による呼吸機能の損傷の症状と類似していた。一方、PO (MLHP) を経口内注射した実験動物にも、同様の症状が認められたが、経口投与法によったものには、この症状は見られず、MLHP が吸収されにくいことが推測された。この誤解からも、HPA の吸収のされやすさ、体内留連への移動の容易さが考えられた。今までに報告されたペルオキシド (MLHP) による中毒症状は、工業、貯蔵、燃焼、タントラメンによる中毒症状は、工業、貯蔵、燃焼、と類似しており、これはむしろ MLHP 投与した場合と同様に類似しているが、この例のように、酸化油全体の毒性を考慮する場合には、その発生して考えた必要があり、HPA のような酸化生成物の持つ毒性の定数を、全酸化油による症状と比較して、酸化生成物の全酸化油に及ぼす毒性の寄与の程度を知ることは困難であると思われる。すなわち、自動酸化油の毒性は、第 1 報でも述べたように、種々の酸化生成物の総和であり、酸化生成物の量比を知ることは、論じられぬが、単一の物質の毒性の程度を比較する場合には、HPA が最も強い毒性を有することが明らかである。

4 要 約

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

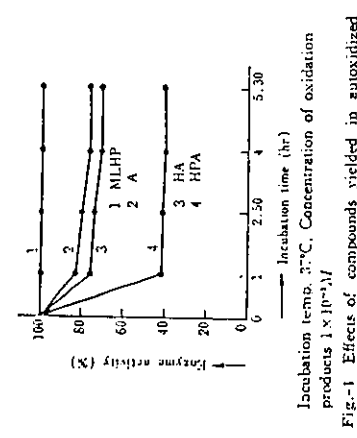


Fig. 1 Effects of compounds yielded in autoxidized methyl linoleate on lipase activities.

が 1 x 10⁻⁴ mol とするに、85% エタノール (3) に溶解した酸化生成物 0.5 ml を加え、37°C で一定時間インキキムベーションし、インキキムベーション後、エーテルで酸化生成物を除去し、第 2 報で述べた連続測定法で活性度を求め、Fig-1 の結果を得た。これより、HPA の共活性が最も大きいことが認められた。

2-3-1-3 succinate dehydrogenase 活性

Schneider らの方法により調製したミトコンドリアを、0.25 M-シュ糖液 5 ml に懸濁し、この懸濁液に、インキキムベーション溶液における最終濃度が 1~5 x 10⁻⁴ M となるように、85% エタノールに溶解した酸化生成物 0.1 ml を加え、37°C で 5 min、インキキムベーションした。インキキムベーション後、酸化生成物を除くため、0.25 M-シュ糖液による洗浄、遠心分離 (10,000 G, 20 min) を 3 回繰り返して、得たミトコンドリアを 1 ml の 0.25 M-シュ糖液に再懸濁し、本ミトコンドリアの succinate dehydrogenase 活性を比色定量した。すなわち、肝臓ミトコンドリアを酵素源とし、コハク酸がフマラ酸に酸化される反応と、triphenyltetrazolium chloride (TTC) が formazan に還元される反応を共役させ、formazan 量を比色定量した²²⁾。上記のミトコンドリアに懸濁液 1 ml を 37°C, 5 min、ブレインキムベーションを行い、5 min 後、0.5 M-コハク酸ナトリウム、0.1 ml および 1.5% (v/v) TTC 0.1 ml を加え、反応を開始し、10 min インキキムベーションを行った。その後、トリクロル酢酸を加え、反応を止め、百酸エチル 4 ml で formazan を抽出し、530 mμ で比色定量し、E₅₃₀ = 16,700 より formazan 量を求め、Fig-2 の結果を得た。本結果より HPA の著しく強い共活作用が認められた。

2-3-1-3 thiokinase 活性

注 3) 85% エタノールは MLHP が溶解する最終濃度であり、MLHP を溶解した同濃度の懸濁液と酵素懸濁液の混合液には、多少の誤りが認められた。一方、HPA, HA, A は 85% 以下のエタノールとも均一な溶液を作った。

に、少なくとも一部は吸収され、体内組織に運搬され、代謝系酵素に限定的に働いたり、筋組織をざい弱体化せたりするものと思われた。一方、MLHP は、体内の臓器に運ばれにくいものと思われ、各組織に運ばれたものは、HPA 同様の作用を及ぼすものと推測された。しかし、その作用の程度は、HPA に比べると、かなり弱いものであった。

(昭和 48 年 9 月 18 日受理)

文 献

- 1) 吉岡, 幸田, 油化学, 21, 28 (1972)
- 2) 吉岡, 杉本, 金田, 油化学, 21, 881 (1972)
- 3) P. J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1966)
- 4) A. L. Tappel, Arch. Biochem. Biophys., 80, 326 (1959)
- 5) A. Onolenghi et al., Arch. Biochem. Biophys., 56, 157 (1955)
- 6) F. Bernheim et al., Arch. Biochem. Biophys., 38, 177 (1952)
- 7) E. D. Wills, Biochem. Pharmacol., 7, 7 (1961)
- 8) C. Little et al., Biochem. J., 101, 13 P (1966)
- 9) R. C. McKnight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 10) A. L. Tappel et al., Arch. Biochem. Biophys., 80,

- 326 (1959)
- 11) H. Zalkin et al., Arch. Biochem. Biophys., 88, 113 (1960)
- 12) L. A. Witting, J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 908 (1965)
- 13) J. S. Andrews et al., J. Nutr., 70, 199 (1960)
- 14) T. Nishida et al., J. Lipid Res., 1, 450 (1960)
- 15) J. G. Bergana et al., Lipids, 5, 976 (1970)
- 16) T. Kaneda et al., J. Biochem. (Tokyo), 42, 561 (1955)
- 17) J. Bunyan et al., Brit. J. Nutr., 22, 97 (1968)
- 18) 日本油化学協会誌 "基礎油分析試験法" p. 120 (1966), 朝倉, 東京
- 19) 藤沢, 大沢, 油化学, 14, 167 (1965)
- 20) D. L. Stann et al., J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 920 (1965)
- 21) W. C. Schneider et al., J. Biol. Chem., 183, 123 (1950)
- 22) A. Ogano et al., J. Biochem., 50, 197 (1966)
- 23) H. R. Mahler et al., Biol. Chem., 204, 453 (1953)
- 24) S. Capalba, Rev. Roum. Physiol., 7, 1 (1970)
- 25) C. C. Teep, Canad. J. Biochem., 38, 857 (1960)
- 26) G. M. Findlay, Lipids, 5, 970 (1970)
- 27) 厚生省食品衛生課資料 March (1965); 三折分, 仮訳誌, 7, 67 (1966)

自動酸化油の毒性に関する研究 (第 4 報)

自動酸化油投与時の代謝障害

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

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. IV.

Impairments of Metabolic Functions Induced by Autoxidized Methyl Linoleate

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

Before 1962, the studies on the toxicity of autoxidized oils were conducted using either partly fractionated autoxidized oils or intact oils. From these works, it was generally concluded that peroxides were the most toxic compounds yielded in autoxidized oils. With improvements in methods for preparation of pure hydroperoxides, much attention had been paid to the toxicity of hydroperoxides. It was found however, in previous papers¹⁻³ that the toxicity of autoxidized oils come from all the toxic compounds and not from a single compound and that with no information concerning composition of oxidation products, it was not determined which compound was the major contributor to the toxicity. Early works which concluded that peroxides were the most toxic, were carried out when P.O.V.s of autoxidized oils were on the increase. Therefore, peroxides were presumably the major component in these autoxidized oils. Thus, it is significant to investigate the toxicity of autoxidized oils with various properties as well as a single compound in autoxidized oils. The present paper is concerned with investigation of relationships between properties of autoxidized oils and the degrees of impairments of metabolic functions induced by them.

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

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

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

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

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

* Yoshioka and Kaneda, *Yakugaku Zasshi*, 21, 28 (1972) ** Yoshioka, Suzuki and Kaneda, *ibid.*, 21, 863 (1972)

1 緒 言

著者は、既報¹⁾で、自動酸化油の種々の酸化生成物のうち、低分子化合物はペルオキシド(PO)ほりに、

(注 1) ペルオキシド(PO)と記述する場合は、従来、不飽和脂肪酸の自動酸化油の毒性の本題といわれてきた PO のように、第 1 報で述べた炭素数 5~8 の HPA に比べ、高分子の PO をさす。

強い毒性を有し、そのうちでもヒドロペルオキシアルケナル (HPA) が最も強い毒性を有することを報告した。さらに、*in vitro* の実験で、低分子化合物は酵素失活作用が強いことを述べた。また、HPA と PO の毒性発生機構を比較し、HPA は PO より吸収されやすき、組織への移動がより容易であり、より強い脂質変性力、酵素失活作用、溶血作用などを有することを推定した。同時に、ある酸化段階における自動酸化油の毒性は、その時存在した種々の酸化生成物の総和であるため、酸化程度を知り、酸化生成物の量に明らかにした上で、いかなる物質が、毒性に最も寄与しているかを論じた。1962 年以前には、単一の酸化生成物を単離することなく、自動酸化油全体、あるいは原薬付加法、溶剤分別法などにより、ある程度分離したものを投与し毒性を検討したものが多くあり、これらの研究より、PO が毒性に最も寄与することが明らかとなった。以後、PO の一つであるヒドロペルオキシド (HPO) の単離技術の進歩とともに、自動酸化油中の一酸化生成物である HPO の消化・吸収状態、毒性発生原因^{10,11)} などに関心が注がれるようになった。しかし、上述のように、自動酸化油の毒性は、酸化程度を明らかにしただけでは論じられない。著者は、PO が毒性の本態であるとして、研究は、過酸化物質 (P.O.V.) が上巻の原稿にあり、PO は酸化生成物の主成分である場合であると推定した。このように、単一の酸化生成物の毒性を検討することも意義のあることであるが、同時に、酸化油全体を投与した場合の毒性を検討することも重要である。第 1 報で、著者は、酸化時間が長く、2 次酸化生成物量の多いものマウスでの死亡率が高かった。また、第 2 報の *in vitro* の実験で、同様なものほど、酵素失活作用が強いことを報告したが、本報告では、ラットに、酸化程度異なる自動酸化油を少量、長期間にわたり投与し、その代謝産物を比較することにより、いかなる性状の自動酸化油が、より有害であるかを検討した。

2 実験および結果

2-1 試料油の調製

リノール酸メチルに 40°C で酸素を吹き込んで自動酸化し、過酸化物質 (P.O.V.)¹²⁾ を酸化程度を目やとして、段階的に 4 種の酸化エステルを採取した (Fig-1)。すなわち、自動酸化のごく初期に採取した No. 1, P.O.V. が極大に近い付近で採取した No. 2, 増加した P.O.V. が、さらに減少時に採取した No. 3, 4 の 4 試料である。4 試料の P.O.V., カルボニル価 (CO.V.)¹³⁾ を Table-1 に示した。

2-2 ラットの飼育

上記 4 種の酸化エステルを 1 群 20 匹よりなる 150g の異なる酸化油を投与したラットの体重の変化を毎日測定した。自動酸化油の体積に及ぼす影響、自動酸化油による代謝産物の一環として、酸化程度異なる自動酸化油を投与したラットの体積の変化を毎日測定した。

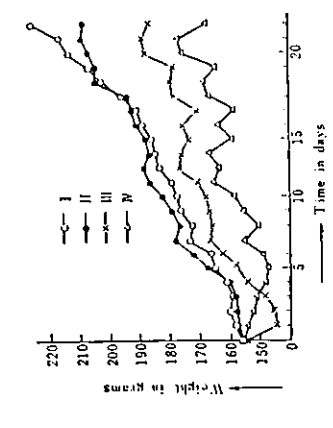


Fig-1 Autooxidation of methyl linoleate.

Table-1 P.O.V. and CO.V. of autooxidized methyl linoleate.

