

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

白 台 鴻\*, 星 野 忠 彦\*\*, 金 田 尚 志\*

\* 東北大学農学部食糧化学科  
\*\* 東北大学農学部畜産学科

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

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

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

In order to clarify the mechanism of acute toxicity of autoxidized oils, histopathological studies were carried out. 50% and 100% lethal dosages of methyl linoleate hydroperoxides (LMHPOs) and autoxidized methyl linoleate contained secondary oxidation products were administered orally to mouse. The mice were inspected continuously for 48 hours, the died and survived mice were anatomized. Specimens of small intestine, liver, lung, kidney and other tissues were separated immediately from body. Gross symptoms were observed in small intestine, liver, lung and kidney by histopathological examination. Marked effect of these compounds was necrosis, fatty degeneration and congestion in tissues. The degree of impairments in each tissue was correlated to the toxicity of samples. From a consideration of histopathological observation, it was recognized that similar symptoms were induced by LMHPOs and secondary oxidation products. However, severe injury was observed on the tissues fed secondary oxidation products.

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

(Received September 16, 1975)

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

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

上記のように自動酸化油ないし過酸化物の動物組織におよぼす影響についてはいくつかの報告があるが、なお、確一的な見解は出されていない。また従来の報告は HPO を単離せず、各種酸化生成物の混合物を用いて試験を行なったものが多く、とくに HPO の分解により生ずる 2 次酸化物に由来する毒性の病理組織学的研究はまったく行なわれていない。そこで、吾等らは LMHPO および 2 次酸化物をよく自動酸化 LM を用い、マウスに対する急性毒性を病理組織学的に検討したので、その結果を報告する。

<sup>†</sup> 自動酸化油の毒性に関する研究 (第 5 報)

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils (Part V)

\*\* 〒 980 仙台市堤通両宮町 1-1

略字解 HPO: ヒドロペルオキシド  
LMHPO: リノール酸メチルヒドロペルオキシド

HPOA: ヒドロペルオキシアルケナール

AOML: 自動酸化リノール酸メチル

LM: リノール酸メチル

実験方法

1. 試料の調製

リノール酸メチルヘドロドベロオキオシンド：サフラワー油... 混合脂肪酸メチルエステルを減圧蒸留... 純度 98% の LM を得た。これを 2 次酸化... 生成物の生成を抑えるため低温 (3°C) で酸素を吹き込み... 40 日間自動酸化させ P.O.V. を 2080 meq/kg, CO.V. を 230 meq/kg となったものをセルロースカラムクロマトグラ...

リノール酸メチル 2 次酸化生成物：2 次酸化生成物を得るため、LM を 60°C で酸素を吹き込み自動酸化させた。25 時間後、P.O.V. が 2670 meq/kg と最高値付近に達したとき試料を採取し、これを AOML-1 とし、さらに 90 時間酸化させ P.O.V. が極大値を過ぎヘルオキオシンドにわかれて 2 次酸化生成物を多く生成するようになったものを AOML-2 として試料とした (Fig. 1)。AOML-1 は P.O.V. 2670 meq/kg, CO.V. 876 meq/kg, AOML-2 は P.O.V. 1167 meq/kg, CO.V. 1720 meq/kg を示した。

2. 動物実験

各試料を Table 1 に示すように、1 群 5 匹よりなる体重 14~15 g 程度の DD 系雄マウスに 1 夜絶食後、胃ゾンズを用いて、1 回経口投与した。LMHPO は LM で希釈し、M-1 群には吉岡氏法が求めた LD<sub>50</sub> 量 0.256g LMHPO/20g mouse (782 μ mole LMHPO/20g mouse) を投与した。また A-1 群には AOML-1 を 0.6 ml/20g mouse, A-2 群には AOML-2 の毒性の強さを考慮して半量 0.3 ml/20g mouse を前記同様のマウスに 1 回経口投与した。試料投与後、供試マウスは固型飼料を自由に摂取させた。48 時間マウスの状態を観察するとともに、体重の変化も調べた。マウスは経口投与後死直前、直後また生きたままのもは 48 時間後断頭処死し、ただちに...

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

Table with 4 columns: Group, Sample, Amount of sample orally administered, Mortality after 24 hours (No. of death, No. of survival). Rows include M-1, M-2, A-1, A-2 groups with different sample amounts and results.

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

栄養と食糧

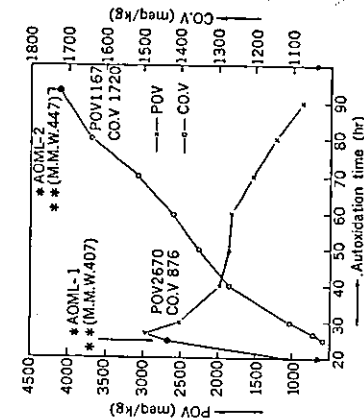


Fig. 1. Preparation of AOML-1 and AOML-2. \* AOML: autoxidized methyl linoleate \*\* M.M.W.: mean molecular weight

小腸、肝臓、膵臓、腎臓、心臓、脳、胃および精巣の各臓器を摘出して、観察するとともに組織標本を作製した。すなわち、各組織をヘリ液または 10% ホルマリオン緩液で固定し、ヘリ液で固定した試料は固定終了後、常法によりパラフィンに包埋し、これを 5 μ の切片とした。普通染色としてヘマトキシリン・エオジン二重染色を行なった。グリコーゲンの検出は McManus の PAS 染色による。10% ホルマリオン緩液で固定した小腸、肝臓、腎臓は凍結切片によってズダン黒 B 染色により脂質を検索した。

実験結果

1. 各実験群の死亡率と出現症状とその経過 Table 1 に示すように、LD<sub>50</sub> 量を与えた M-1 群では、試料投与後 24 時間以内に 5 匹中 2 匹が死亡した。また LD<sub>50</sub> 量を与えた M-2 群では全マウスが 24 時間以内に死亡し、LMHPO の毒性の強さは吉岡氏法の結果とよく一致した。A-1, 2 群はともに 5 匹中 2 匹ずつ試料投与後 24 時間以内に死亡した。

2) 肝臓

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

3) 肺臓

Table 4 に示すごとく肺臓の腫率は LMHPO 投与群のほうが、2 次酸化生成物投与群より強い影響を与えており、他の臓器とは異なっていた。すなわち、2 次酸化生成物を与えた A-2 群を除いて、生死に関係なく強い出血と充血う血、さらには無気肺病と肺死巣がみられた (Fig. 10)。肺臓は拡張し上皮下細胞は肥厚し、なかには壊死細胞がみられた。一般に血管の拡張と充血う血が強い。

各試料投与後、各群のマウスはいずれも行動遅鈍となり、食欲は減退して下痢および呼吸困難を示し、口内、肛門のまわりはセボレーヤ (皮膚腐敗) を思わせる症状を呈した。生き残ったマウスはその後回復し、投与前と同ような外観になった。死亡マウスは平均 10~15% 体重が減少したが、生き残ったマウスでは回復とともに損傷をはじめ、体重は増加した。

2. 病理組織学的所見

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

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

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

Table with 4 columns: Group, Villi (絨毛), Fatty deposition (脂肪沈着), and Degeneration of blood cells (血液変性). Rows include M-1, M-2, A-1, A-2 groups with detailed histological findings.

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

Group	M-1	M-2	A-1	A-2	Survival
Death	+	+	+	+	-
Survival	-	-	-	-	+
Disappearance of nuclei	+	+	+	+	+
Appearance of large and giant nuclei	+	+	+	+	+
Irregularity in the nuclear sizes	+	+	+	+	+
Occurrence ratio of binuclear cells (%)	22.6	17.1	23.0	20.0	24.6
Pyknosis	-	-	-	-	-
Atrophy of the liver cells	+	+	+	+	+
Glycogen deposition	+	+	+	+	+
Endothelium	+	+	+	+	+
Liver cells	+	+	+	+	+
Activation of reticulo-endothelial system	+	+	+	+	+
Fatty degeneration	+	+	+	+	+
Lipids	+	+	+	+	+
Dilatation of the portal veins	+	+	+	+	+
Congestive hyperemia of the livers	+	+	+	+	+

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

\* The control group showed mean of 9.6% in occurrence ratio. C: central band of hepatic lobule, M: middle band of hepatic lobule, P: peripheral band of hepatic lobule.



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

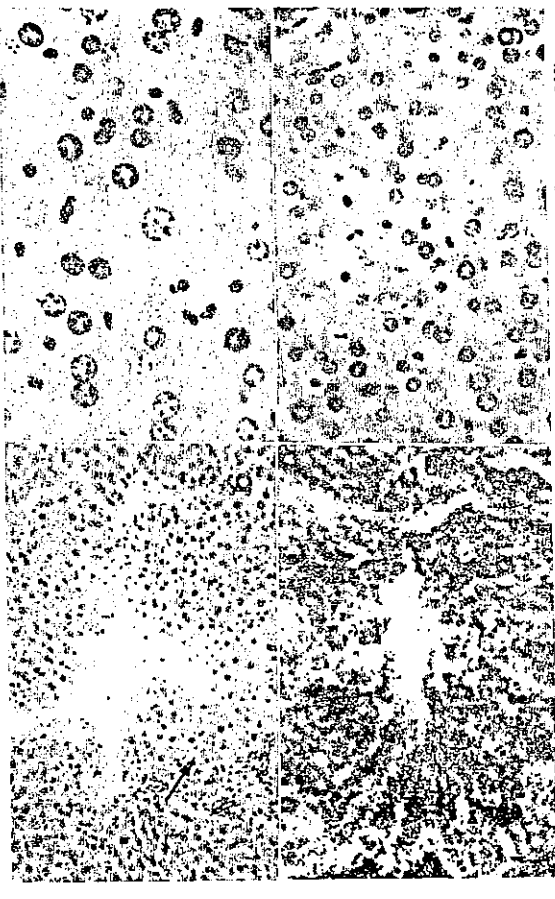


Fig. 6. Liver in dead mouse with diffusional necrosis near blood vessels. (H-E stain, x200)  
 Fig. 7. Liver in dead mouse with glycogen disappearance in the liver. (H-E stain, x200)  
 Fig. 8. Liver in dead mouse with fatty degeneration in the liver. (Sudan black B stain, x200)  
 Fig. 9. Disappearance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