No.	P.O.V. (meq/kg)	CO.V. (meq/kg)
No. 1	8	20
2	2,205	875
3	922	1,400
4	420	1,675

自動酸化ニステラルの投与群をおのの I-IV 群とした。飼育時の体重変化は、Fig-2 の通りで、P.O.V. の高い油の投与群 (II 群) より P.O.V. が減少時に採取した油の投与群 (III, IV 群) の方が体重増加が小さいことが明らかとなった。

Table-2 Composition of diets.

Dietary component	Amount (g)
Safflower oil	5.0
Casein	20.0
Starch	69.26
McCullum salt	3.0
Cellulose	2.0
Choline chloride	0.24
Vitamin mixture	0.5
Vitamin	Amount (g)
p-Aminobenzoic acid	1
Inositol	1
DL-α-Tocopherol	1
l-Ascorbic acid	1
Thiamine	6.5
Sodium panthothenate	0.4
Nicotinic acid	0.4
Vitamin B ₁₂	0.0003
Riboflavin	0.2
Pyridoxine	0.1
Vitamin A	20,000 IU
Vitamin D	2,000 IU
Folic acid	0.02
Biotin	0.01
Casein	44

The amount of autooxidized methyl linoleate administered to a rat was 1/1000 of a rat body weight per day.

Table-3 P.O.V. and CO.V. of tissue lipids of rats administered orally autooxidized methyl linoleate.

Tissue	Group of rats	P.O.V. (meq/kg)	CO.V. (meq/kg)
Intestine	I	6.8±0.3*	28.8±0.9
	II	7.0±0.2	39.7±1.0
	III	19.0±0.2	37.2±1.0
	IV	40.2±0.7	78.2±1.0
Liver	I	3.8±0.3	41.3±1.0
	II	6.3±0.3	52.7±1.0
	III	18.7±0.5	72.1±1.1
	IV	38.8±0.7	132.8±1.6
Testicle	I	3.2±0.3	20.6±0.7
	II	6.1±0.4	24.8±0.8
	III	7.6±0.3	23.7±0.7
	IV	11.0±0.6	25.1±1.0
Kidney adipose tissue	I	2.0±0.2	7.1±0.3
	II	1.8±0.2	10.6±1.0
	III	2.3±0.3	18.0±0.7
	IV	4.8±0.3	31.0±0.8

* Mean ± standard error of 5 rats/group

Table-4 Hemolysis of red blood cells of rats administered orally autooxidized methyl linoleate.

Hemolysis (%)	
Group of rats	
I*	II
5.5±0.3	10.7±0.5
	14.4±0.5
	24.9±0.9

* Mean ± standard error of 5 rats/group

り破壊もしくは弱体化されるといわれている¹⁴⁾が、酸化程度異なる自動酸化油を 22 日間投与したラット (Table-2) の溶血率を過酸化水素法¹⁵⁾で測定した結果 (Table-4)、PO 含量の多い No. 2 の酸化ニステラルの投与群よりも、2 次酸化生成物量の多い No. 4 の酸化ニステラルの投与群の方が、高い溶血率を示すことが認められ、赤血球膜は PO のみならず、2 次酸化生成物によっても弱体化されることが明らかとなった。

2-5 酵素 (succinate dehydrogenase, thiokinase) 活性に及ぼす影響

succinate dehydrogenase は TCA サイクルの一生成物であるコハク酸をフマル酸に酸化する酵素であり、thiokinase は脂肪酸の β 酸化の際、脂肪酸を acyl CoA に活性化させる酵素であるが、ともにミトコンドリア中に存在する。ミトコンドリアは PO により膜組織が破壊され酵素活性が失われるといわれている¹⁶⁾。本実験では、HPO のような一酸化生成物を取り出すことのない、酸化程度異なる自動酸化油を投与したラットの両酵素活性を測定することにより、いかなる性状の自動酸化油の酵素失活作用が大きいかを検討した。なお、I, II 群は実験 2, 3, 7, 4 同様、酸化ニステラル No. 1, No. 2 を投与したラットであるが、III 群は、2, 3 の IV 群、すなわち、No. 4 (P.O.V.=420, CO.V.=1,675) を投与したラットである。

2-5-1 succinate dehydrogenase 活性

I-III 群のラット肝臓ミトコンドリアを酵素液とし、第 3 報同様、コハク酸がフマル酸に酸化される反応と、triphenyltetrazolium chloride (T.T.C.) が formazan に還元される反応を共役させ、formazan の発色量¹⁷⁾を測定した。

Table-5 Succinate dehydrogenase activities of rat liver mitochondria.

Formazan formed (μmol/mitochondria 280 μg protein)	
Group of rats	
I	II
78±1*	70±1

* Mean ± standard error of 5 rats/group

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

し、活性度を測定した。すなわち、Schneiderら¹⁾の方法により、ラット肝臓 1g より調製したミトコンドリアを 0.25 M-シス糖溶液、1 ml 懸濁し、37°C、5 min、ブレインキベーター後、コハク酸ナトリウム、I.T.C. を加え、反応を開始し、10 min、インキベーターした。インキベーター後、トリクロル酢酸で反応を止め、酢酸エチルで formazan を抽出し、520 m μ で比色定量し、formazan 量を求め、Table-5 の結果を得た。本結果より、I 群より III 群の酵素活性が低いことが明らかであり、succinate dehydrogenase は PO よりも、2 次酸化生成物により、より大きく活性を受けることがわかった。

2.5-2 thiokinase 活性

succinate dehydrogenase 活性の測定時と同様、Schneiderら²⁾の方法により、I~III 群のラット肝臓よりミトコンドリアを調製し、本ミトコンドリアを酵素源とし、第 3 報と同様に、Mahlerら³⁾の方法により CoA-SH 基の減少量をニトロプロピルシドナトリウムにより比色定量し、活性度を測定した。すなわち、1 ml の酵素ミトコンドリア懸濁液 (1 g 肝臓/0.25 M-シス糖溶液) を CoA, ATP, MgCl₂, glycylglycine, KBH₄, butyrate を含む 0.15 ml の基質溶液に加え、38°C、10 min、インキベーター後、2.0 ml 飽和 NaCl sol. 0.4 ml. Na₂CO₃-NaCN. 0.4 ml/ nitroprusside reagent を加え、遮光分離後、520 m μ の吸光度を測定し、Table-6 の結果を得た。

Table-6 Thiokinase activities of rat liver mitochondria.

Group of rats	O.D./protein (μ)	
	I	II
	7.53 \pm 0.64*	6.87 \pm 0.64
		5.32 \pm 0.71

* Mean \pm standard error of 5 rats/group
I, II and III represent groups of rats administered No. 1, No. 2 and No. 4 in Table-1.

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

3 考 察

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

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

4 要 約

自動酸化油を少量、長期間にわたり投与し、いかなる性状のものか、代謝障害をおこす割合が大きいかわきを検討するため、酸化程度の異なる自動酸化油を投与したラットの体脂肪の性状、溶血率、酵素活性などを代謝障害の一現象として調べた。その結果、阻害度は、PO の多少よりも、2 次酸化生成物含量に左右されることが明らかとなった。

(昭和 48 年 9 月 2 日受理)

文 献

- 1) 石岡, 金田, 油化学, 21, 28 (1972)
- 2) 吉岡, 鈴木, 金田, 油化学, 21, 881 (1972)
- 3) 吉岡, 金田, 油化学, 23, 321 (1974)
- 4) 金田, 松井, 石井, 日外誌, 20, 50, 658 (1954); *J. Biochem.*, 42, 563 (1955)
- 5) 松尾, *J. Biochem.*, 41, 481, 647 (1954)
- 6) E.H. Gross et al., *Experientia*, 9, 189 (1953)
- 7) C.E. Poling et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38, 315 (1962)
- 8) J.S. Andrews et al., *J. Nutr.*, 70, 189 (1960)
- 9) I.P. Freeman, *Chem. Ind.*, 1954, 1543
- 10) J. Bunyan et al., *Brit. J. Nutr.*, 22, 97 (1968)
- 11) J. Glavind et al., *Acta Physiol. Scand.*, 49, 97 (1960)
- 12) T. Nishida et al., *J. Lipid Res.*, 1, 450 (1960)
- 13) I.D. Desai et al., *J. Lipid Res.*, 4, 204 (1963)

- 14) W.T. Roubal et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 5 (1966)
- 15) W.T. Roubal et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 150 (1966)
- 16) F. Andrews et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 779 (1965)
- 17) E.D. Wills, *Biochem. Biophys. Acta*, 98, 238 (1965)
- 18) 日本油化学協会編「産油油質分析試験法」, p.170 (1966), 朝倉, 東京 (1950)
- 19) A.S. Henick et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 31, 88 (1954)
- 20) D.L. Stamm et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 920 (1965)
- 21) L.A. Wittig, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 908 (1965)
- 22) 池田, 杉山, *Vitamins (Japan)*, 37, 31 (1968)
- 23) P.J. O'Brien et al., *Proc. Nutr. Soc.*, 25, 9 (1966)
- 24) A. Orano et al., *J. Biochem.*, 60, 197 (1966)
- 25) W.C. Schneider et al., *J. Biol. Chem.*, 183, 123 (1950)
- 26) H.R. Mahler et al., *Biol. Chem.*, 204, 453 (1953)

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

Table with 3 columns: Oxidized ester No., Numbers killed within 18 hr, 48 hr, 72 hr. Rows 1-8 showing increasing toxicity with oxidation time.

Five mice were used for each group.

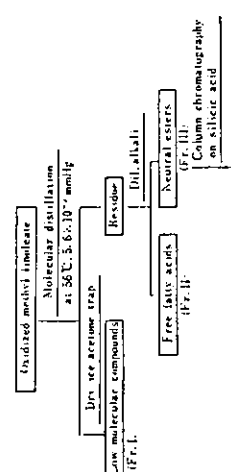


Fig. 2 Fractionation of autooxidized esters.

3 自動酸化油脂の毒性区分の分画

自動酸化エステル中のいかなる成分の毒性が最も強いことを明らかにするために、毒性の差を利用して分画を試みた。前述の通り本区画の P.O.V. は 603, C.O.V. は 7983 であり、平均分子量は小さく反応性に富むものと...

Table-2 Characteristics of fractionated compounds.

Table with 4 columns: Fractions, P.O.V., C.O.V., M.M.W.*. Rows I-IV showing characteristics of different fractions.

* Molar molecular weight

** The reaction was carried out in sealed ampoules.

3-3 分画区画の毒性試験

分画した各区画を体重 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 区画の毒性が最も強く、II 区画、III 区画、IV 区画がこれに続く。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 区画は胃の黒変が顕著であったのに対し、II および III-D 区画の胃は一見充血ともいへる状態であった。

4 低分子区分 I の毒性

低分子区分中のいかなる物質が強い毒性を示すかを明らかにするために、毒性の差を利用して分画を試みた。前述の通り本区画の P.O.V. は 603, C.O.V. は 7983 であり、平均分子量は小さく反応性に富むものと...

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. Rows 1-22 detailing subfractions and their properties.