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

4) 腎臓

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

5) その他の臓器

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

考 察

金田ら<sup>1)</sup>は高度不飽和性自動酸化物をマウスに経口投与した場合、小腸粘膜に細胞浸潤を認め、過酸化物は腸管を直接貫すとともに肝臓系を侵襲すると報告している。土田ら<sup>2)</sup>はLMHPOをマウスに経口投与し、腸管の高度の拡張と上皮細胞の空胞形成を認めている。Privettら<sup>3)</sup>はLMHPOを投与すると、腸管はいくぶん拡張し下痢を起こしたと述べている。

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

肝臓の変化をみると、土田ら<sup>2)</sup>は該の大小不同と細網

栄養と食糧

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

前記のごとく、Privettら<sup>3)</sup>はラットにLMHPOを尾静脈注射すると組織障害は肺にだけおこり、経口投与の場合には障害はまったく認められないとしているが、肺の障害としては水腫、うっ血、出血、結核様の浸潤を認めている。著者らは経口投与でもうっ血、出血などを認めたが、さらに全マウスに無気肺部と壊死巣が強くみられた。Privettらの結果よりも本実験の所見のほうが強く現われたのは、LMHPOの投与量の差によるものと考えられる。そして血管内投与、経口投与を問わず同じような所見が得られたところから、LMHPOは経口投与によって、小腸から吸収されて肺に直接作用する可能性が推察された。

腎臓については、金田ら<sup>1)</sup>は髄質と皮質との境界付近に尿管の拡張と浸潤を認めている。本研究では金田らの報告よりも著しく強い障害があらわれ、とくに糸球体に壊死と充血が起こり、尿管には脂肪沈着や主部尿管の空胞形成、出血、硝子滴変性、脂肪沈着などを認められた。このことからLMHPOおよび2次酸化生成物投与によって尿管の排泄機能の低下が推定されると同時に、上述の諸臓器の障害と同じ種類の障害がおきていることが明らかである。

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

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

三 号	Death	Survival	M-2	Death	Death	A-1	Death	A-2	Survival
Hemorrhage	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Congestive hyperemia of the lung	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dilatation of the blood vessels	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Appearance of macrophagocytes	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Focal necrosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atelectasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Drooping of branchiole epithelium	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deposition of substance like protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Epithelial proliferation	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Epithelial thickness	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Epithelial drooping	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Necrosis of epithelial cells	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alveolar rupture	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alveolar dilatation	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Alveoli of lung

Group

Table 5. Histopathological observation in the kidneys orally administered LMHPOs or AOML on mice.

Glomerulus 糸球体	Group			
	M-1	M-2	M-1	M-2
腎臓 Necrosis	+	+	+	+
腎臓 Epithelial thickness of Bowman's capsule	+	+	+	+
腎臓 Dilatation of Bowman's space	+	+	+	+
腎臓 Congestive hyperemia	+	+	+	+
腎臓 Necrosis	+	+	+	+
腎臓 Pyknosis	+	+	+	+
腎臓 Albuminuria cylinder	+	+	+	+
腎臓 Dilatation of tubules	+	+	+	+
腎臓 Vacuolic degeneration of proximal portion	+	+	+	+
腎臓 Fatty degeneration of proximal portion	+	+	+	+
腎臓 Hyaline droplet degeneration of tubules	+	+	+	+
腎臓 Hemorrhage	+	+	+	+

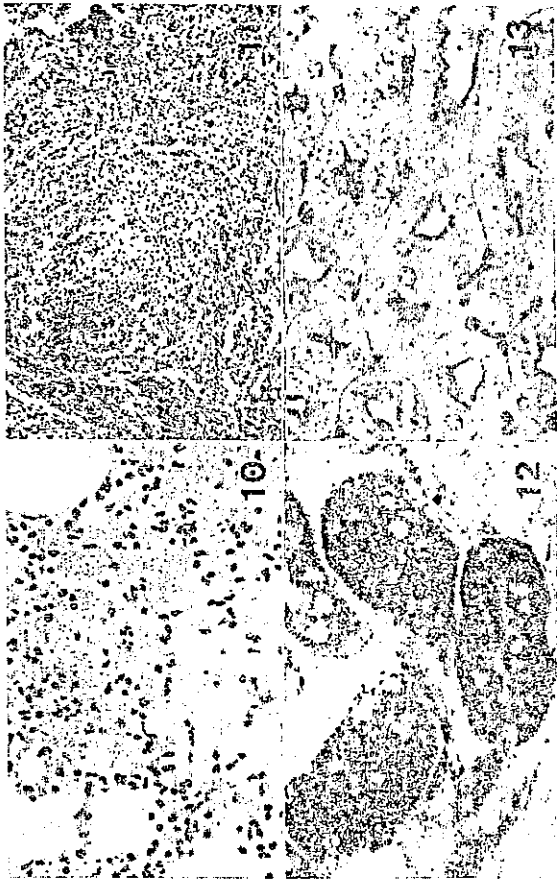


Fig. 10. Lung in dead mouse exhibiting congestive hyperemia with dilatation of blood vessels. Necrosis and dilatation of alveoli are also observed. (H-E stain,  $\times 100$ )

Fig. 11. Kidney in dead mouse with necrosis and hemorrhage in the renal tubules. (H-E stain,  $\times 100$ )

Fig. 12. Kidney in dead mouse with fatty degeneration in the proximal portion tubules. (H-E stain,  $\times 400$ )

Fig. 13. Kidney in dead mouse with hyaline droplet degeneration in the renal tubules. (PAS stain,  $\times 400$ )

含むため、少量でも各組織に対する影響が大きいためと思われた。

要 約

自動酸化油の毒性発生病態を明らかにするため、LMHPO および2次酸化生成物をマウスに経口投与し、急性毒性実験を行ない、小腸、肝臓、肺臓、腎臓などの各組織について病理組織学的に検索した。

- 1) LMHPO および2次酸化生成物による死亡マウスの小腸、肝臓、肺臓、腎臓などの組織には壊死が共通してみられ、またこれらの組織に脂肪沈着がおこっていた。さらに右装置には、血管の拡張と充りっ血が認められた。これらの障害の程度はマウスに対する毒性の強さと平行していた。
- 2) LMHPO および2次酸化生成物による毒性発生病態を病理組織学的にみると、程度の差はあるがいずれ

も同じような症状を呈した。このことから、各有毒物質の毒性発生病態は同様と推察された。

本研究を行なうにおいて、組織標本の作製にあたって懇切なご指導をたまわった東北大学産産学料米谷定光氏に厚く感謝の意を表します。

本研究は昭和50年5月第29回日本栄養・食糧学会総会で発表された。

文 献

- 1) 金田尚志, 石井清之助, 酒井秀忠, 荒井君枝: 東海水産報, 12, 1~73 (1955); 日本誌, 20, 658 (1954)
- 2) 吉岡辰子, 金田尚志: 油化学, 21, 316 (1972)
- 3) Cortesi, R. and Privett, O.S.: *Lipids*, 7, 715 (1972)
- 4) Nakamura, M., Tannaka, H., Hatori, Y. and Watanabe, M.: *Lipids*, 8, 566 (1973).

- 5) 土田雅子, 三浦利元, 武藤 健, 宮木高明: 油化学, 22, 259 (1973)
- 6) Kepller, J.C., Sparreboom, S. and Von Mikusch, T.D.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 36, 308 (1959)
- 7) Olcott, H.S. and Dolev, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 114, 820 (1964)
- 8) 熊沢 恒, 大山 保: 油化学, 14, 167 (1965)
- 9) Kokatnur, M.G., Bergan, J.G. and Drapper, H.H.: *Anal. Biochem.*, 12, 324 (1965)
- 10) 吉岡俊子, 金田尚志: 油化学, 23, 321 (1974)
- 11) 佐野 豊: 組織学研究法, 67, 179, 456, 480 (1974), 南山堂 (東京)

(昭和50年9月16日受理)

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

徳田 節子, 鈴木 紳, 金田 尚志  
東北大学農学部食糧化学科

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

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

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

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

(Received October 20, 1975)

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

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

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

〒 980 仙台市堤通南宮 1-1

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

### 実験方法

実験1 <sup>14</sup>C-標識エリタデニンの合成と取りこみ

- 1) <sup>14</sup>C-標識エリタデニン [2(R), 3(R)-dihydroxy-4(8-<sup>14</sup>C-9'-adenyl) butyric acid] の合成

Fig. 1 に示すごとく物質 I (藤沢薬品 K.K. 提供) 120 mg, 酢酸 0.1 ml に H<sup>14</sup>COOH (英国, The Radiochemical Centre 製) 2 mCi を混じり 100°C 湯浴上で 1 時間還流加熱後、過剰の酢酸を除くため、脱塩水による洗浄と乾固をくり返し、つぎに 1N NaOH 2 ml を加え 100°C 湯浴上で 30 分間還流加熱、放冷後、10% HCl で pH を 3 に調節し析出した結晶を濾別し、水洗、乾燥しエリタデニン (III) を得た。

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

# 自動酸化油の毒性に関する研究 (第 8 報)

## 自動酸化油の毒性に及ぼすトコフェロールの効果

白 台 鴻\*・金 田 尚 志

東北大学農学部食糧化学科 (仙台市青葉区青葉町 1-1)  
\* 現住所: ソウル特別市東区吾堂洞山 6-2 漢陽大学校医学科

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

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

Tai Hong PAIK and Takashi KANEDA

Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University (1-1 Tsutsumi-dori, Amamiya-machi, Sendai)

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

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

### 1 結 言

著者らは自動酸化油の毒性発現機構を究明するため過酸化油及びその二次酸化生成物をマウスに経口投与し、急性、慢性毒性時の小腸、肝、肺、じんなどの各組織における病理組織学的変化を接視した<sup>1)</sup>。

最近、自動酸化油の毒性の予防や防衛にビタミンEが有効であることが明らかにされつつあるが、これらは生

態実験 AOML-1: Autoxidized methyl linoleate contained hydroperoxides  
AOML-2: Autoxidized methyl linoleate contained secondary oxidation products

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

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

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

### 2 実 験

#### 2-1 試料の調製

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

Table-1 Characteristics of sample oils.

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

\* MMW: Mean molecular weight

\*\* AOML: Autoxidized methyl linoleate

#### 2-2 動物実験

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

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

Group	Sub-group	Tocopherol dose mg/20g mouse/d	Sample dose ml/20g mouse	No. of mice	Average of body weight at each time of oral administration of sample, h					Loss of body weight (%)
					0	5	10	24	24	
AOML-1	1	None	0.5	5	23.7	22.0	21.1	18.7	21.3	15.8
	2	<i>d-α</i>	Toc 30	5	21.1	19.7	19.3	17.8	19.2	19.2
	3	<i>dl-α</i>	Toc 30	5	22.6	21.1	20.4	18.3	19.2	15.0
	4	<i>dl-α</i>	Toc 60	5	23.5	21.3	21.7	19.8	19.2	15.0
	5	<i>d-γ</i>	Toc 30	5	21.6	20.0	19.2	18.4	19.5	14.4
AOML-2	1	None	0.3	5	21.3	20.3	19.7	18.2	19.8	12.0
	2	<i>d-α</i>	Toc 30	5	22.6	22.0	21.7	19.8	19.6	12.1
	3	<i>dl-α</i>	Toc 30	5	22.3	21.5	21.2	19.6	19.0	11.6
	4	<i>dl-α</i>	Toc 60	5	21.5	20.4	19.9	19.0	19.0	11.6
	5	<i>d-γ</i>	Toc 30	5	21.9	21.2	20.5	19.2	19.2	12.3

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

に処理したマウスを死亡マウスは死亡直後は、AOML-1 区は試料投与 20 h 後、AOML-2 区は 10 h 後、マウスを断頭と標し小腸、肝、肺、じんらの各組織を採取し既報<sup>1)</sup>の通り標本を調製し、各 Toc の効果を病理組織学的に接視した。

### 3 結 果

#### 3-1 各実験群の体重変化、死亡率及び肉眼的観察

実験 1: 試料投与 24 h までの体重変化を Table-2 に示した。AOML-1, 2 区とも Toc 投与群と対照 (Toc 無添加) 群間に体重の差が認められた。すなわち、AOML-1 区においても対照群 14.4% 減少に対し、Toc 群は 11.6~12.3% と対照群に比べ体重減少は少なくなつた。特に、両区とも *d-α* Toc と 2 倍量の *dl-α* Toc 投与群の体重の減少は少なくなつた。

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

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

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

Table with 5 columns: Group, Sample dose mg/20g mouse/d, No. of mice, No. of death at each time after oral administration of sample, h, No. of survival after 72h. Rows include AOML-1 and AOML-2 groups with various treatments like None, d-a Toc 30, dl-a Toc 30, etc.

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

Table with 5 columns: Group, Sample dose mg/20g mouse, No. of mice, No. of survival after oral administration of sample, No. of survival after oral administration of sample. Rows include AOML-1 and AOML-2 groups with treatments like None, d-a Toc 30, dl-a Toc 30, etc.

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

5匹中3匹が死亡したが、Toc投与群はそれぞれ1匹死亡したのみであった。AOML-2区では対照群は試験投与10hまで5匹中4匹が死亡し1匹が生じたが、dl-a Toc投与群では5匹中3匹、dl-g Toc投与群は4匹中2匹が生じた。とくに、d-a Tocと2倍量のdl-a Toc投与群では生マウスが生じた。すなわち、AOML-2区においても実験1と同様にTocの効果は認められた。

3-2 病理組織学的所見

実験2の全マウスから採取した小腸、肝、肺、じん臓の組織に対する病理組織学的所見は次のとおりである。

1) 小腸: AOML-2区の小腸で認められた所見をTable-5に示した。対照群の死亡マウスと各Toc投与群の死亡マウスにはじょう毛の先端部に線状に認められた(Fig-1)。また、上皮細胞、粘膜炎、粘膜炎下組織には腸筋の異常沈着がみられ、リンパ管、血管の拡張もみ

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

Table with 10 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose mg/20g moused, Status, Vacuole degeneration of the epithelial cells, Necrosis, Glanular degeneration of the tunica propria, Epithelial cells, Tunica propria, Tela submucosae, Dilatation of the blood vessels, Degeneration of the blood cells. Rows include AOML-2 groups with treatments like None, d-a Toc 30, dl-a Toc 30, etc.

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

上皮細胞の空泡性変性: 腸管の空泡性変性, 腸管の壊死, 腸管のリンパ管拡張, 腸管の血管拡張, 腸管の出血, 腸管の炎症, 腸管の腫脹, 腸管の萎縮, 腸管の壊死, 腸管の生存.



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



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

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

Table with 10 columns: Group, Sub-group, Tocopherol dose mg/20g moused, Status, Diffusional necrosis in the livers, Nuclei of liver cells, Atrophy of the liver cells, Activation of reticuloendothelial system, Congestive hyperemia of the livers, Dilatation of the portal veins, Fatty deposition, Lipids, Sudan black B stain, Fatty deposition, Liver cells, Endothelium, Polysaccharides, Glycogen deposition, Pyknotic cells, Appearance of binuclear cells, Irregularity in the nuclear sizes, Appearance of large and giant nuclei, Disappearance of nuclei.

肝臓: 肝臓の腫大, 肝臓の萎縮, 肝臓の壊死, 肝臓の生存, 肝臓のリンパ管拡張, 肝臓の血管拡張, 肝臓の出血, 肝臓の炎症, 肝臓の腫脹, 肝臓の萎縮, 肝臓の壊死, 肝臓の生存.



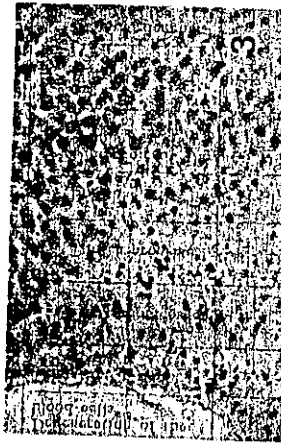


Fig-3 Liver in dead mouse fed AOML-2 as control. The severe diffusional necrosis is observed in the livers. (H-E stain, X100)

リコーゲンでは消失し、中性脂肪が顕著に沈着していた。各 Toc 投与群の死亡マウスでは対照群とほぼ同様の変化が認められたがこれら各群の障害は極めて軽微であった。各 Toc を投与した群の生存マウスではグリコーゲンは残存し、中性脂肪の沈着は軽微であるいはみられない。対照群の生存マウスと比べるとグリコーゲンの程度は Toc 投与群と一致していた。特に、 $d-\alpha$  Toc と 2 倍量の  $d-\alpha$  Toc 投与群では肝臓の障害は少なく (Fig-4)、グリコーゲンの程度は多量に存在していた。肝臓における組織障害の程度は Toc 投与群の効果を程度を比較することができ、このことは AOML-1 区においても同様であった。

肝臓でのグリコーゲンの消失と中性脂肪沈着の関係をみると、Table-7 に示すようにグリコーゲンの消失とともに中性脂肪の沈着が起るが生体作用の強い Toc ではグリコーゲンの消失は多く中性脂肪の沈着は少なかった。また、組織障害の改善効果は大きかった。

Table-7 Effect of orally administered tocopherols to modify liver triglyceride and glycogen disappearance on the acute toxicity of AOML-1 and AOML-2 in male mice.

Group	Sub-group	Tocopherol dose mg/20 g mouse/d	Sample dose ml/20 g mouse	Glycogen residue	Triglyceride deposition	Physiological modification
AOML-1	1	None	0.5	-	+++	+L
	2	$d-\alpha$ Toc 30	0.5	+L	-	L
	3	$d-\alpha$ Toc 30	0.5	+	L	++
	4	$d-\alpha$ Toc 60	0.5	++	-	+++
	5	$d-\gamma$ Toc 30	0.5	L	+	+
AOML-2	1	None	0.3	-	+++	++
	2	$d-\alpha$ Toc 30	0.3	++	L	+
	3	$d-\alpha$ Toc 30	0.3	+-	-	+++
	4	$d-\alpha$ Toc 60	0.3	+++	-	+
	5	$d-\gamma$ Toc 30	0.3	+	+	+

Tocopherols were administered for 5 d prior to oral AOML-1 and AOML-2 intubation. Each sub-group was consisted of five male mice.

The mice were killed at 20 h (AOML-1) and 10 h (AOML-2) after oral intubation of sample. The staining methods were as follows: for polysaccharide, PAS method; for lipids, sudan black B.

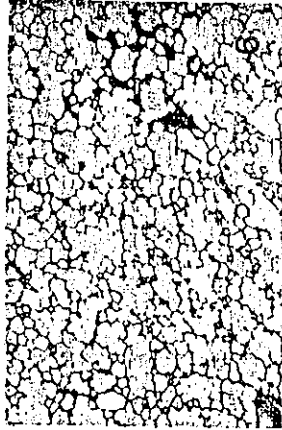


Fig-8 Lung in survival mouse fed  $dl-\alpha$  Toc and AOML-2. The lung is nearly normal. (H-E stain, X40)



Fig-7 Kidney in dead mouse fed AOML-2 as control with dilatation tubules, necrosis on the renal tubules and necrosis of glomerulus etc. The severe injury is observed in the kidneys. (H-E stain, X100)

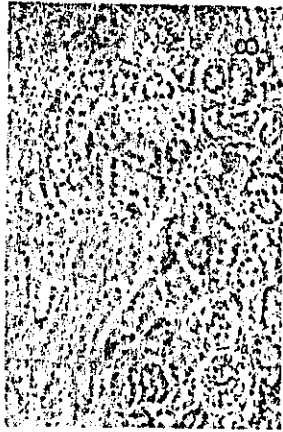


Fig-8 Kidney in survival mouse fed  $dl-\alpha$  Toc and AOML-2. The kidney is nearly normal. (H-E stain, X100)