* Saturated aldehyde

** Unsaturated aldehyde

*** 2,4-Dinitrophenylhydrazine

4-1 低分子区分 (Fr. I) の毒性

4-1 で分画した各区画のうち、IR で同一官能基を持つものと思われる区分は、Table-4 に示すように I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F とし、これら各区画の毒性を比較した。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 分子中に -OOH 基とカルボニル基とを有すると思われる物質 (I-D) の毒性が最も強いことを認めた。I-D 区分に続きヒドロキシ・カルボニル化合物区分 (I-E), (I-F) が強い毒性を示した。おのおの分画区分投与後の死亡直後の内臓を観察すると、I-D を与えたものの胃は黒ずんだ赤色で半透明状に変化しているのに対し、I-C 区分では胃・腸に異常な影響が見られた。これは hex-2-en-1-ol, oct-2-en-1-ol を投与したものとまったく一致した症状であった。I-22 は、-OOH, -OH, -COOH などの混合物であるが、この区分投与後の内臓は著しく黄カク色に変化していた。

4-3 I-D 区分の同定

I-D 区分の IR 図 (Fig-3) より 3450 cm⁻¹ の -OOH または -OH による吸収、1685 cm⁻¹ の共役アルデヒド、980 cm⁻¹ の trans 二重結合が特定された。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、NI-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-DNP 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 phenylmethanol 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きと取り薄層測定および元素分析を行った結果、I-D-1, mp=153°C, C=53.62%, 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 hydroxyphenol, 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、クロロホルム中の可視部吸収は 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る。一方 I-D-2, I-D-3 の炭素ベクトルを測定した。(Fig-4) I-D-2 は測定できなかった。I-D-3 に関しては測定不可能であったため acetate にした。I-D-3 に関しては測定した。Fig-4 の上部に示した m.f.c.=294 は hydroxyhexenal の分子量であり、m.f.c.=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.f.c.=57, 237 は水素の再配列およびアルデヒド炭素値の C₆ と C₇ 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.f.c.=36 は hydroxyhexenal の acetate の分子量であり、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.f.c.=364 は hydroxyoctenal の分子量であり、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.f.c.=42, 154, 202, 246 のピークの帰属は明らかでないが、Esterbauer¹⁰, Sherman¹¹, Grard¹² ち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 CH₃ の 3 個のプロトンに τ=6.5 は -CH₂- の 2 個のプロトンは、τ=5 は -N-H- 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- のプロトンに帰属され、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、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}-\text{OH}$ のピークの形が変わったことが認められた。これらのことから -OH 基はアルデヒド炭素の 4 位にあり、I-D-3 は 4-hydroxy-hex-2-en-1-al であることが明らかとなった。Fig-6 も Fig-5 同様に帰属され、4-hydroxy-oct-2-en-1-al、4-hydroxy-non-2-en-1-al であることがわかった。なお I-D-4 は炭素が少なく、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、hydroxyphenomenal 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-al 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

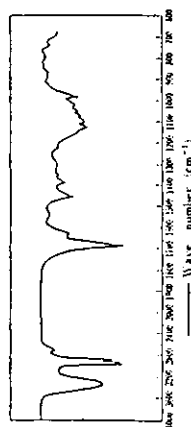


Fig-3 IR spectrum of I-D fraction.

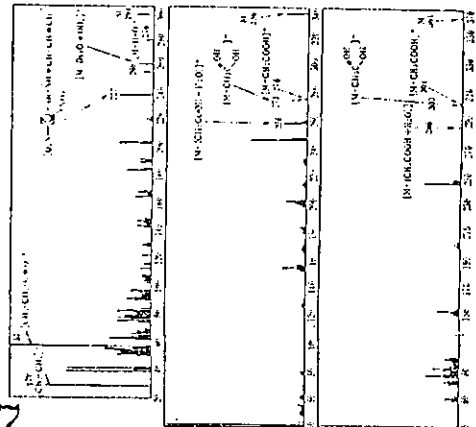


Fig-4 Mass spectra of I-D-3 (top), acetate of I-D-3 (middle) and acetate of I-D-2 (bottom).

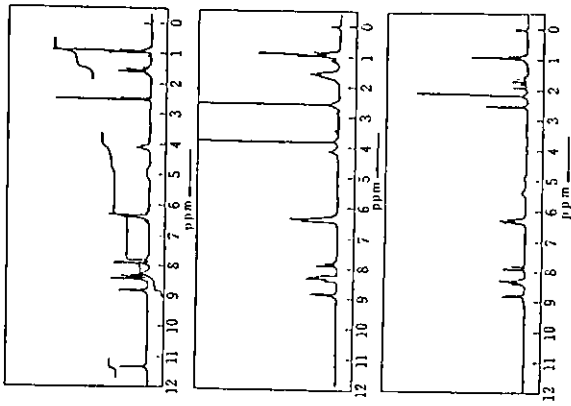


Fig-5 NMR of I-D-3 (top), D₂O added (middle) and acetate of I-D-3 (bottom) in DNMSO-d₄.

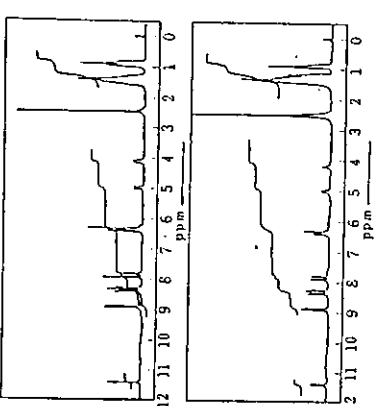


Fig-6 NMR of I-D-2 (up) and I-D-1 (down) in DNMSO-d₄.

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

4-4 低分子区分の毒性への寄与の程度
2-1-1 で酸化時間の長いものほどマウスに対する毒性が強く、また 3-3 で種々の酸化生成物のうちでも低分子区分が最も強い毒性を示すことを指摘したが、この低分子区分の毒性の程度は全酸化油の毒性に比してどの程度のものであるかを調べるため、以下の実験を行な

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追って 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取量が減少し、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.	CO.V.	Numbers Killed**	Yield of low molecular compds. (%)
1	1,820	1,820	0	0
2	1,621	1,522	1	0
3	421	1,709	5	1

* 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

自動酸化油中の有害物質として従来から指摘された脂防酸エステル、または酸の過酸化生成物の毒性は、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-al 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異な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、低分子化合物が最も有害物質となる。また種々の有害物質の量比も問題である。このように、自動酸化油の有害成分に関する物質が最も強い毒性を示すことには、いかなる物質が最も強い毒性を示すのか明言できない。しかし、種々の成分を単一物質として取り出し、その毒性の強弱を問題とする場合には、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-al が最も強い毒性を示すことが明らかとなった。有害物質の毒性発生機構に関しては、病理学的研究を必要とするが、マウスの死亡直後の内臓の症状を観察すると、この簡単な操作から判断すると、種々の有害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た。一方 P.O.V. がピークに達し、CO.V. が急激に上昇し始めるとヒドロペルオキシドの二次酸化生成物である低分子化合物が主として毒性に寄与するようになる。また低分子化合物のうちでも炭素数 5~9 程度の 4-hydroperoxy-2-en-1-al の毒性が最も強いことを見いだした。

2) 種々の有害物質の毒性発生のメカニズムは、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) 釜田ら、日本産誌、19, 171 (1953); 20, 50, 658 (1954); 21, 54 (1954); J. Biochem., 41, 327 (1954); 42, 581 (1955); 東海外研報, No. 12, 1 (1955)
- 2) 土田ら、油化学協会誌、昭和 44 年、大塚
- 3) E. Schausstein, J. Lipid Res., 8, 417 (1967)
- 4) P. J. O'Brien et al., Proc. Nutr. Soc., 25, 9 (1965)
- 5) R. C. McKnight et al., J. Biol. Chem., 241, 2757 (1966)
- 6) H. O. Christophersen et al., Biochem. J., 100, 95 (1966)
- 7) C. Little et al., Biochem. J., 102, 10 P (1966); 101, 13 P (1966); C. Little, Biochem. Biophys. Res. Comm., 31, 145 (1968)
- 8) P. J. O'Brien et al., Biochem. J., 103, 32 P (1967)
- 9) I. D. Desai et al., J. Lipid Res., 4, 204 (1963)
- 10) J. S. Andrews et al., J. Nutr., 70, 199 (1960)
- 11) 竹内、ビタミン、36, 187 (1967)
- 12) R. T. Holman et al., J. Amer. Oil Chemist's Soc., 42, 702 (1965)
- 13) P. Dobozoz, Biochim. Biophys. Acta, 3, 371 (1949) H. Esterbauer, Monatshefte Fur Chemie, 98, 194 (1967)
- 14) J. C. Sheehan, J. Amer. Chem. Soc., 71, 1437 (1949)
- 15) M. Gard, Ann. de Chim., 10, 336 (1930)

TO による毒性発生機構については、緒言で述べたように、油脂の消化率の低下、酵素作用の不活性に伴う代謝異常、Toc および必須脂肪酸の欠乏に基づく生理作用の低下と肝臓内の必須脂肪酸の酸化促進作用などがあり、上記以外に本実験のように、タンパク質およびアミノ酸の供給に伴う阻害作用もあるかも知れない。今後、タンパク質およびアミノ酸の面からさらに毒性問題について検討したい。ところで、従来、変質油の毒性を低くする方法として、ピリドキシン、リボフラビン、トコフェロールなどのビタミン類の補充、良質タンパク質の多量投与(基本飼料に30%)²¹⁾などが報告されているが、それぞれ効果的であったビタミン、タンパク質およびアミノ酸の補充にあたっては、毒性を防止する意義があるのかも知れない。

終わりにアミノ酸の分析に謝辞をいいたい。I 学研農大教授に感謝致します。

(昭和48年3月9日受理)

文 献

- 1) 松尾, 油化学, 12, 263 (1963)
- 2) E.W. Crampton *et al.*, *J. Nutrition*, 43, 431, 533 (1951); 44, 177 (1951); 59, 333 (1953); 60, 13 (1956); 62, 341 (1957)
- 3) D. Firestone *et al.*, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 34, 263 (1961)
- 4) N.R. Botumbo, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 39, 25 (1962)
- 5) E.G. Perkins, F.A. Kummerow, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 36, 371 (1959)
- 6) L.W. Hollenman, D.R. Koelhears, *Rec. Trav. Chim.*, 54, 666 (1959)
- 7) S.S. Weinstein, A.M. Wynne, *J. Biol. Chem.*, 112, 641 (1935)
- 8) H.J. 清井, 油化学, 14, 520 (1965)
- 9) 松本, 油化学, 19, 66 (1970); 20, 20 (1971)
- 10) D. Firestone *et al.*, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*,

- 38, 253 (1961)
- 11) 大原, 金田, 油化学, 17, 69 (1968); 18, 486 (1970); 19, 1071 (1970); 21, 13 (1972)
- 12) S. Lassen *et al.*, *Arch. Biochem.*, 23, 1 (1949)
- 13) A. Roy, *Ann. Biochem. Exp. Med. (India)*, 4, 71 (1964)
- 14) 梶本, 栄養と食糧, 14, 170 (1961); 15, 216 (1962)
- 15) D. Kritchevsky *et al.*, *Federation Proc.*, 20, 283 (1961)
- 16) E. Arfman, *Acta. Path. Microb. Scand.*, 51, 161 (1964)
- 17) P.D. Klein, R.M. Johnson, *Biol. Chem.*, 48, 380 (1954)
- 18) P.D. Talpole, Jr. J.N. Williams, *J. Biol. Chem.*, 217, 227 (1955)
- 19) E. Levin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 225, 15 (1957)
- 20) H.O. Kunkel, Jr. J.N. Williams, *J. Biol. Chem.*, 189, 755 (1951)
- 21) T. Hayashida, O.W. Portman, *J. Nutr.*, 81, 103 (1963)
- 22) A.L. Tappel, H. Zalkin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 326 (1959)
- 23) T.D. Desai, A.L. Tappel, *J. Lipid Res.*, 4, 204 (1963)
- 24) S.R. Taunenbaum, H. Barth, J.P. Letroux, *J. Agr. Food Chem.*, 17, 1353 (1968)
- 25) 梶本, 吉田, 飼料比較論叢中
- 26) 梶本, 油化学, 14, 167 (1965)
- 27) 梶本ら, 栄養と食糧, 22, 587 (1969)
- 28) 梶本, 吉田, 油化学, 21, 307 (1972)
- 29) M.C. Reporter, R.S. Harris, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 38, 47 (1961)
- 30) E. Degkwitz, K. Lang, *Fette-Seifen Anstrichmittel*, 64, 893 (1962)
- 31) 福祉, 油化学 20周年記念大会論叢, 11月(1972)
- 32) L.A. Wittig *et al.*, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 9, 421 (1957)
- 33) S.M. Greenberg, A.C. Frazer, *J. Nutr.*, 50, 421 (1953)

リノール酸メチルの酸化生成物とその毒性

土田 雅子・三浦 利之・武藤 健・宮本 高明

国立予防衛生研究所(品川区上大崎 2-10-35)

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

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

- 1) A number of methyl linoleate derivatives, all highly purified, were examined on their toxicities for the mice and the chick embryos. Each substance was administered to the mice with a gastric tube or to the yolk sacs of the chick embryos through the egg shells with an injector. The results obtained from both animals were quite similar.
- 2) The compounds used in this experiment were as follows; methyl hydroperoxyoctadecadienone (HPO), methyl hydroxyoctadecadienone (HO), methyl ketoctadecadienone (K), methyl hydroperoxyepoxyoctadecanoate (HE), methyl trihydroxyoctadecanoate (T), methyl octadecadienone (*trans*, *trans*-conjugated) (γ -C), methyl epoxyoctadecanoate (α -unsaturated) (E α), methyl epoxyoctadecanoate (β -unsaturated) (E β), methyl linoleate (ML), and methyl ricinoleate (MR). Five compounds from the top of the above, especially HE, proved to have strong toxicities as compared with methyl linoleate. When the relation between the radicals in these compounds and their toxicities was investigated, the toxic strength came in the order of $-OOH>-CO>-OH$.
- 3) The characteristic disorders were found in all the mice administered with toxic substances, in more or less degree. Those were atrophy of the spleen, marked dilatation of the intestine, several histological changes in the lymphatic system, and decrease in the leucocyte count in the blood.
- 4) It was shown that the toxic lesions in the mice induced by these compounds were quite the same as those by the rancid edible oils seen previously. These results indicate that the toxicity of rancid edible oils is the sum of the toxicities of numerous oxidation products.