ML-1、2 区とも対照群で認められる組織障害は防衛され、小腸、肝臓の場合と同様にその障害は軽微または正常に近い様を示した (Fig-5、8)。

### 4 考 察

著者はさきに過酸化脂質及び二次酸化生成物とマウス急激な急性毒性時の組織障害は小腸に最も強く現れること

を認めたり、すなわち、死亡マウスの小腸には粘膜炎の壁死と脂肪の異常沈着が顕著であり、次いで肝、肺、じん臓に組織障害を認めたり、これら各組織の障害は  $d-\alpha$ 、 $dl-\alpha$  Toc を投与するといずれもその毒性を抑え、生存時間は延長され、死亡数は減ることを認めた。すなわち、各 Toc 投与群の生存マウスにはその効果が顕著に現れ、小腸粘膜の上皮細胞の変態形成が軽微となり、正常に近い状態を示し、Toc 無添加の対照群でみられた症状が軽減された。このことから Toc は小腸の組織障害を防御する効果が明らかとなつた。この効果の程度は同一量の Toc を与えた群のうち、生理作用の最も強い  $d-\alpha$  Toc の効果が最大で、また 2 倍量の  $dl-\alpha$  Toc を与えた群には一層の効果が認められた。一方、抗酸化力の強い  $d-\gamma$  Toc の効果は劣った。いずれにしても、過酸化脂質及び二次酸化生成物投与時の小腸の上皮細胞の障害に対し、各 Toc の事前投与は正常に近い細胞構造を維持し、各 Toc からは Toc 類は小腸粘膜の透過を防ぐ働きをもつとしており、腸管からは  $d-\alpha$  Toc は生体内で生体作用の機能維持に関係しているとし、緒引ら<sup>11)</sup>は事前投与でも同時投与でもともに抗酸化作用を示し、炎症の激化と出血は抑制されると述べている。また、岩瀬<sup>12)</sup>はビタミン E は細胞分裂ないし促進物質として細胞増殖並びに核酸合成に不可欠因子であるとしている。

本実験からも Toc の効果は抗酸化性のみでは説明できず、Hann<sup>13)</sup>が観察したように Toc 類は小腸粘膜を安定化し吸収に対する Barrier を改善し、腸のぜんじつ運動を抑制する一方、細胞の増殖作用、抗酸化作用など重要な役割を果していると考えられる。

Olcott ら<sup>14)</sup>は過酸化脂質を腹こう内注射した時、事前投与に Toc を腹こう内注射しても LD<sub>50</sub> 量を変化させないとしたが、これは投与法の差異によるものと考えられる。

各 Toc 投与は小腸以外他の組織障害も著しく改善される。すなわち、肝臓においては対照群の死亡マウスでみられた各種の症状は Toc 類を与えることにより軽減された。過酸化脂質及び二次酸化生成物により誘起される腸変態中核に顕著な変化はグリコーゲン消失とトリグリセリドの沈着であったが、これらの症状も Toc 投与群の生存マウスでは改善され、グリコーゲンは残存しトリグリセリドの沈着もおこっていない。 $d-\alpha$  Toc と 2 倍量の  $dl-\alpha$  Toc 投与群では肝臓の障害は少なくグリコーゲンは多量に存在していた。肝臓の組織障害も小腸の場合と同様、抗酸化力の強い  $d-\gamma$  Toc より  $d-\alpha$  Toc の効果が顕著であった。このことから肝臓障害に対する Toc 類の抑制作用として抗酸化作用以外の生理作用を想定せざるを得ないが、本研究ではこの防御作用機構がいかなるものかは究明できなかった。衣巻ら<sup>15)</sup>は  $dl-\alpha$  Toc をあらかじめ飼料に混合して与える肝臓での過酸化

化物によるトリグセリドの蓄積は認められず、加熱分解物に対しては無効としたが、本実験においては二次酸化生成物を含むリノール酸メチルに対してはトリグセリドの蓄積を改善させた。

肺、じんでも小腸や肝と同様なことがいえる。本研究において各 Toc の効果は二次酸化生成物を投与した AO=MDL-2 区においてはまきりと現れた。これは投与量の差によるものと思われ、その原因はなお不明である。

以上のように各 Toc の効果は全組織に表れていて、これら各 Toc がどの点で組織障害をブロックしているのが今後の研究にまつところが多い。各臓器に対する Toc の防御作用と各種 Toc の酸化効果の強さは一致してはなかったことは、自動酸化油毒性の防御には酸化性以外の生理作用が関与していることを示唆している。

## 5 要 約

自動酸化油投与マウスの急性毒性による各種組織障害を各種 Toc が防御しうるかを確かめるため、d- $\alpha$ 、dl- $\alpha$ 、d- $\gamma$  Toc をマウスに事前投与し病理解毒的酸化を比較し、つぎの結果を得た。

1) 各種の Toc を事前に経口投与すると d- $\alpha$ 、dl- $\alpha$ 、d- $\gamma$  Toc はいずれも過酸化物質及び二酸化生成物の毒性を抑え、生存時間は延長され、死亡数も減少することを認めた。また、病理組織学的観察から追加効果を認め、各臓器の障害は軽減される。

2) 同一量の Toc を与えた群の酸化性以外の残存 d- $\gamma$  Toc よりも d- $\alpha$  Toc の酸化性以外の残存 Toc を与えた群に比べる効果をもとめた。このことから、各組織の障害に

に対する Toc 類の防御作用として酸化性以外の生理作用が推察された。

3) これらの効果は二次酸化生成物投与群において特に顕著であった。

本研究を行うに当たり、各種 Toc を提供されたニッポン油脂株式会社、及び組織学的研究に對し懇切な御指導をたまわった東北大学農学部産産学研究室野野原教授に厚く感謝の意を表します。

本研究は昭和54年4月30日日本薬業・畜産学協会誌で発表された。  
(昭和53年4月17日受理)

## 文 献

- 1) 白 台鴻, 野野原, 金田尚志, 榮賀と重徳, 29 (2), 68 (1976)
- 2) 白 台鴻, 金田尚志, 油化学, 27, 606 (1978)
- 3) H. Kaunitz, C.A. Slancuz, R.E. Johnson, *J. Nutr.*, 55, 577 (1955)
- 4) E. Degkwitz, K. Lang, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 64, 893 (1962)
- 5) J. Bunyan, J. Gree, E.A. Murrell, A.T. Diplock, M.A. Cawthorne, *Br. J. Nutr.*, 22, 97 (1968)
- 6) 系巻重徳, 田中雄, 36 (8), 854 (1970)
- 7) 山田隆憲, 宗田重徳, 衣巻重徳, 栗田直雄, 野野原誠, *ビタミン*, 48 (3), 145 (1972)
- 8) 栗田直徳, 衣巻重徳, 山田隆憲, 片山 理, *ビタミン*, 49 (5), 250 (1973)
- 9) J.G. Bergan, H.H. Drapper, *Lipids*, 5, 976 (1976)
- 10) 福原重典, 野野原, 松川裕子, 五十嵐 節, *ビタミン*, 45, 633 (1972)
- 11) 野野原, 小川和明, *ビタミン*, 49 (3), 121 (1975)
- 12) 松川裕子, *ビタミン*, 50 (5, 6), 169 (1976)
- 13) L.R. Horn, M.O. Barker, G. Reed, M. Brin, *J. Nutr.*, 104, 192 (1974)
- 14) H.S. Oleout, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 114, 850 (1963)
- 15) 衣巻重徳, 栗田直徳, 野野原, 栗井忠枝, 栗 秀雄, *ビタミン*, 34 (2), 268 (1968)

## 6-メチル-5-ヘプテン-2-オンとマロンニトリルの反応

渡辺昭次\*・藤田 力\*・須賀恭一\*・阿部晴彦\*・鶴田治樹\*\*

\* 千葉大学工学部工業化学科 (千葉市弥生町)  
\*\* 高砂香料工業 (株) 綜合研究所

### Reaction of 6-Methyl-5-hepten-2-on with Malononitrile

Shoji WATANABE\*, Tsutomu FUJITA\*, Kyoichi SUGA\*, Haruhiko ABE\*, and Haruki TSURUWA\*\*

\* Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Chiba University (Yayoicho, Chiba)

\*\* Central Research Laboratory, Takasago Perfumery Co., Ltd. (No. 36, 5-Chome, Kamata, Ohita-ku, Tokyo)

Unsaturated nitriles were synthesized in good yields from 6-methyl-5-hepten-2-one and active methylene compounds containing nitrile group. From methylheptenone and malononitrile, 2-cyano-3,7-dimethyl-2,7-octadienenitrile was obtained in 91% yield. The unsaturated nitriles were alkylated at the 3-position by various Grignard reagents. Furthermore, reduction and hydrolysis of these unsaturated nitriles were examined.

## 1 序

テルペン系化合物の合成の重要な中間体である 6-メチル-5-ヘプテン-2-オン(1)は、最近工業的に多量に製造できるようになり、香料として重要なリナロール、ゲラニオールなどの合成原料となっている。このように容易に入手できるようになった(1)の利用として、本研究では(1)とマロンニトリル、シアノ酢酸、シアノ酢酸エチルなどとの反応について検討し、また反応生成物と Grignard 試薬との反応について述べる。

## 2 実 験

2-1 メチルヘブテン(1)とマロンニトリル(2)の反応

方法A: ニスチル管を付けた丸底フラスコに酢酸アンモニウム 0.8g (0.01 mol)、酢酸 1.2g (0.02 mol)、ペンゼン 100 ml (2) 7.9g (0.12 mol)、(1) 12.6g (0.1 mol) をいれて 1h 還流した。反応溶液を水洗後、硫酸ナトリウム(無水物)で乾燥した。ベンゼンを留した後、減圧蒸留して次の留分を得た。留分(i): bp ~95°C/3 mmHg, 収量 0.6g; 留分(ii): bp 98~101°C/3 mmHg, 収量 12.6g。留分(i)は原料の(1)と(2)の混合物、留分(ii)は 2-シアノ-3,7-ジメチル-2,6-オクタジエンニトリル(3) (純度 98% (収率 91%)) であった。化合物(3)は次の性質を示した。IR (cm<sup>-1</sup>): 2250 (-C≡N)