1 緒 言

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

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

連、マウスに発現する諸病変(化合物によって病状に程度の差はあるが、共通していた)について検討した結果、変化した食用油脂の毒性とまったく一致した傾向を示すことを確認した。これらの成績より、変敗油脂の毒性は単一の物質ではなく、数多くの酸化生成物のもつ複合的な毒性によるものであることを明らかにした。

2 実 験

2-1 試 料

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

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

Table-1 Samples prepared for biological examination.

(HPO)	9(or 13) -C-C-C-C-C- OOH
(K)	-C-C-C-C-C- O
(HO)	-C-C-C-C-C- OH
(HE)	-C-C-C-C-C- OOH
(T)	-C-C-C-C-C- OH
(i-C)	-C-C-C-C-C- OH
(E)	-C-C-C-C-C- OH
(E ₁)	-C-C-C-C-C- OH
(ML)	-C-C-C-C-C- OH
(MR)	-C-C-C-C-C- OH

トリウムおよび水でそれぞれ数回洗浄、硫酸ナトリウムで脱水し、減圧下で溶媒を留去した。
T: UV 照射した ML より、前報¹⁾に従って分離精製した。

i-C: リノール酸をアルカリによって共役化¹⁾、さらにヨウ素-光によりエライジン化の後²⁾、硫酸-メタノールでメチル化した。
E₁, E₂: i-C および ML をそれぞれ HE の場合と同様にエポキシ化し、E₁ および E₂ を調製した。
上記試料は、いずれも 2°C でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、使用時以外は、-20°C のフリーザー中に保存した。

2.1.2 試料の同定 主として IR, UV スペクトル, TLC などにより試料の同定を行なった。IR は日本分光 IR-G を用い、試料は液膜あるいは固体膜として測定供した。UV は高津 QR-50 により、0.001% エタノール溶液として測定した。
2.1.3 試料の純度 各試料の薄層クロマトグラムのデンシトメトリーにより求めた。すなわち、呈色はリモンブレン酸誘導体後、100°C, 7 min の加熱により、明日香工業 Ozumori SD-91 によって測定した。

2.2 毒性試験

毒性試験の対象動物には、鶏ハイおよびマウスを用いた。鶏ハイ法³⁾では、白色レグホン有精卵(6日令)を使用し、試料は注射器により卵黄ノック内へ注入して、3日後の LD₅₀ によってその毒性を表わした。投与量が 50 μl 以下の場合には、対照の ML で総容量が 50 μl になるように希釈して投与した。マウス法では、dd Y/S の

雄(3週令)を用い、試料を胃ゾンデにより経口投与し、24 hr 後の体重、へい死率をもつて毒性の指標とした。

2.3 マウスの血液および病理組織学的検査

毒物に対する感受性を高めるために一夜絶食させたマウスについて、上記同様の方法によって試料投与 24 hr 後に閉頭し、血液中の赤血球および白血球数、肝臓、ヒ臓、ジン臓重量(体重比)を測定、さらに各臓器の組織学的検査を実施した。

3 結果および考察

3.1 試料の同定

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

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

K については、2,4-ジニトロフェニルヒドラン反応陽性で、IR では (Fig.-3, I), *trans, trans*-共役ジエンの特性吸収、すなわち 1682, 1650 および 1632, 1565, 998 cm⁻¹ にそれぞれカルボニル、*trans, trans*-共役ジエンの吸収を認められたこと、また K を水酸化ホウ

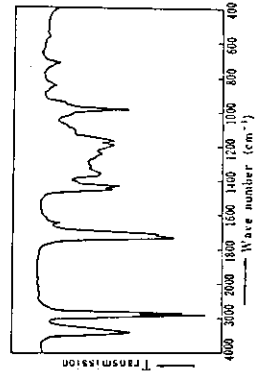


Fig-1 IR spectrum of HPO.

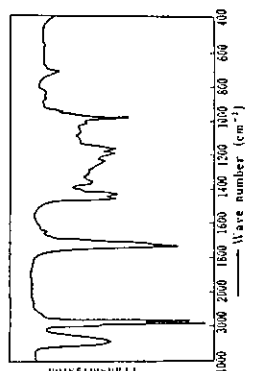


Fig-2 IR spectrum of HO.

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

HE: TLC 上でヨウ化カリウム-酢酸およびビロリン酸-ピリジン 陽性なことから⁵⁾、ヒドロペルオキシ、エポキシ基の存在を推定した。また IR では (Fig.-5), I が化学的に認識したもので、II の自動酸化生成物中より分離したものとまったく一致した。バウマンを示し、すなわち 3,400 cm⁻¹ に -OOH, 880 cm⁻¹ にエポ

キシンの吸収(水酸化ホウ素ナトリウム処理で消失)を認められたことにより同定した。

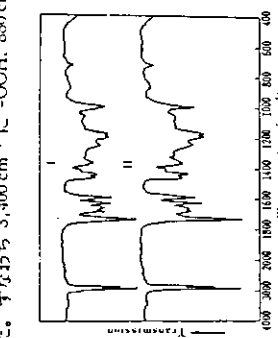
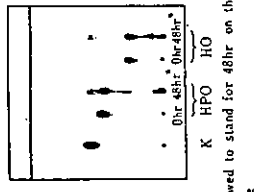
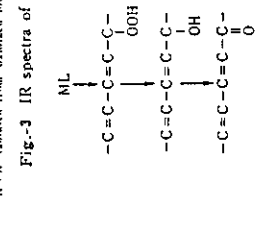


Fig-3 IR spectra of K.



Allowed to stand for 48hr on the TLC plate

Fig-4 Formation of K from ML.

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

T: さきと同定した結晶¹⁾との IR スペクトル、過ヨウ酸酸化による反応生成物、またはホウ酸添加薄層プレートでの R_f の比較により T であることを確認した。i-C: UV スペクトルで 231.5 nm に極大吸収、IR スペクトルでは (Fig.-6), 985 cm⁻¹ に吸収を認め、*trans, trans*-共役二重結合の存在が推定された。

E₁: IR スペクトルで (Fig.-6), i-C の *trans, trans*-共役二重結合の特性吸収 (985 cm⁻¹) が消失し、新たに 962 cm⁻¹ に孤立二重結合、876 cm⁻¹ のエポキシの吸収(水酸化ホウ素ナトリウム処理で消失)を認め、また TLC 上でエポキシ陽性反応を示したことなどから α 位不飽和のエポキシドであることを推定した。

E₂: E₁ と同様に変性反応でエポキシ陽性を示し、IR で (Fig.-6), 3,020 cm⁻¹ に *cis* 二重結合、830 cm⁻¹ にエポキシの吸収(水酸化ホウ素ナトリウム処理で消失)を認められたことにより同定した。

3.2 純度

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

3.3 毒性試験

鶏ハイに示した LD₅₀ は Table-3 に示した。この表は毒性の強いものから順に列記したものであるが、HPO およびその二次生成物に相当する HE, K, T, HO はいずれも対照の ML に比べて強い毒性を示した。この中でも最も強いのは -OOH とエポキシを同一分子内にもつ HE であった。ラジカル相互では、分子内の 1 個のラジカルのみを異にする HPO, K, HO の三つの化合物を比較することにより、-OOH > -CO > -OH の順で -OOH が最も強い毒性を示すことがわかった。一方 *trans, trans*-共役二重結合では、i-C の結果から単独ではほとんど毒性は認められなかった。

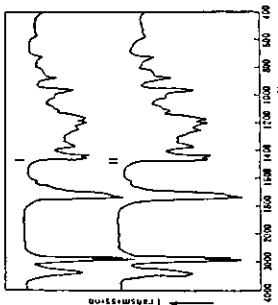


Fig-5 IR spectra of HE.

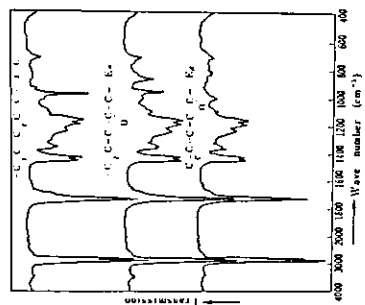


Fig-6 IR of derivatives from ML.

Table-2 Purity by TLC.

Sample	Purity (%)
HPO	92
K	96
HO	93
HE	92
T	98
CT	94
E _a	97
E	96
ML	97
MR	98

* Densitometry
PMA, 100°C, 7min.

しかし、ラットで血液凝固因子への影響を報告した例もあり¹¹⁾、共役結合の数が3個(キリ油)になると、毒性が強まるともいわれている^{12),13)}。ニボキシラジカルでも、 α 位あるいは β 位に二重結合をもつE_a, E_bについては、同様に強い毒性は認められなかった。しかしHEにみられるようにヒドロペルオキシラジカルの共存によってその毒性は著しく増強することがわかった。ヒドロキシラジカルでは、その数の多いほうが強く(T>HO)、また、1個の-OHであってもHOが α 位不飽和のたぬかMRに比べて著しく毒性を異にしている。 α 位不飽和ヒドロキシラジカルについては、不活性な β 位に比べ毒性のあることが報告されている¹⁴⁾。以上のように

Table-3 LD₅₀ of ML derivatives for chick embryos.

Sample	LD ₅₀ (μ l/egg)
-C=C-C=C-C-OH	2.4
-C=C-C=C-C-OH	5.0
-C=C-C=C-C-OH	5.5 (mg)
-C=C-C=C-C-OH	10.0
-C=C-C=C-C-OH	14.0
-C=C-C=C-C-OH	125
-C=C-C=C-C-OH	200<*
-C=C-C=C-C-OH	630
-C=C-C=C-C-OH	800<*
-C=C-C=C-C-OH	800<*

* No more doses were examined.

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

Table-4 Toxicity of ML derivatives for mice.

Dose (ml)	Sample	No. of mice	Change in body weight (%)
0.5	ML	3	6
	HO	2	-16
0.4	ML	3	8
	I-C	3	8
	E _a	3	3
	K	2	-9
	HO	2	-16
	HPO	2	-20
0.3	ML	3	8
	E _a	3	5
	I-C	3	4
	HO	2	-7
0.2	K	2	-10
	HPO	2	-19
	HE	2	d
	ML	4	7
0.1	I-C	4	7
	E _a	4	4
	HO	3	3
	K	4	2
0	HPO	4	-17
	HE	4	d
	ML	2	7
	E	2	-11 and d
0	-	4	6

* Change in body weight at 24 hr after administration.

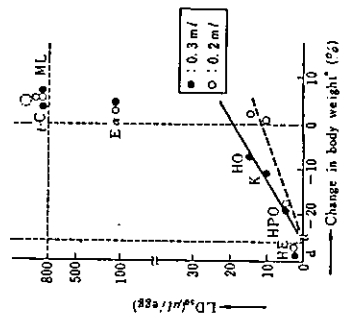


Fig-7 Relation between LD₅₀ for chick embryos and change in body weight of mice.