## 2-2

メチルヘブテン(1)とシアノ酢酸エチル(4)の反応

方法C: 金属ナトリウム 2.3g (0.1 mol) をエタノール 100 ml に溶かした溶液に(4) 12.6g (0.12 mol) を加え 0.5h かくはんした後、氷で冷却しながら(1) 12.6g (0.1 mol) を滴下し 6h かくはんした。反応混合物をイソプロピルエーテルで抽出しエーテル溶液は水で洗浄後、硫酸ナトリウム(無水物)で乾燥した。エーテルを留した後、減圧蒸留して次の留分を得た。留分(i): bp ~59°C/2 mmHg, 収量 5.8g; 留分(ii): 留分(i)は原料の(1)と(4)の混合物であり、留分(ii)は 2-シアノ-3,7-ジメチル-2,6-オクタジエンニトリル(5) (純度 95% 以上) (収率 44%) であった。IR (cm<sup>-1</sup>): 2245 (-C≡N), 1730 (-C=O)

N), 1600 (C=C), 1670, 830 (-CH=C-); NMR ( $\delta$ , ppm): 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-), 1.70 (3H, s, CH<sub>3</sub>-), 2.2 (3H, s, CH<sub>3</sub>-), 2.5 (4H, m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 5.1 (1H, t, J=6Hz, -C=CH-); MS (m/e): M<sup>+</sup>=174。

方法B: 水 100 ml に水酸化ナトリウム 0.5g を溶かした溶液に(2) 7.9g (0.12 mol) とニトリル 100 ml を加え 0.5h かくはんした後、氷で下(1) 12.6g (0.1 mol) を滴下し 3h かくはん後一夜放置した。常法通り処理して化合物(3) 10.3g (bp 94~102°C/2 mmHg) (収率 68%) を得た。

### Denaturation and Toxicity by Autoxidation and Heat Treatment of Oils and Fats

Noboru Matsuo  
Department of Chemistry, College of Engineering,  
Seikei University.

#### summary

(1) When the diet containing 5% ethyl esters of highly unsaturated fatty acids obtained from cuttle fish oil was given to rat, it showed quite the same good nutritive effect as the diet containing ethyl oleate.  
To the contrary, the autoxidized form of the above-mentioned unsaturated fatty acid esters showed an extremely toxic effect to rat.  
The toxicity of autoxidized fatty acid ester ran parallel to the content of peroxide.

When autoxidized ethyl ester of unsaturated fatty acid was mixed with aqueous solution of protein and left at 37°C, the protein degenerated and orange-brown colored precipitate was formed.

Enzymes were also affected in activity by autoxidized ester.  
(2) The polymerized fish oil obtained by heating at 250°C for 10 hours showed remarkable toxicity when rats were fed on basal diet containing 20% of it. This toxicity was found due to cyclic compounds, which was separated by the urea adduct forming method. The rats all died in three or four days, when the cyclic compound was given to them, but did not die at all with straight chain compound.

Ethyl linolenate, which was thermally polymerized at 250°C in a carbon dioxide stream for 40 hours, had a toxic effect upon a rat. The origin of the toxicity of thermally polymerized ethyl linolenate was a cyclic monomer, and the main component of this cyclic monomer was a compound having a cyclohexene ring.

An adduct compound of ethyl  $\beta$ -eleostearate and acrolein having cyclohexene ring in its molecule was synthesized. This showed severe toxicity when rats were fed on basal diet containing 10% of it.

自動酸化または加熱重合をうけた油脂は、新鮮なものに したり。魚油としては、微黄色透明、淡茶色 182.5 の情 比して栄養価を低下し、さらに毒性を興すことが最近の 製イカ油を使用したのが原因の 高度不飽和脂肪酸を分離する方 研究によって明らかとなった。魚油、植物油およびそれ 法としては、fig. 1 に示したようにソーダ塩アセトン法<sup>2)</sup> から分離した脂肪酸を用いて、これを酸化または加熱し によって、高度不飽和脂肪酸を常法によってエステル化 し、このエステルエステルを真蒸留 (2 mmHg) する、 かくして得られた各成分の性状は、table 1 に示した 通りであって、205~215°C の留分を主として実験に使 用した。

一患者でケイ酸分析法で再検し異常を認めなかったとし ている。筆者らは PNH の一例を経験したので、TL C による赤血球脂質の分析をおこなったが、正常人に比 し著明な変化を認めることができなかった。

#### ま と め

TLC にデントンマトリオンおよび化学的定置法を使用し、 血中脂質の分画測定を試み、各種疾患で血中脂質の変化 を追及し、つぎの結果を得た。

- 1) TLC とデントンマトリオンの併用により中世脂質の 分画測定が可能である。
- 2) TLC 分離後の P 定置によるリン脂質分画測定法は 精度・再現性がよく臨床的応用に便利である。
- 3) 肝疾患ではとくに閉塞性黄疸でコレステロール、ト リグリセリドの増加、リノレンチン比率の減少、レシチ ンの増加を認めるものが多い。
- 4) ネフローゼ症候群・高血圧・糖尿病などにおける高 コレステロール血症ではリン脂質分画比に著明な変化を 認めなかった。
- 5) 発作性夜間血色素尿症における赤血球リン脂質分画 測定では対照に比し有意の変化がみられなかった。

#### references

- 1) Weicker, H.: *Klin. Wschr.*, 37, 763 (1959)
- 2) Habermann, E., Bandtlow, G., Krusche, B.: *Klin. Wschr.*, 39, 816 (1961)
- 3) Vogel, W. C., Dozaki, W. M., Zieve, L.: *J. Lipid Res.*, 3, 188 (1962)
- 4) Zollner, N., Wolfram, G.: *Klin. Wschr.*, 41, 1101 (1962)
- 5) 葦水英隆: *日新医学*, 50, 85 (1963)
- 6) Bartlett, R. G.: *J. B. C.*, 234, 466 (1959)
- 7) Privett, O. S., Blank, M. L., Lundberg, W. O.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38, 312 (1961)
- 8) Phillips, G. B.: *J. Clin. Invest.*, 39, 1639 (1960)
- 9) Nye, W. H. R., Waterhouse, C., Marinetti, G. V.: *J. Clin. Invest.*, 40, 1194 (1961)
- 10) Nye, W. H. R., Waterhouse, C.: *J. Clin. Invest.*, 40, 1202 (1961)
- 11) Phillips, G. B., Roome, N. S.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 100, 489 (1959)
- 12) Reed, C. F., Swisher, S. N., Marinetti, G. V., Edén, E. G.: *J. Lab. Clin. Med.*, 56, 281 (1960)
- 13) Harris, I. M., Frankard, T. A. J., Westerman, M. P.: *Brit. Med. J.*, ii, 1276 (1957)
- 14) Barry, R. M.: *Brit. J. Haematol.*, 5, 212 (1959)
- 15) 戸塚、松岡、三原、金井: 第 33 回日本内科学会盛越 地方会誌表 (1963, 10)

肝疾患とくに閉塞性黄疸における血清リン脂質分画の 変動 (Ly の低下, L の増大) は Phillips<sup>8)</sup> もほぼ同様 の所見を報告しており、このうち L の増大は遊離コレス テロールの増加とともに主として肝からの胆汁排泄障害 を反映するもので、これに肝実質障害が加わって上記の パターンが惹起されたものと考えられる。

一方ネフローゼ症候群では肝実質と逆方向のリン脂質 分画の変化 (Ly と S の比率の増加と L の減少) をきた すとの報告<sup>9)</sup>があるが、筆者の症例ではほぼ正常値を示 しており、この相違は肝疾患の種類と枯瘼(ステロイド) の影響によるものと思われる。

赤血球リン脂質分画の正常値はカラムクロマト法<sup>10)</sup>で K 40%, L 32.9%, S 22.8%, Ly 1.9%, ケイ酸ら法<sup>11)</sup>で K 40%, L 30%, S 20%, Ly 2%, inositol phosphatide 4% とされ、Cis あり、本報告ではこれらに比 し K がやや少なく S が多い (TLC で inositol phosphatide は Rf が S に近く、これを台として測定している 可能性がある)。例数も少ないので、今後検討していきま い。

発作性夜間血色素尿症 (PNH) の赤血球リン脂質分 画異常 (コリン含有リン脂質の相対的減少) は Harris<sup>10)</sup> らにより報告され注目されたが、その後 Barry<sup>10)</sup> は同

これを室温に放置して自動酸化せしめたものはよび対照としてオレイン酸エステルを用いて、体重約60gの白ネズミに、基礎飼料に対して5% (約5ml) 与えて動物実験を行なったところ table 2 に示すように、酸化しない高度不飽和脂肪酸は、オレイン酸エステルと同様な栄養価を示したのに対して、自動酸化したものを与えた白ネズミは何れも数日して死亡した。高度不飽和脂肪酸エステルを自動酸化せしめたものは固い高値を現わすことを確認した。fig. 2 は自動酸化したエステルを5% 宛、同飼料を以て与え、途中から投与を中止した場合の白ネズミの1例であって、特異な外見の症状を呈し、顔の毛は脱毛し、口および後肢ははれ上り、腹部にのみ割れを生じて出血をみた。