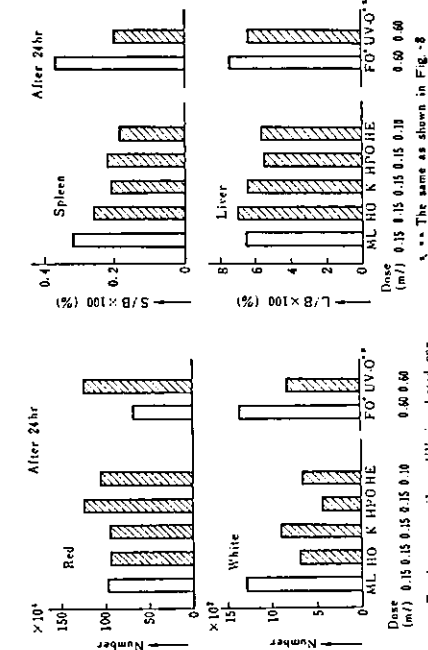


Fig-8 Number of red and white blood cells of mice administered ML derivatives.

では0.1 ml ですでに強い毒性が現われており、鶏ハイ脂も変敗によってまったく一致した。この関係は Fig-7 によってより明瞭に示すことができる。すなわち、縦軸に鶏ハイの LD₅₀、横軸にマウスの体重要変化を自盛るとき、両法の間には逆線関係が成立し、良好

を併記し、ML 誘導体の場合と比較したところ、食用油も変敗によってまったく同一の傾向が認められた。

次に剖検所見では、小腸の弛緩部が特徴的で、腎臓内には水溶性物質が充満していた。脳器血腫では (Fig. 9)、七臓の著明なイ縮が認められた。肝臓でもいくら



Fig-10 Atrophy of the spleen* (H-E, x6)



Fig-11 White pulps* were decreased in size and less distinct. Number of erythrocytes in the sinusoids was diminished. (H-E, x100)

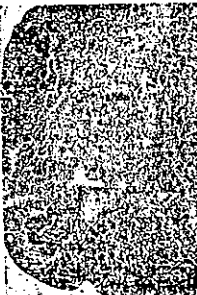


Fig-12 Necrosis of the thymic cells in the cortex** (H-E, x6)

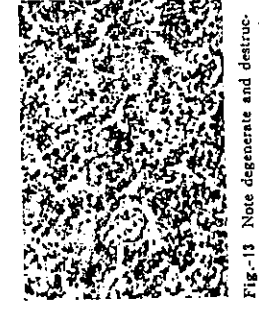


Fig-13 Note degenerate and destructive changes of the thymic cells** (H-E, x400)

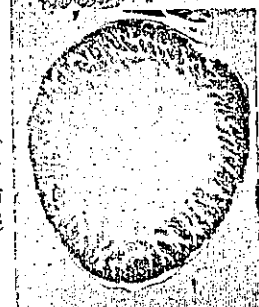


Fig-14 Marked dilatation of the jejunum* (H-E, x12)

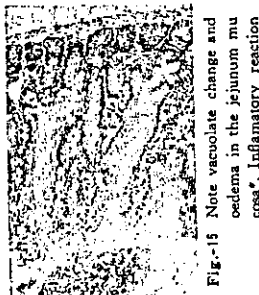


Fig-15 Note vacuolate change and oedema in the jejunum mucosa*. Inflammatory reaction was often paucity. (H-E, x100)

*: The mouse administered UV irradiated oil.
**: The mouse administered HE.

Table-5 Serum protein of mice administered HE.

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

か低下しているが、リン臓には影響がなかった。これらの所見はまた変敗した食用油脂の投与によっても認められた。組織学的所見では、4個のML誘導体、および変敗食用油脂投与群について、いずれも程度の差はあるが、共通していることは、リン系組織に障害のみられること、まずヒ臓では (Fig-10, 11)、白臓が縮して小さく、周囲のリン球の形成が目立ち、さらに赤髄洞内の赤血球の減少がみられた。この事実とは臓重量の低下を裏付けるものである。膀胱では (Fig-12, 13)、膀胱皮質の腺細胞の変性崩壊が認められた。小腸では (Fig-14, 15)、管腔の高度の拡張と、上皮細胞の空胞化が認められた。そのほかの組織では自立った所見はみられなかったが、肝臓で、肝細胞の大小不同がみられ、網内皮系の産生化が認められた。

3-4 HE 投与による血清タンパクへの影響

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

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

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

本研究は昭和47年11月第11回油化学科年会 (東京) で発表した。(昭和48年3月19日受理)

文 献

- 1) N. Matsuo, *J. Biochem.*, **41**, 645 (1954)
- 2) 金田, 辰井, 石井, 日本誌, **20**, 50, 658 (1954)
- 3) G.M. Findlay, H.H. Draper, J.C. Bergan, *Lipids*, **5**, 970 (1970)
- 4) M.G. Kokatnur, S. Okui, F.A. Kummerow, H.M. Scott, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **104**, 170 (1960)
- 5) 内山, 佐藤, 食衛誌, **11**, 327 (1970)
- 6) J. Glavind, E. Arffmann, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, Section A, **78**, 345 (1970)
- 7) H. Kaunitz, R.E. Johnson, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 50 (1964)
- 8) E. Arffmann, J. Glavind, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, **70**, 185 (1967)
- 9) B.L. Van Duuren, L. Langesth, L. Orris, G. Teetor, N. Nelson, M. Kuschel, *J. Natn. Cancer Inst.*, **37**, 825 (1966)
- 10) E.G. Perkins, F.A. Kummerow, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 371 (1961)
- 11) 大藤, 金田, 油化学, **21**, 13 (1972)
- 12) E.W. Crampton, R.H. Common, F.A. Farmer, A.F. Wells, D. Crawford, *J. Nutr.*, **49**, 333 (1953)
- 13) 松尾, 油化学, **18**, 447 (1969)
- 14) E. Schavenstein, *J. Lipid Res.*, **8**, 417 (1967)
- 15) 吉岡, 金田, 油化学, **21**, 316 (1972)
- 16) 土田, 三浦, 吉本, 油化学, **21**, 269 (1972)
- 17) A. Graveland, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **47**, 352 (1970)
- 18) G.I. Poos, G.E. Arth, R.E. Beyler, L.H. Saret, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 422 (1957)
- 19) P.L. Nichols, Jr., S.F. Herb, R.W. Riemenschneider, *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 247 (1951)
- 20) M.J. Danzig, J.L. O'Donnell, E.W. Bell, J.C. Cowan, H.M. Tester, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **34**, 136 (1957)
- 21) 三浦, 土田, 吉本, 油化学, **20**, 335 (1971)
- 22) A. Banks, S. Fazalshley, J.N. Keay, J.G.M. Smith, *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 724 (1961)
- 23) 高木, 福生, 工北, **73**, 328 (1970)
- 24) 日本化学会編, "実験化学講座 (誌), 5 (上)" p. 145, (1965), 丸善, 東京
- 25) J.A. Fioriti, R.J. Sims, *J. Chromatog.*, **32**, 760 (1968)
- 26) G. Raccuglia, *Lipids*, **5**, 85 (1970)
- 27) J. Glavind, E. Arffmann, *Experientia*, **24**, 829 (1968)
- 28) 松尾, 私稿
- 29) H. Kaunitz, *Food Technology*, **21**, 278 (1967)
- 30) E. Arffmann, J. Glavind, *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, Section A, **suppl.**, **112**, 97 (1970)
- 31) 土田, 三浦, 未発表

ゾーナル超遠心分離法による卵黄リポタンパク質の分画

原 一 郎・小 森 谷 憲 之・佐 藤 仁

東京医科歯科大学教養部 (市川南園台)

Fractionation of Egg Yolk Lipoproteins by Rate Zonal Ultracentrifugation

Ichirō HARA, Noriyuki KOMORIYA and Jin SATO
Department of Premedical and Dental Course, Tokyo Medical and Dental University
(Ichikawashi, Chiba)

Crude high density lipoprotein of egg yolk was fractionated by rate zonal ultracentrifugation. Rate zonal ultracentrifugation was carried out with zonal rotor RPZ-43 T (5600 ml) in density gradient d.1.00-1.40 by sodium bromide at 40000 rpm.

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

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

1 緒 言

ゾーナル超遠心分離法 (Rate Zonal Ultracentrifugation) は、いわゆる水平ローターを用いて密度勾配を作り、これによって比重の差を利用した分画法の改良型で、水平ローターは容量が極度に小さいため、多量の試料が送るゾーナル超遠心分離法が開発された。その理論も応用もすでに確立されている。Wilcox¹⁾はこれをヒト血清リポタンパク質の分画に応用し、純粋な数種の成分を得ている。一方、微量成分の単離にも利用され、Takahashi²⁾は血中の一種のリポタンパク質であるオーストラリア抗原 (Australia antigen, 血清肝炎と密接な関係があるといわれている) の濃縮に応用している。卵黄には血清の場合と同じように数種のリポタンパク質があり、卵黄中の脂質は大体リポタンパク質の形で存在している。Cook³⁾らの広はんな研究によって、これが高密度リポタンパク質分画 (HDL) と低密度リポタンパク質分画 (LDL) に大別され、それぞれがさらに細分されている。これらのリポタンパク質は普通には超遠心分離機による浮上法で得られるが⁴⁾、純粋にするには、その操作を反復する必要がある。ゾーナル超遠心分離法によって比較的純粋な卵黄 LDL と HDL を分画した。

2-1 実験試料および実験方法

ゾーナル超遠心分離法における試料は Evans⁵⁾ の方法によるグラニニウム (小カ粒) を用いた。新鮮な卵黄 2 個に等容量の 0.16 N-塩化ナトリウム溶液を加え、よくかくはんし、1600 rpm で 30 min 遠心し、上清を除く。沈殿したグラニニウムを 2 倍量の 0.16 N-塩化ナトリウム溶液を加え、乳濁液を作り、ふたたび 16000 rpm で 30 min 遠心し、沈殿したグラニニウムをゾーナル超遠心分離法の試料とした。ゾーナル超遠心分離機は超遠心分離機 55-P2 (日立)、ローターは PPZ 43 T (容量 660 ml) プログラミングポンプ (日立) を用いて溶液の注入、排出を行った。

ゾーナルローターから排出した塩類溶液は 10 ml ずつに分画し、各分画についてタンパク質量と脂質量を測定した。タンパク質は 280 nm の吸収をウシ血清アルブミンを標準として測定し、また一方ビュレット法⁶⁾でも測定した。

総脂質量は Evans⁵⁾ の方法によって各分画の 5 ml を凍結乾燥し、これに 70 ml のクロホルム-メタノール (1:1) を加え、よく振とうして抽出する。抽出は 3 回繰り返して、抽出された脂質を総脂質とする。脂質の種類については、同じく Evans⁵⁾ の方法に準じて、ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画法を行った。クロホルム-メタノールの混合溶液を減圧で乾燥し、これをへキサソンの溶液に置き換え、Rhodes⁷⁾ およ

加熱魚油不飽和脂肪酸エステルから得た環状単量体の毒性に関する研究

戸谷 洋一郎, 戸谷 永生, 松尾 登
成蹊大学工学部工業化学教室

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

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

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

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

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

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

(Received September 20, 1974)

改質した油腫の毒性に関する研究は、多くの立場から広く行われている。すなわち自動酸化による過酸化物の毒性や、熱酸化分解物、あるいは重合物の毒性、さらには加熱油中に生ずる環状化合物の毒性などについては、松尾¹⁾、金田²⁾、森谷³⁾、Creighton⁴⁾、Kummerow⁵⁾、Kaunitz⁶⁾、その他多くの研究者により報告されてきた。

ことに松尾¹⁾は環状単量体の毒性について一連の報告を行なっているが、その毒性がいかなる病理解原因によるものか、また動物の諸器官に与える影響については不明な点が残されている。本研究においては、イカ油よりソルダ塩アセトンを⁷⁾を用いて高度不飽和脂肪酸を分離し、これをエチルエステルとしたものを窒素ガス流中、250°Cで10時間加熱した。この加熱高度不飽和脂肪酸エチルエステルから原油精製法で環状化合物を分離し、これを真空蒸留して得られた環状単量体について、その毒性をラットを用いて検討するとともに、各臓器における毒性の発現状況を顕微鏡をもって観察した。

実験および結果

1. 高度不飽和脂肪酸エチルエステルの調製

Fig. 1 に示したように、原料イカ油 1kg を常法によりリケン化したのち、過剰に加えた水酸化ナトリウムを米酢酸で中和し、次に 15 l のアセトンを加え 0°~10°C に 1 夜放置した⁷⁾。このイカ油脂肪酸ナトリウム塩のアセトン溶液を濃縮し、アセトン溶解区分のアセトンを除去したのちに 3M 塩酸を加えて酸分解し、上層に分離した脂肪酸を石油エーテルで抽出し、洗浄、脱水、脱溶媒して超高度不飽和脂肪酸を得た。これに 2.5% の塩化水素ガスを取り混ぜた約 2 倍量の無水エタノールを加えて、3 時間加熱還流してエチルエステル化を行なったのち、温水分離、洗浄、脱水を行ない、次に 2~3 mmHg 減圧下に蒸留して、160°~200°C で留出してくる留分を高度不飽和脂肪酸エチルエステルとした。

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

Cuttle fish oil
Saponification
NaOH, EtOHsol.
Cuttle fish oil fatty acid sodium salt
Low temperature filtration
by acetone (0°C-10°C)
Acetone non-soluble fraction Acetone soluble fraction
Desolvent
Sodium salt of highly unsaturated fatty acid
Acidification
washing by H₂O
Highly unsaturated fatty acid
Ethyl esterification
Ethyl ester of highly unsaturated fatty acid
Vacuum distillation
at 2-3 mmHg
Ethyl ester of pure highly unsaturated fatty acid

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

2. 高度不飽和脂肪酸エチルエステルの加熱環状化
高度不飽和脂肪酸エチルエステルを三口フラスコに入れ、無酸素下に窒素ガス気流中、250°Cで10時間加熱した。その後、加熱高度不飽和脂肪酸エチルエステルから環状構造エチルエステルを分離するために、原薬再加分をエタノールを徐々に加え、よく攪拌しながら60°Cで1時間戻す。室温に1夜放置した。

次にこれを吸引濾過して原薬付加物と非付加物に分別し、原薬非付加物中に含まれる過剰のエタノールを留出した。温水分離して上層に浮いたエチルエステルをメヘキサンで抽出し、よく洗ったのち脱水、脱溶媒して環

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

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

3. 環状単量体の毒性試験

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

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

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

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

Sample	Characteristics			Average mole wt.
	I.V. (Wijs)	S.V.	A.V.	
Cuttle fish oil	192.0	176.1	1.3	1.4863
Ethyl ester of highly unsaturated fatty acid	321.6	166.3	3.7	1.4592

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

Fed oil	Characteristics			Average mole wt.
	I.V. (Wijs)	S.V.	A.V.	
Ethyl ester of heated highly unsaturated fatty acid	179.6	178.9	3.1	1.5055
Ethyl ester of straight chain monomer fatty acid	160.6	173.5	1.7	1.5017
Ethyl ester of cyclic chain monomer fatty acid	214.8	178.5	4.3	1.4982

Table 3. Composition of experimental diets (%).

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

a) Non fat casein extracted ether.

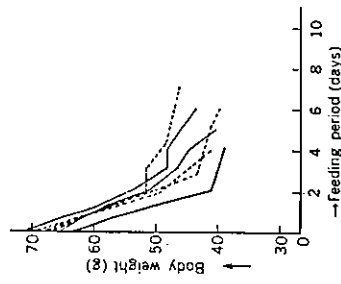


Fig. 2. Growth of rats fed experimental diet containing 10% cyclic monomer. —: ♂, ...: ♀.

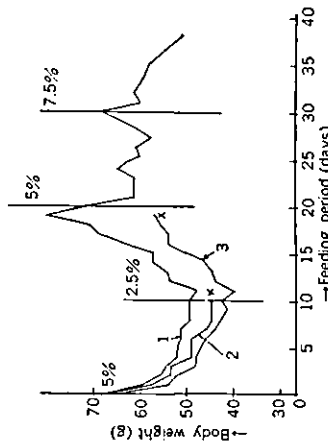


Fig. 4. Growth of rats fed diet different levels of cyclic monomer.

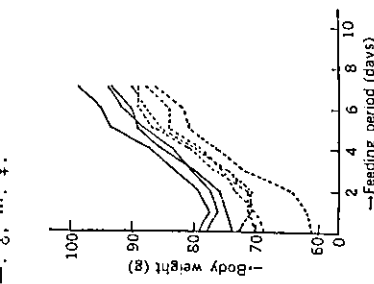


Fig. 3. Growth of rats fed diet containing 10% ethyl ester of linseed oil fatty acid. —: ♂, ...: ♀.

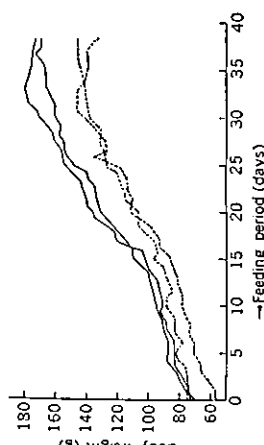


Fig. 5. Growth of rats fed diet different levels of linol salad oil. —: ♂, ...: ♀.

期間中、環状単量体投与量と同じ割合で基礎飼料に混合して与えた。

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

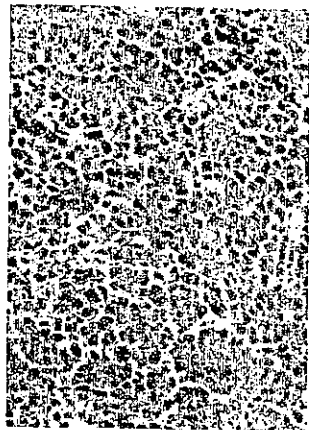


Fig. 6. Microphotograph of cells obtained from rat liver of the experimental group.

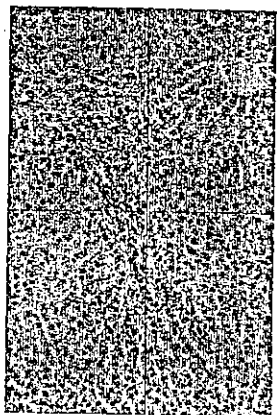


Fig. 7. Microphotograph of cells obtained from rat liver of the control group.

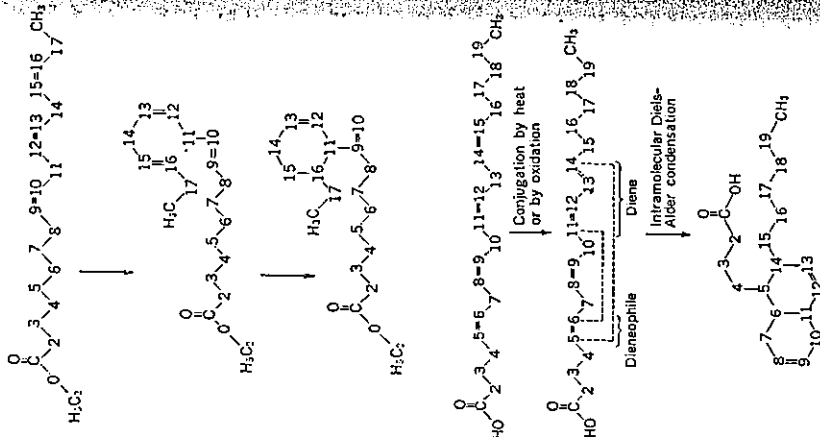
なお、コントロールグループのラットの肝臓の顕微鏡写真は、Fig. 7のごとくであった。

考察

イカ油より分離、精製した高度不飽和脂肪酸エチルエステルを無触媒、無溶媒下に250°Cで10時間加熱して得られた環状単量体の性状はTable 2に示したとおりであるが、そのヨウ素価(I.V.)と平均分子量320から平均二重結合数を算出すると2.7であった。すなわち平均二重結合数4.4の高度不飽和脂肪酸エチルを加熱状態にして、平均二重結合数2.7の環状単量体が生じたことになる。この環状単量体のI.R.分析の結果、高度不飽和脂肪酸エチルのI.R.スペクトルには存在しなかった660 cm⁻¹のシクロロヘキセン環の特性吸収が認められたことから、この環状単量体はシクロヘキセン環を有するものが含まれていると考えられる²⁰。

松尾²⁰は無触媒、無溶媒下に250°Cでリノレン酸エチルを加熱したとき得られる環状単量体の生成機構について、またPaschke, R.F., Wheeler, D.H.²⁰はアラキドン酸からの環状単量体の可能な生成機構を、次図のように推定している。

栄養と食糧



次に本実験で行なった環状単量体の毒性試験の結果はFig. 2に示したごとく、環状単量体を10%投与したとき、その毒性が著しく、体重の急激な低下とともに体毛の黄変、脱落、さらに下痢を起し、実験開始後4日7日でラットは死亡した。

これらの実験結果は、松尾²⁰が行なっているアマニ油または桐油などを加熱環状化して得た環状単量体の毒性試験結果とよく一致している。次にFig. 4に示したように環状単量体の投与量を加減してラットに投与し飼育したのち、内臓諸器官を顕微鏡観察した結果、腎臓、小脳、背髄については赤血が認められる程度で、その他に著しい変化は認められなかったが、大脳、肝臓については顕著な変化が観察された。ことに、肝臓については肉眼的にも肝臓が茶色に変色し、そのうえ、肝臓肥大の傾向が著しく、さらに脂肪質が明瞭に認められた。またFig. 6に示したように、肝臓においては肝細胞の壊死が顕著であった。大脳においては全体的に脳浮

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

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

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

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

文献

- 1) 松尾 登: "Lipid and Their Oxidation", 321 (1962), AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, U.S.A.
- 2) 金田尚志: "生物化学最近の進歩", 第5集, 55, 技報堂(東京)
- 3) 秋谷年見: 栄養と食糧, 14, 71 (1961)

- 4) 秋谷年見: 栄養と食糧, 15, 226 (1962)
- 5) Crampton, E.W., Farmer, F.A. and Berryhill, F.M.: *J. Nutrition*, 43, 431 (1951)
- 6) Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Berryhill, F.M. and Wisenblatt, L.: *J. Nutrition*, 43, 533 (1951)
- 7) Crampton, E.W., Common, R.H., Farmer, F.A., Wells, A.F. and Crawford, D.: *J. Nutrition*, 49, (1953)
- 8) Kummerow, F.A., Johnson, O.C. and Sakuragi, T.: *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, 33, 433 (1956)
- 9) Kummerow, F.A., Johnson, O.C., Perkins, E. and Sugar, M.: *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, 34, 594 (1957)
- 10) Kummerow, F.A. and Perkins, E.G.: *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, 36, 371 (1959)
- 11) Kaunitz, H., Slanetz, C.A. and Johnson, R.E.: *J. Nutrition*, 55, 577 (1955)
- 12) Kaunitz, H., Slanetz, C.A., Johnson, R.E. and Gulimain, J.: *J. Nutrition*, 60, 237 (1956)
- 13) Kaunitz, H., Slanetz, C.A. and Johnson, R.E.: *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, 33, 630 (1956)
- 14) 松尾 登: 生化学, 29, 885 (1958)
- 15) 松尾 登: 栄養と食糧, 10, 255 (1958)
- 16) 松尾 登: 日本化学雑誌, 81, 469 (1960)
- 17) 松尾 登: *J. Biochem.*, 49, 635 (1961)
- 18) 松尾 登: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 35, 105 (1962)
- 19) 松尾 登: 工業化学雑誌, 37, 1002 (1934)
- 20) 松尾 登: 油化学, 9, 37 (1960)
- 21) 松尾 登: 油化学, 13, 447 (1969)
- 22) Paschke, R.F. and Wheeler, D.H.: *J. Amer. Oil Chemist's Soc.*, 32, 473 (1955)

(昭和49年9月20日受理)