以上の結果から魚油そのものも自動酸化せしめたならば高値を現わすであろうと推察し、イカ油を自動酸化せしめたもの (酸化物: 1140me/kg) を白ネズミに20%配合投与したところ、何れも10~15日にて死亡し、新鮮なものを与えた場合は良好な成長を示した<sup>3)</sup>。高度不飽和脂肪酸エチルエステルの自動酸化による過酸化物質および脂肪酸の変化と目録との関係は fig. 3 に示すようにであって、特異な外見の症状を呈し、顔の毛は脱毛し、口および後肢ははれ上り、腹部にのみ割れを生じて出血をみた。

fig. 1 Separation of highly unsaturated fatty acids by soda-acetone method

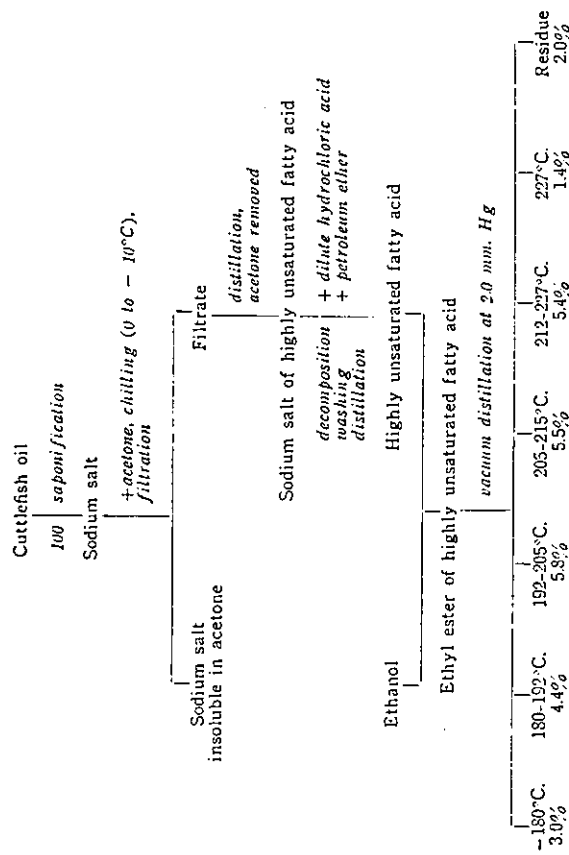


table 1 Properties of the fractions of highly unsaturated fatty acids (ethyl esters)

Fraction No.	Temperature, °C/2 mm Hg	Yield, percent	Yield, percent of raw oil	Iodine value, Wijs	n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	Saponification value
1	-180	10.8	3.0	232.3	1.4652	179.2
2	180-192	16.0	4.4	276.3	1.4700	176.0
3	192-205	21.3	5.8	320.0	1.4771	168.7
4	205-215	20.0	5.5	358.7	1.4823	163.9
5	215-227	19.5	5.4	384.9	1.4861	160.2
6	227-Residue <sup>2)</sup>	5.0	1.4	386.1	1.4902	155.7
7	Residue <sup>2)</sup>	7.3	2.0	—	—	—

1 Temp. of the first of drop the distillate: 140°C.  
2 Solid at room temperature.

table 2 Feeding record of rats fed unsaturated fatty esters

Kind of Ester Fed	Sex	Increase of Body Weight, Gm.		
		10th Day	20th Day	30th Day
ethyl oleate	♀	+11.0	+34.0	+61.0
	♂	+14.0	+51.2	+82.1
	Average	+12.5	+47.5	+71.5
ethyl ester of unsaturated fatty acid	♂	+7.7	+41.0	+75.8
	♀	+7.0	+38.5	+77.0
	Average	+3.2	+39.8	+76.0
oxidized form of the above ester	♀	— 3.8 (died on 6th day)	— 48.5	— 77.0
	♂	— 5.0 (died on 7th day)	— 44.5	— 75.0
	Average	— 8.5 (died on 3rd day)	— 46.5	— 76.0

fig. 2 Typical example of effect of feeding oxidized esters to mature rats



fig. 3 The change of peroxide (I) and iodine values (II) of the fatty acid ester exposed to air at room temperature (2-18°C)

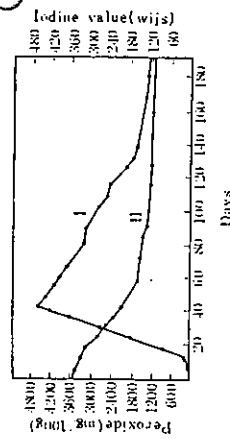
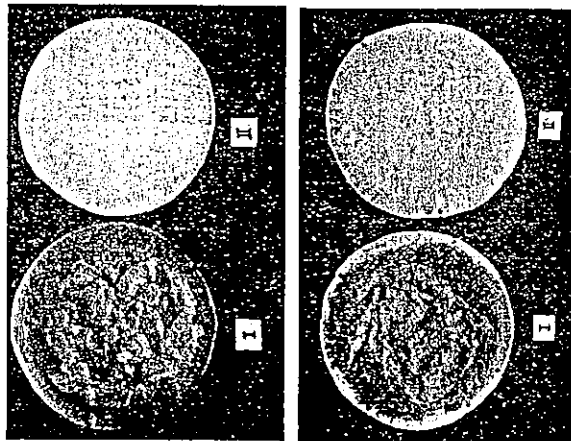


fig. 4は51時間および75時間経過後に経過したものの状態でIは酸化したもの、IIは酸化したものであり、IIは酸化したものを加えたものであり、Iは酸化しない、このように著しく蛋白質の性質を変え、付加は酸することから酸化エステルは酵素作用を抑制または停止するであろうと考え、succinodihydrogenase, salivary amylase, amylase に対する作用を検討したが、酸化エステルは明らかにその作用を抑制または停止せしめた、またアミノ酸も種々変化を受ける。

table 3に示すように健康な体重約1.5kgのウサギに、高度不飽和脂肪酸エチルエステル自動酸化物0.8mlを毎

fig. 4 Denaturation of protein by autoxidized ethyl ester of highly unsaturated fatty acid



upper figure after 51 hrs.  
lower figure after 75 hrs.

table 3 Feeding record of rabbits fed autoxidized esters

Sex	Initial weight, Gm.	Final weight, Gm.	Wt. decreased, Gm.	
A <sub>1</sub>	♀	1500	-210	died on 5th day
A <sub>2</sub>	♀	1570	-220	died on 12th day
A <sub>3</sub>	♂	1500	+20	died on 15th day
A <sub>4</sub>	♂	1720	-145	died on 5th day

日1回経口的に投与すると約2週間までに何れも死亡する。死亡したウサギの胃はその組織が著しくおかされておることを認め、とくにA<sub>1</sub>の場合には、胃壁が2カ所程非常に薄くなって居るのを認めた (fig. 5)。腸壁は健康なものに比べて弾力性が弱く、白ネズミの場合においても同様であった。自動酸化物を与えた白ネズミの病理的研究は、徳島大学医学部病理学教室 経方研究室、経方、大竹らによって究明せられている。なお酸化した油脂の毒性については、東海大学産科研究所 東研究室 においては、多くの研究が行なわれた。

油脂の加熱による変化と毒性  
加熱重合の段階からして試料油の不飽和度の高低が重合に最も密接な関係があるので、まづとくに不飽和度の高い魚油 (イカ油) を用いて加熱による変性と毒性の究明を行なった。魚油、精製イカ油を基礎飼料に20%混合、白ネズミに投与した場合に良好な成長を示すのに対して、このイカ油を空気中または酸素ガス気流中において、

fig. 5 Inside of the stomach of rabbit which died after taking 0.8ml of the autoxidized ester once every day



The coats of the stomach are ulcerous at the points marked a and b.

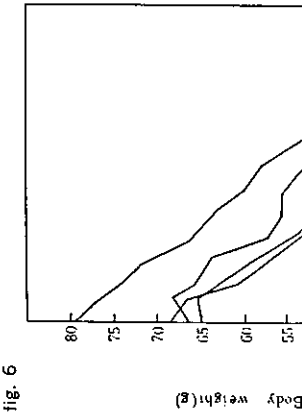
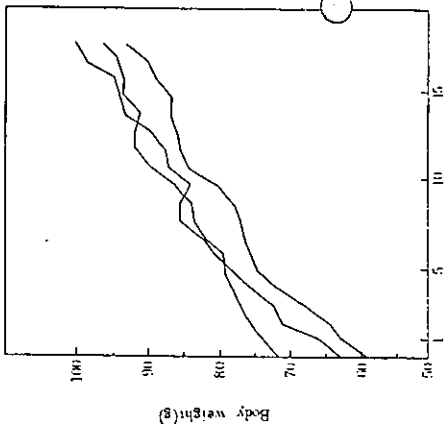


fig. 6

Growth of rats fed on basal diet containing 20 per cent of polymericized cuttle fish oil heated at 250°C for ten hours

fig. 7



Growth of rats fed on basal diet containing 20 per cent of ethyl linolenate

250°Cに10時間加熱重合したものは、20%配合投与した場合、fig. 6のように大体15日までに総べて死亡した。しかし5%混合程度にその量を減らすと、幾分成長は劣るけれども死亡するものはなかった。

加熱重合したイカ油をカセイソーダを触媒としてエタノールに抽出してエチルエステルとなし、尿素付加法を用いて、尿素と付加物を造るものと、造らないものとに分離した。尿素付加物を造るものは直鎖構造のものであり、造らないものは環状構造のものであると考えられ、白ネズミによる動物実験の結果は、直鎖構造のものを与えた場合はよく成長し、環状構造のものを与えた場合は悪い毒性を示した。

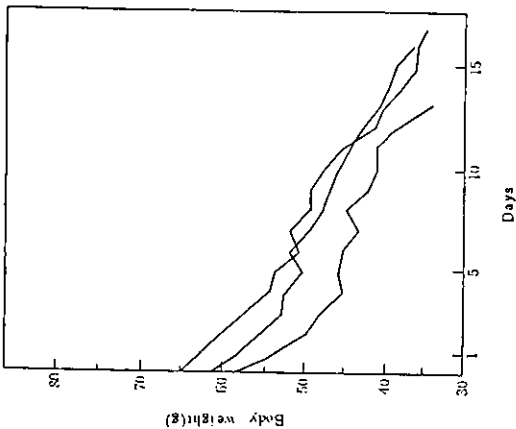
魚油に用いる精製菜種油によって実験を行なっても、魚油の場合より劣るけれども、環状構造のものは毒性を現わした。