以下で蒸発範囲した。

2) 有機酸のブチル化 蒸発範囲した有機酸は、ブチノール 20 ml に溶解し無水硫酸ナトリウム 2g を加え乾燥し、濃硫酸 3 滴を加え、これに還流冷却器を付けて、15 分間加熱沸騰させて反応を行なった。

3) 標品有機酸のブチル化 標品有機酸 (クエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、マンデル酸、シュウ酸、安息香酸) の各 1g に、ブチノール 20 ml を加え溶解し、無水硫酸ナトリウム 2g を加え、さらに濃硫酸 3 滴を加えて還流冷却器を付けて、15 分間加熱沸騰させて反応を行なった。

4) 測定 標品有機酸ブチルエステル、梅酒有機酸ブチルエステルについて、ガスクロマトグラムを求めた。また、梅酒を直接マイクロシリンジでとり、ガスクロマトグラムを求めた。

実験結果

梅酒のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示すように、ベンズアルデヒド、クエン酸トリブチルエステルが検出された。梅酒中の有機酸をブチルエステルした場合のガスクロマトグラムは Fig. 2 に示すように、ピークが 8 種認められた。そのうち、ピーク成分 $t_R=2.6$ 分は、シュウ酸ジブチル、 $t_R=3.0$ 分は、安息香酸ブチル、 $t_R=4.2$ 分は、コハク酸ジブチル、 $t_R=12.0$ 分は、リンゴ酸ジブチル、 $t_R=49.2$ 分は、クエン酸トリブチルであることが標品有機酸のブチルエステルとの保持時間の一致より確認された。

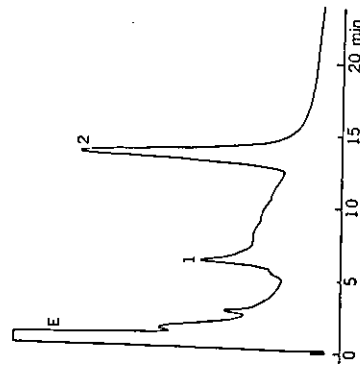


Fig. 1. Gas chromatogram of Ume-shu. E: ethanol, 1: benzaldehyde, 2: triethyl citrate. Column: DEGS 5% H₃PO₄ 1% on Chromosorb W 60/80 mesh stainless steel tube 2 m x 2.5 mm I.D., temperature: column oven 155°C, N₂ flow 40 ml/min.

市販油脂含有食品の酸化変質

戸谷 洋一郎, 戸谷 永生
松尾 登
成蹊大学工学部工業化学教室

Oxidative Deterioration of Commercial Foods Containing Oils and Fats

Yōichirō TOTANI, Nagao TOTANI
Noboru MATSUO

Department of Industrial Chemistry, College of Technology, Seikei University, Musashino City, Tokyo

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

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

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

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

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

(Received September 28, 1974)

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

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

意などについて次第に注目され、実行されるようになってきた。

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

実験方法

1. 実験試料

バター・マーガリン、かりん糖、ドーナツ、ポテトチップス、即席ラーメン (袋入り) はカッパ入り、揚げせんべい、クラッカーをさまざまな地産地消で求めた。

2. 抽出条件

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

3. 抽出および性状測定

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

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

実験結果

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

表 1-1. 即席ラーメンより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)	製造測定日
1	27.5	9.4	60.7	0.5	—	—	赤	47. 3.17 47. 7.26
2	21.7	9.4	59.0	0.7	—	—	黄, 白	47. 2. 9 47. 7.26
3	21.7	16.2	57.2	0.4	吉祥寺酒屋	蛍光燈下	赤	47. 9.17 47.11. 2
4	20.2	9.0	64.5	0.6	北区十桑菓子店	—	橙	47. 8. 2 47.11. 17
5	22.0	29.0	58.9	0.4	—	—	赤	47.10.28 47.11. 17
6	18.7	13.9	60.9	0.4	川崎パン屋	—	白	47.12. 2 48. 1.17
7	16.0	13.2	64.1	0.5	吉祥寺パン屋	—	赤	47.10.31 47.11. 14
8	15.2	9.1	52.4	0.4	吉祥寺酒屋	蛍光燈下日光下	赤, 橙, 黄	47.10.13 47.10.27
9	12.7	19.2	52.3	0.7	川崎菓子店	蛍光燈下	—	47.12.18 48. 1. 2
10	19.3	11.9	59.4	—	横須賀菓子店	—	白, 茶	47. 9.25 47.12.18
11	20.0	4.7	54.8	1.1	鎌倉酒屋	蛍光燈下日光下	橙	47. 8.29 47. 9.25
12	17.3	12.3	48.4	0.5	鎌倉マケット	蛍光燈下電燈下	—	47.12.28 48. 2. 1
13	17.7	14.8	49.3	1.3	大船酒屋	蛍光燈下	赤	47. 5. 3 48. 1. 9
14	21.4	11.2	57.9	0.7	横須賀菓子店	—	白, 黒	47. 9.28 47.12.12
15	22.0	11.4	56.8	0.5	福生(多摩)	—	赤	48. 1. 8 48. 1.23
16	21.8	12.3	60.9	0.6	吉祥寺酒屋	—	—	47. 9.27 47.10.31

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

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)	製造測定日
17	18.9	11.0	56.7	0.5	川崎菓子店	蛍光燈下	赤	47.12.14 48. 1.11
18	21.4	16.9	51.5	0.6	鎌倉マケット	蛍光燈下電燈下	橙	47. 4.13 48. 1.29
19	18.3	13.2	50.5	0.4	—	—	赤	47.11.11 48. 1.31
20	19.5	8.6	63.2	0.5	北区十桑	蛍光燈下	白, 赤, 黄	47.10. 3 47.11.15
21	19.0	11.2	60.0	0.7	川崎パン屋	—	白	47. 9. 7 48. 1.16
22	18.8	5.2	57.8	0.7	横須賀菓子店	—	白, 黄	47. 5.29 47.12.15
23	19.8	11.6	62.9	0.4	鎌倉マケット	—	赤	47.11.29 48. 1.30
24	29.8	10.0	60.2	0.2	—	—	—	48. 1.23 48. 1.26
25	18.9	10.1	—	0.6	鎌倉ジョブソン	—	透明	47.10.16 48. 1.26
26	17.6	6.6	60.2	1.7	吉祥寺駅売店	—	発泡スチロール	47.11.24 47.12. 3
27	15.7	12.0	71.7	3.2	吉祥寺大学売店	—	—	— 47.12. 3
28	13.7	11.2	53.4	0.6	鎌倉スーパーマケット	—	—	48. 1.13 48. 1.30
29	14.5	19.2	57.0	0.8	鎌倉マケット	蛍光燈下電燈下	—	— 48. 1.29
30	14.8	13.3	53.5	2.4	保谷スーパーマケット	蛍光燈下	—	48. 1.23 48. 1.31
31	19.9	17.0	63.5	1.8	—	—	—	48. 1.18 48. 2. 1

4. パクビーナーカップより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 4 に示す。
5. クラッカーより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 5 に示す。
6. ドーナツより抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 6 に示す。
7. かりん糖より抽出した油脂の性状 性状測定の結果を表 7 に示す。

表 2. ポラトチップスより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	35.7	6.0	99.8	0.6	吉祥寺	蛍光燈下	透明
2	28.9	19.8	99.5	1.3	鎌倉	—	—
3	28.9	5.6	113.4	0.9	北区十桑	—	—
4	36.8	13.1	110.3	1.0	藤沢	—	—
5	34.0	6.5	100.0	0.5	埼玉田有	—	—
6	37.4	7.2	101.2	1.0	亀	—	黄
7	37.7	11.6	105.7	0.9	世田谷区梅ヶ丘	蛍光燈下電燈下	透明
8	36.0	21.8	105.1	0.9	千代田	蛍光燈下	黄
9	33.8	6.0	109.7	1.0	埼玉秩父	蛍光燈下日光下	—
10	36.6	4.9	111.2	0.7	横須賀	蛍光燈下	透明
11	37.1	6.9	96.5	0.8	平塚	日光	—
12	38.0	18.5	104.8	1.1	川崎	—	バラ売り
13	28.7	5.2	—	0.3	戸塚	蛍光燈下	黄
14	32.9	5.7	124.8	0.6	横須賀	—	透明

表 3. 揚げせんべいより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	20.4	24.8	116.8	1.5	鎌倉	蛍光燈下日光下	透明
2	25.0	7.7	118.6	1.0	吉祥寺	—	—
3	21.6	11.5	119.1	2.7	御茶ノ水	蛍光燈下	—
4	22.0	20.7	120.9	2.1	鎌倉	—	—
5	25.8	53.6	108.0	2.1	浦和	—	—
6	18.6	6.6	105.4	2.0	亀	—	—
7	27.0	6.6	104.4	1.7	有明	—	—
8	31.7	16.0	102.3	2.0	世田谷区梅ヶ丘	蛍光燈下電燈下	—
9	21.5	4.9	94.2	1.9	千代田	蛍光燈下	—
10	21.8	13.2	109.8	3.0	—	—	—
11	22.8	9.4	106.8	3.4	埼玉秩父	—	—
12	18.5	4.0	100.9	2.7	横須賀	—	—
13	26.8	7.9	108.7	1.3	三浦観音崎	電燈下	—
14	20.7	30.5	106.3	1.3	川崎	蛍光燈下	バラ売り

8. 油脂含有食品より抽出した油脂の性状総括 各種抽出油脂の性状測定の結果を総括して表 8 に示す。
 9. 油脂含有食品より抽出した油脂の脂肪酸組成 各種抽出油脂の脂肪酸組成を表 9 に示す。
- その色調は赤, 橙, 黄等様々であるが, ほとんどがポリセロ袋入りであった。カップ入り即席ラーメンでは, カップは発泡スチロールのものが多かった。
- 試料 31 種の全体についてみると, 表 8 に示したようにその含油率は 12~30% の間にあった。山下の報告によれば含油率は 14~26% と報告されており, ほぼ一致している。P.O.V. は 5~29 meq/kg 程度であった, 15 meq/kg 以下のものは 31 種中 25 種 (81%) であった。購入場所, 陳列状態によって脂肪酸価面に特別な差異は
- 考 察
1. 即席ラーメンについてみると, 購入場所は東京, 神奈川県, 埼玉県にわたっている。その陳列状態は蛍光燈下におかれていたものが大部分で, 包装については

表 4. パタービーナーナッツより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態 (ポリセロ袋の色)
1	37.6	21.2	101.0	0.7	東京	蛍光灯下	透明
2	21.0	31.8	96.6	0.6	荻窪	"	"
3	36.4	36.0	95.8	0.7	鎌倉	"	"
4	20.3	51.5	97.0	0.5	埼玉	"	"
5	39.5	36.2	97.5	0.7	亀戸	"	"
6	32.2	17.2	98.3	1.6	千代田	"	"
7	27.7	34.0	99.5	2.8	埼玉	"	バラ売り
8	27.6	95.9	100.3	1.0	茨城	"	透明
9	29.0	44.4	92.5	0.8	川崎	"	"
10	40.5	19.5	95.8	0.5	"	"	"

表 5. クラッカーより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態
1	20.8	12.8	38.1	0.7	吉祥寺	蛍光灯下	透明ポリセロ袋
2	9.6	10.8	—	—	鎌倉	"	透明ポリセロ袋
3	24.4	1.6	39.0	0.7	吉祥寺	"	アルミ箔袋
4	16.0	3.2	45.0	0.8	埼玉	"	アルミ箔袋
5	22.9	1.5	32.8	0.6	亀戸	"	酸化防止剤添加
6	15.6	2.0	—	1.2	世田谷区	蛍光灯下電燈下	"
7	22.0	2.0	36.0	0.6	千代田	蛍光灯下	"
8	25.2	19.7	42.2	1.6	埼玉	"	紙
9	12.1	3.9	67.7	0.7	千葉	"	透明ポリセロ袋
10	24.4	2.1	37.7	0.5	三葉	電燈下	アルミ箔袋
11	22.7	4.4	34.0	0.3	北区	電燈下	アルミ箔袋
12	25.3	3.6	34.5	0.1	平塚	電燈下日光下	酸化防止剤添加
13	7.0	3.7	36.9	1.0	川崎	電燈下	アルミ箔袋
14	25.6	5.3	52.4	0.6	戸塚	"	酸化防止剤添加
15	18.6	2.3	—	0.4	多摩	"	アルミ箔袋

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

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

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

試料14種の含油率は29~38%で、P.O.V.は5~22 meq/kgであり、15 meq/kg以下のものは11種(79%)であった。I.V.は96~125、A.V.は0.3~1.3で、脂肪酸組成をみると綿菜油、米コメ油の組成と似ている。3. 揚げせんべいは陳列状態はほとんど蛍光灯下であり包装はポリセロ袋入り、色調は透明のものが大部分であった(バラ売り1種)。

表 6. ドーナツより抽出した油脂の性状

試料番号	含油率 (%)	P.O.V. (meq/kg)	I.V.	A.V.	購入場所	陳列状態	包装状態
1	37.4	6.8	118.8	2.2	吉祥寺	蛍光灯下	バラ売り(自家製)
2	16.8	9.7	107.7	2.4	新宿	"	透明ポリセロ袋
3	20.0	10.0	68.7	—	御茶ノ水	"	バラ売り(自家製)
4	11.3	8.4	107.5	2.6	鎌倉	"	透明ポリセロ袋
5	17.2	7.4	64.4	3.1	"	"	バラ売り(工場製)
6	15.3	21.2	61.2	3.2	東京	蛍光灯下電燈下	バラ売り(自家製)
7	26.2	5.6	64.6	1.1	千葉	蛍光灯下	透明ポリセロ袋
8	29.3	8.5	120.9	1.8	北区	"	バラ売り(自家製)
9	18.2	5.4	122.2	1.2	川崎	"	透明ポリセロ袋
10	27.9	14.6	97.3	1.8	多摩	"	バラ売り

表 7. かりん糖より抽出した油脂の性状

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

表 8. 油脂含有食品より抽出した油脂の化学的性状

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

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

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

表 9. 油脂含有食品より抽出した油脂の脂肪酸組成

試料名	脂肪酸組成 (C _{16:0} ~ C _{18:2})										
	C _{16:0}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{16:0}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:2}
即席ラーメン	—	—	2.9	4.2	23.2	15.3	40.2	11.2	—	—	—
ポテトチップス	—	—	—	—	22.2	—	37.3	40.5	—	—	—
揚げせんべい	—	—	—	—	17.9	1.5	41.3	37.6	—	—	—
バターピーナッツ	—	—	—	—	12.7	3.7	49.8	33.0	—	—	—
クラッカー	2.9	3.9	30.4	11.1	15.1	5.8	23.3	6.8	—	—	—
ドーナッツ	—	—	—	—	30.3	1.7	37.0	31.0	—	—	—
かりん糖	—	—	—	—	18.5	6.2	39.0	34.0	—	—	—

表5に示したごとく、ポリセロ袋入り、アルミ箔袋入り、紙袋入り等、種々であり、酸化防止剤添加と表示されたものが多い。
 食油率は7~26%で、P.O.V.は1~20 meq/kg、15 meq/kg以下のものは14種(98%)、10 meq/kg以下のものは12種と低かった。I.V.は32~68であり、A.V.は0.1~0.6と他の試料に比べて最も低かった。脂肪酸組成は表9のようであった。

6. ドーナッツは他の食品と違い自家製のものが多く、製造後1~2日間で消費されるのがほとんどである。そのため包装は極端である。透明なポリセロ袋入りのものもあったが、バラ売りのものが多い。食油率は11~20%の間にあり、P.O.V.は5~21 meq/kgあり、15 meq/kg以下のものは10種中9種(90%)、10 meq/kg以下のものは8種(80%)と低かった。これは保存期間が短いためである。I.V.は60~70のもの4種、110前後のもの6種とあり、A.V.は1.1~1.2。脂肪酸組成は表9のようであった。

7. かりん糖は7種について調べたが、包装は透明ポリセロ袋入り、食油率は15~29%、P.O.V.は3~14 meq/kgであった。7種類の結果ではあるが低かった。I.V.は3.2。脂肪酸組成は表9のようであった。

表 10. 全試料の過酸化値による分類

試料名	試料数	過酸化値 (meq/kg)			
		10以下	15以下	20以下	30以下
即席ラーメン	31	9	25	30	31
ポテトチップス	14	9	11	13	14
揚げせんべい	14	7	9	10	12
バターピーナッツ	10	0	0	2	3
クラッカー	15	12	14	15	15
ドーナッツ	10	8	9	9	10
かりん糖	6	3	6	6	6
計	100	48	74	85	91

表 11. 全試料の酸価による分類

試料名	試料数	酸 価			
		1.0 以下	2.0 以下	2.1~3.4	最高値
即席ラーメン	30	24	28	2	3.2
ポテトチップス	14	12	14	0	1.3
揚げせんべい	14	1	8	6	3.4
バターピーナッツ	10	8	9	1	2.8
クラッカー	14	12	14	0	1.6
ドーナッツ	19	0	4	5	3.2
かりん糖	6	2	5	1	2.3
計	97*	59	82	15	

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

に光線の影響が大きくなり、385 mμ付近の紫外線と可視線において450~550 mμの領域の光線が影響すること(7)を明らかにし、赤色フェイタルターは透明フェイタルターや緑色フェイタルターよりも、過酸化値を抑制することを報告している。

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

日下らによれば、即席ラーメンを真空包装した状態でしかも出荷時と同様に段ボール箱に密封し、保存試験を行なった結果、実験開始時のP.O.V. 11.8 meq/kgに対し、室温および30°Cでは60日経過してもほとんど変化なく、40°Cの場合は50日経過で約15~16 meq/kg、60日では20~22 meq/kgであった。50°Cの場合は50日経過で20 meq/kg、60日では30 meq/kg近い値を示した。

下岡らによれば揚げ菓子類(かりん糖、揚げせんべい等)の中にP.O.V.の高いものがあるが、とくに揚げせんべいには、140.9、264.6 meq/kg程度のものもあったと報告されているが、今回の試料では揚げせんべいで53.6 meq/kg、バターピーナッツで95.7 meq/kgが最高であった。油脂が自動酸化によって栄養価が低下し、さらに酸化を示すことは金田ら⁽¹⁰⁾の研究をはじめとし、私達の研究によって古く明らかにされているが、現在はP.O.V.の上昇期においては、その過酸化値に平行する。

Crampton⁽¹⁰⁾らはP.O.V.が100 meq/kg以下の場合は、白ネズミによる異変で悪い症状は現われなかったと報告しているが、松尾による結果も同様であった。また自動酸化によって生成されたもののうち、分解物で毒性の強いものもあり(それらはごく微量であって、油脂中に存在しても全体としてとくに悪影響を与えたりは考えられないが)、また油脂の栄養価を判定するためにいくつかの方法が示唆されており、P.O.V.だけから判断するのは当を得ておられない場合もあるが、P.O.V.の立場からみれば30 meq/kg以上は食用としないと決めるべきであると考ええる。

油脂含有食品中の過酸化値の変化は、共存する他の成分の影響を大きく受けることは、自動酸化物とたん白質、アミノ酸等との相互作用⁽¹¹⁾を考慮しても容易にわかることであり、共存する水分も大きな関係をもっている。

食品を乾燥すると水分が減少し、油脂と空気との接触面積が大きくなって、油脂は酸化を受けやすくなる。水分の含量が多くなるとP.O.V.の上昇は比較的少ない。

く、むしろ A.V. が増大する。この過程では生成してき
た過酸化物の分解も水によってひきおこされていると考
えられる。
油脂含有食品の流通消費の過程での酸化状態について
は、十分な注意が必要である。

要 約

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

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

- (1) 過酸化物質についてみると、100 種中 30 meq/kg 以下のもの 91 種、30.1 meq/kg 以上のものはパタービーナッツに多く (10 種中 7 種)、その最高は 95.7 meq/kg であった。
- (2) 酸価は 0.1~3.4 の間にあり、1.0 以下のもの 59 種、2.0 以下のもの 82 種であり、揚げせんべいとドーナツに高いものがあった。
- (3) 今回の各試料の過酸化物質、他の報告にみられる試料の過酸化物質、厚報の白ネズミによる動物実験の結果を総合して考察し、油脂含有食品中の油脂の過酸化物質は 30 meq/kg あたりにその限度をおくのが適当であらうとも考える。

コレステロールの比色定量法の比較検討

河 部 重 信, 金 田 尚 志
東北大学農学部有機化学科

Comparative Study of Photometric Determinations of Cholesterol

Shigenobu ABE, Takashi KANEDA
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Aramaki-machi-Tsutsumidori, Sendai, Japan 960

Many workers have been used Sperry-Webb method for total and free cholesterol determination of blood and tissues, however, this method

本報告は、昭和 48 年 5 月第 27 回日本栄養・食糧学会
総会 (東京) において発表された。

文 献

- 1) 下岡 勉, 外山修之: 名古屋産業科学研究研究所報告, 39, 10 (1957)
- 2) 金田尚志, 渡辺寛子: 栄養と食糧, 16, 211 (1963)
- 3) 坂本安司, 金田尚志: 栄養と食糧, 20, 178 (1967)
- 4) 篠本美佐子, 森 益夫: 栄養と食糧, 20, 367 (1967)
- 5) 山下太郎: 油化学, 14, 754 (1965)
- 6) 秋谷年見: 油化学, 14, 733 (1965)
- 7) 三浦利之, 武藤 健, 原野素典, 宮本高明: 食衛生法, 7, 68 (1966)
- 8) 松尾 登: 第 38 回製油研究会資料 (1963)
- 9) 渡辺 啓, 小林 亮, 久米新昭, 川北 益: 日本誌, 32, 327 (1966)
- 10) 日下兵衛, 深沢 卯, 松尾 登: 栄養と食糧, 22, 582 (1969)
- 11) 金田尚志, 石井清之助: 日本誌, 19, 171 (1953)
- 12) 金田尚志, 榎井秀雄, 石井清之助: 日本誌, 20, 50 (1954)
- 13) 松尾 登: J. Biochem., 41, 481 (1954)
- 14) 松尾 登: J. Biochem., 41, 647 (1954)
- 15) Crampton, E.W. et al.: J. Nutrition, 49, 333 (1953)
- 16) Andrews, J.S. et al.: J. Nutrition, 70, 202 (1960)
- 17) 金田尚志, 吉岡隆子: 油化学, 21, 316 (1972)
- 18) 松尾 登: 生化学, 29, 773 (1957)
- 19) 松尾 登: "Lipids and Their Oxidation", 321 (1962), AVI. Pub. Comp. Inc., Westport, Connecticut, U.S.A.

(昭和 49 年 9 月 28 日受理)

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

(Received October 28, 1974)

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

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

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

実 験 方 法

1. 試 薬

水酸化カリウム、スルホサリチル酸、塩化第二鉄 6 水
塩、水酢酸、無水酢酸は和光純薬製試薬を、ジギト
ニンは Merck 製のものを使用した。クロロホルムは特級
試薬を塩化カルシウムで脱水後蒸留し、アセトン、エチ
ルエーテルは 1 級試薬を、メタノールは未変性エタノー
ル (日本アルコール販売製二級品) を蒸留留して用い
た。

2. 試薬の調製

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

黄色試薬 Zurkowski 試薬¹⁾、Liebermann-Burchard

(L-B) 試薬²⁾、Zak-Henly (Z-H) 試薬³⁾ はそれぞれ
原報にしたがって調製した。

3. 血漿 (血清) コレステロールの定量

1) Sperry-Webb⁴⁾改良法

i) CS の抽出とジギトニオン付加物の生成 血漿 1 ml
をフタつき遠沈管 (15 ml) に採り、アセトン・エタノ
ール (1:1) 混液 9 ml を注射筒を用いて激しく注
入し、内容物をよく分散させ、2,000 rpm, 5 分間の遠
心分離により上澄液を分けて試料とする。

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

iii) 遊離型 CS の定量 試料 2.0 ml を遠沈管に採
り、15%酢酸溶液 1 滴を加え、以下ジギトニオン溶液を加

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

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

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