加熱の場合の構造変化と、遊離との関係を検討するため、アマニ油から尿素法によって粗リノレン酸エチルを分け、真空蒸留 (1.5mmHg) して、167~170°Cの留分を得た。これを炭酸ガス気流中において、250°Cに40時間加熱 (無触媒) して加熱重合リノレン酸エチルとなした。ついで尿素付加法を行ない、得られた環状構造エチルを真空蒸留して、1.8~2.0mmHg, 175°Cまでに出す留出エステルと残留エステルとに分離した (各エステルの性状は table 4に示す)

table 4 Properties of esters

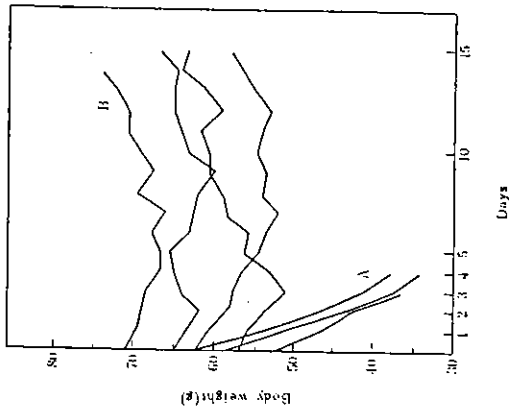
	n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	iodine value, Wjijis	saponification value	acid value	molecular weight, Kast
ethyl linolenate	1.4688	242.5	183.1	1.0	302
polymericized ethyl linolenate	1.4838	157.5	170.1	6.5	
straight-chain ester	1.4692	201.5	177.4	0.4	
cyclic ester	1.4891	142.5	168.6	7.3	
distilled ester	1.4751	159.4	171.0	7.4	293
residual ester	1.4948	135.8	168.5	8.2	

fig. 8 Growth of rats fed on basal diet containing 20 per cent of polymerized ethyl linolenate



All rats died at the ends of the curves.

fig. 9 Growth of rats fed on basal diet containing 20 per cent of distilled cyclic ester (A) and residual ester (B)



All rats died at the end of the A curve.

fig. 10 Infrared absorption spectra of ethyl linolenate (I) and distilled cyclic ester (II)

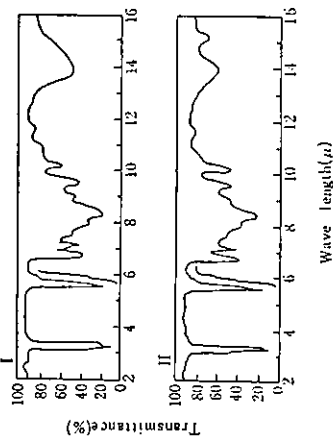
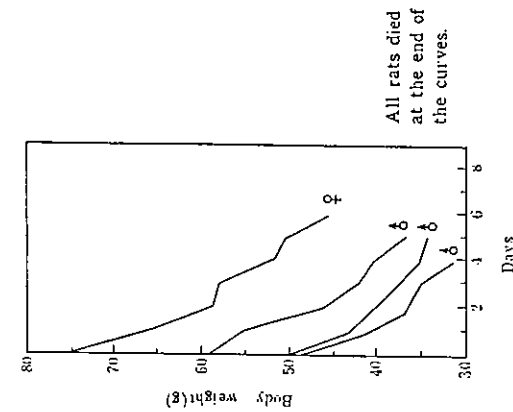


fig. 11 Growth curves of rats fed on basal diet containing ten per cent of adduct of ethyl  $\beta$ -eleostearate and acrolein



All rats died at the end of the curves.

Table 5 Properties of tung oil and derivatives

No.	Sample	$n_D^{20}$	Iodine value, Wj/s	Saponification value	Acid value	Molecular weight, Kist
i	tung oil	1.5063	173.7	194.2	5.4	—
ii	ethyl $\beta$ -eleostearate	1.4892	165.5 (166.0)	182.2 (183.0)	2.0	301 (306)
iii	ethyl $\beta$ -eleostearate acrolein adduct	1.4847	139.8 (140.3)	153.6 (154.7)	1.6	367 (362)

白ネズミによる動物実験の結果は fig. 7 のように、原リノレン酸エチルではよく成長するのに対して、加熱重合したリノレン酸エチルの場合は fig. 8 のように15日前後で全部死亡する。直鎖構造のものは原リノレン酸エチルと同様な栄養価を示すが、環状構造のものは毒性を示し、それを真空蒸留して分けた留出エステルと残留エステルを比較すると fig. 9 の A, B の如くであって、毒性の主体は留出エステルにあることが明らかとなった。この留出エステルは分子置換、赤外線および紫外線吸収スペクトル、そのほかの性状からして、環状単重合体であると考えられ、fig. 10 のように、リノレン酸エチルになかった  $15.2\mu$  ( $660\text{cm}^{-1}$ ) の吸収が新たに現れることなどからして、シクロヘキセン環を有し、2つの側鎖の一方に、二重結合1個を有する化合物を含むことが認められた。さらにこの留出エステルの芳香族化を行なってその構造を検討した。その後、加熱重合したアマニ油から著者と同様な方法によって得た留出エステルが、前述のような構造の化合物を主成分として含むことが、Mac Donald<sup>17)</sup>, Hutchison<sup>18)</sup> らによっても確認されている。

### ま と め

1) 魚油から分離した高度不飽和脂肪酸をエチルエステルとしたものは、オレイン酸エチルと同様な栄養価を示すが、これを自動酸化せしめたものは著しい毒性を示し、この毒性は過酸化物質と平行する。自動酸化した不飽和脂肪酸エステルは蛋白質、アミノ酸の性質を喪失し、酵素作用を抑制または停止せしめる。自動酸化エステルを白ネズミに与えた場合の病理解釈も突明した。

2) 魚油を真空申または炭酸ガス気流中に置いて  $250^\circ\text{C}$  に10時間加熱して得られた加熱重合油は白ネズミに対して毒性を示す。この毒性の主体は加熱の過程で生じた環状化合物によるものであり、直鎖化合物は毒性を示さない。

リノレン酸エチルを炭酸ガス気流中で、 $250^\circ\text{C}$  に40時間加熱重合し、これから炭酸法と真空蒸留によって環状単重合体を分離したが、このものは剛しい毒性を示した。分子内にシクロヘキセン環を有する化合物が、この環状単重合体の主成分であると認められたので、 $\beta$ -エレオステアリン酸エチルとアクロレインの付加物を合成して検討したところ同様な毒性を示した。

### references

- 1) 松尾: *J. Biochem.*, 41, 481 (1954)
- 2) 外山, 土屋: *工化*, 28, 963 (1925)
- 3) 松尾: *栄養と食餌*, 10, 255 (1958)
- 4) 松尾: *J. Biochem.*, 41, 647 (1954)
- 5) 松尾: *生化学*, 29, 769 (1958)
- 6) 金田, 松井, 五井: *日本誌*, 20, 50 (1954)
- 7) 松尾: *化学の新聞*, 11, 970 (1957)
- 8) 松尾: *生化学*, 29, 773 (1958)

9) 緒方, 大井, 河野, 北川, 忍水, 秋山: *Tohushima J. Exp. Med.*, 2, 150 (1955)  
 10) 金田, 石井: *日本誌*, 19, 171 (1953)  
 11) 金田, 西井, 石井: *日本誌*, 20, 658 (1954)  
 12) 松尾: *生化学*, 29, 895 (1958)  
 13) 松尾: *栄養と食糧*, 10, 255 (1958)  
 14) 松尾: *Tohushima J. Exp. Med.*, 7, 341 (1961)  
 15) 松尾: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 35, 105 (1962)  
 16) 松尾: *生化学*, 35, 313 (1963)  
 17) MacDonald, J. A., McInnes, A. G., Cooper, F. P.: *Canadian J. Chem.*, 39, 1906 (1961)  
 18) Hutchison, R. B., Alexander, J. C.: *J. org. chem.*,

S-4. 血中脂酸の transport および代謝について  
 —ネフローゼ症候群における脂酸代謝異常—

大島 研三 八杉 忠男 新美 毅  
 川名 広明 清水 隆 飯島 直  
 羽尾 裕司 菅原 利昌 水沢 滋夫

日本大学医学部 大島内科

discussion

内藤周幸 (北米・陸・内科): 13例中93のヨーロッパ型の型北の図は、何故に於けるものですか。

松尾: 炭酸ガス欠血中、250°Cで加熱した場合であります。

Metabolism and Transport of Fatty Acid in Human Plasma  
 —Lipoprotein Fatty Acid Composition of Nephrotic Subject—

Kenzo Oshima, Tadao Yasugi, Takeshi Niimi,  
 Hiroaki Kawana, Takashi Shimizu, Makoto Iishima,  
 Hiroshi Hara, Toshimasa Sugawara, Shigeo Nagasawa  
 Oshima's clinic, School of Medicine, Nihon University.

summary

Previously, we demonstrated a possibility that the hyper-low density lipoproteinemia in nephrotic state may be caused by the deficiency of heparin-lipoprotein lipase system, especially the deficiency of blood heparin. In this study, fatty acid metabolism of this disease were studied.

1) In the fatty acid compositions of plasma, SFO-20 lipoprotein and high density lipoprotein, percentages of palmitic and oleic acid were significantly elevated, although the percentage of linoleic acid was reduced.

2) In the experiment by the administration of high fat diet, reductions of turnover of various fatty acids from chylomicron and lower density lipoprotein to higher density lipoprotein and albumin were observed in the nephrotic state.

3) By the complete 72 hours fasting study, fatty acid compositions of normal subjects were changed to almost similar to those of the diseased subjects.

4) From above mentioned evidences, possibility that both of hyperlipoproteinemia and abnormalities of fatty acid compositions in the nephrotic state may be explained by a same causative factor, namely the deficiency of heparin-lipoprotein lipase system, was discussed.

はじめに

腎疾患、とくにネフローゼ症候群にみられる血中脂質代謝異常は古くより認められており、本疾患の重要な一症候とされてきた。その成因に関しては lipoprotein lipase の異常または lipid mobilizer の異常などが考えられているが未だ明らかではない。われわれにはネフローゼ症候群の高脂血症は、従来の高コレステロール血症ではなく hyper-low density lipoproteinemia であり、しかもこの際 lipoprotein の脂質組成には異常のないことを

認め、血中 heparin 量の低下が lipoprotein lipase 系不全を通じてかかる変化を起しうることを報告した。このような脂質代謝異常については lipoprotein lipase の組成成分がいかなる状態を呈しているか観察することは意義深いものであると同時に本疾患における脂質代謝異常の成因を明らかにし、正常な状態であることが示される。 lipoprotein lipase の異常は、従来の高コレステロール血症とは異なるものである。また既報の

# 油脂の酸化および加熱による変性に関する研究

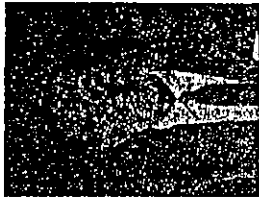
松尾 登

成蹊大学工学部工業化学教室(東京都武蔵野市吉祥寺北町3-3-1)

## Denaturation of Oils and Fats by Heat-treatment and Autoxidation

Noboru MATSUO

Dept. of Industrial Chemistry, College of Technology, Seikai University  
(3-3-1, Kichijōji-kitamachi, Musashino-shi, Tokyo)



油脂の自動酸化および加熱による性状の変化については古くから注目されてきたが、特にここ25年近く前からその際の栄養価の低下および毒性についての研究が始められ、また精造変化に関する研究もすすみ、その後各方面において広く活発な研究が行われるに至った。

この問題は食用油脂の製造、油脂含有食品の保存、貯蔵、調理、食生活との関係において重要であるばかりでなく、脂肪酸エステル(広くは脂質)の酸化および加熱による生成物が種々の疾病と深い関係を有することが徐々に明らかになつてきたこと、非常に関心を払われるに至っている。

著者の研究室で行つた研究結果を中心としてこれらの問題を述べ、併せてセボレア(皮膚潰瘍)についても触れたいと思う。

### 1 油脂の酸化による変性

#### 1-1 油脂の自動酸化

油脂の自動酸化の進行はその構成脂肪酸の種類、不飽和度、室温の場合、加熱を伴う場合、加熱温度、加熱時間などによって著しく異なるものがある。

高度不飽和脂肪酸エステルの場合を例としてその自動酸化についてみると図-1のようである。これは2~18°Cの場合であつて、誘導期が2週間くらいあり、次に過酸化価値が上昇して42日で4400 mg/100 g(5500 meq/kg)の最高値となり、以後分解期、重合期によって徐々に低下する。30°Cで行つた場合は誘導期は短く、20日で最高値2750 meq/kg程度となり、100°Cの場合はわずか300 meq/kg程度(約10hr後)にしか上昇しない。また油脂を高温に加熱した場合は過酸化価値は生成するけれども高温のためその分解も早く、たとえば魚油の例では180°Cでは1.5hr後に約

20 meq/kg となり、2.5hr 後においては0 となった。220°C に加熱すると生成する過酸化物はただちに分解するため過酸化価値の上昇をみなかった。

またアズレンなどを作るため加熱を繰り返したごま油やその他の植物油について、その過酸化価値を調べたが20 meq/kg 以下程度の値であつた。

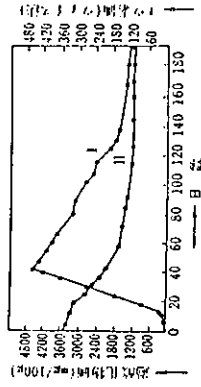


図-1 室温設置(2~18°C)した高度不飽和脂肪酸エステルの過酸化価値(I)と30°C設置(II)の酸化作用

#### 1-2 自動酸化物のタンパク質、アミノ酸、糖素に対する作用

卵アルブミン2%水溶液40mlに対して、高度不飽和脂肪酸をエステルとしたもの、またはその自動酸化物各5mlを添加、よく振とうした後37°Cに放置した。酸化しないエステルを加えた方はほとんど外見に變化を示さないが、酸化ニステルを加えた方はしだいに黄褐色に変じ、20hrほど経過すると橙かっ色の互麻状沈殿を生じはじめ、時の経過とともに沈殿の量を増し、長時間を経た沈殿は淡かっ色を呈していった。

適当な時間を区切ってこの沈殿を吸引ろ過、液体部分を分けこれを沈殿I、ろ液Iとし、さらにろ液Iに10%三氯化砒酸水溶液の同量を添加したものを沈殿II、ろ液IIとする(図-2)。沈殿IIの状態は図-3(51hr経過)、



図-4 (75 hr 経過) のようであった。  
 液Iに10%三酸化砒酸水溶液を添加した場合、酸化しないニステル添加の場合は沈殿を生ずるけれども、酸化ニステルを添加、長時間放置したものはほとんど沈殿を生じない。すなわち長時間放置すればタンパク質は酸

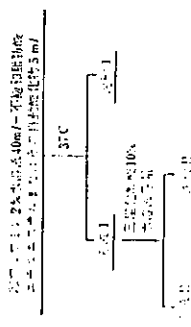


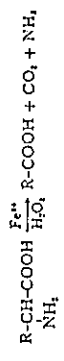
図-4 不飽和脂肪酸ニステルニステルまたはその自動酸化物と卵アルブミンの反応

化ニステルによって完全に沈殿させられる。沈殿I中の窒素量のはじめ加えたタンパク質中の窒素量に対する割合の時間を示す変化を 図-5 に示す。すなわち酸化物添加の場合においては、約100 hr を経るとほとんど沈殿する。酸化しないニステル添加の場合はいずれも 6~7%であった。

次に上記の変化がタンパク質の種類によってどのよう異なるかを血清アルブミン、血清グロブリンおよびフィブリノゲンを使用して検討した。経過時間に対する沈殿物のN%をみると、フィブリノゲンの割合最も多く、次に血清グロブリン、血清アルブミンの順であった。

卵アルブミンとの反応で得られた沈殿をアセトンおよびエーテルを用いて長時間抽出を行なったところ、これら溶剤によっても抽出されないもの、すなわち酸化ニステルとタンパク質とが化学的に結合していると考えられる複合体 (complex) が存在することが明らかとなった。この complex は用いた卵アルブミン量に対して大体 30~70% にあたり、またこの complex を水酸化カリウム溶液を加えて加水分解して得られたニステル量は、complex に対して1%以下であった。実験結果からみると酸化ニステルが重量的に上昇している時期の酸化ニステルを用いた場合には、complex の生成量は酸化ニステルと並行したが、自動酸化ニステルを過ぎた時期のものも含めて考察すれば、カルボニル基に並行して complex が増加すると思われる。Narayan, Kummerow らはカルボニル基、エポキシ基が complex 生成に大きく関係しているであろうとし、-OH、-OOH はそれほど関係を持たないことを報告している。

さらに自動酸化物のアミノ酸に対する反応性を見るためグリシン水溶液にニステル酸化物を添加し、37°C に放置したところ、アミノ酸および炭酸ガスの発生がみられた。グリシリンの場合も同様であった。アミノ酸は炭酸の存在で過酸化水素によって酸化され、次のように炭酸が1個少ない脂肪酸となることが知られている。



すなわちニステル酸化物が上記と同様な機構によってアミノ酸に作用した結果と考えられる。システンを過酸化水素をもって処理すると、5原子の酸素を吸収してシステイン酸を生成することが知られている。システイン 0.002 mol を 25 ml の蒸留水に混合し 37°C に一夜放置した後、これにニステル酸化物 5 ml を添加して 37°C に長時間放置した。次にこれをろ過し、このろ液を用いてペーパークロマトグラフィーによりシステイン酸を確

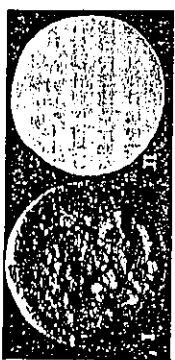


図-3 自動酸化不飽和脂肪酸ニステルニステルによるタンパク質の生成 (51 hr 経過)

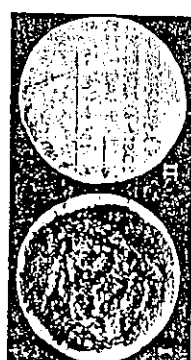


図-4 自動酸化不飽和脂肪酸ニステルニステルによるタンパク質の生成 (75 hr 経過)

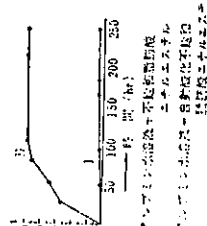
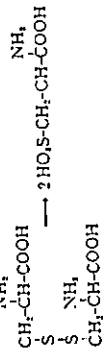


図-5 沈殿Iの窒素含有量

システンは下記のように活性度の高いニステル酸化物によって酸化をうけてシステイン酸に変化したものと考えられる。



タンパク質が酸化ニステルによって著しい変性を受け、ことからニステル酸化物は酵素作用を抑制または停止させることが推察されるが、succinohydrogenase, pyruvate amin, potato amyrase に対するニステル酸化物の作用を検討したところ予想したとおりに、Bernheim<sup>11)</sup>, Ottolenghi<sup>12)</sup> の実験もこのことを明らかにしている。

1-3 自動酸化油脂の栄養価および毒性  
 油脂は自動酸化によって栄養価が低下し、さらに毒性を示す物質、過酸化物が連続的に上昇している時期の油脂自動酸化物を使用して白ネズミによる動物実験を行うと油脂の栄養価低下の結果その成長は阻害され、過酸化物の高い場合には白ネズミがへい死する。その毒性は過酸化物の上昇期においては過酸化物質と並行することから明らかとなった。自動酸化物から過酸化物を除去したものは毒性を示さない<sup>10)</sup>。

著者の研究室で過酸化物質の比較的高いニステル自動酸化物を基礎飼料に対して5%の割合に添加したものに、または添加しないものを交互に、毎日1回白ネズミに投与したところ、一匹の白ネズミに 図-6 に見るような特異な外見の症状を示したものがあつた。すなわち白ネズミの被毛は脱毛し、口および後あしははげあがり、腹部にびびり割れを生じて出血が見られた。

健康な体重約 1.5 kg のウサギに高度不飽和脂肪酸ニステルニステル自動酸化物(過酸化物質: 約 1800 meq/kg) 0.8 ml を毎日1回経口投与したところ 表-1 に示すように何れもへい死した。肝臓、脾臓の状況は、胃においてはその状態が著しくおそろいであることを認め、特にA<sub>1</sub> の場合には胃壁が2か所非常に薄くなっているのを認めた (図-7)。

胃はその弾力性を失い、引っ張ると切れやすい状態であった。肝臓は部分的に本来の色ではなく、黄かっ色に変わっているのを認めた<sup>13)</sup>。自動酸化させた大豆油を白ネズミに与えた秋谷の実験<sup>14)</sup>によれば、過酸化物質 110 meq/kg のものでは对照より体重がいくぶん劣る程度であり、180 meq/kg の試料ではかなりの体重低下を示したという。また Andrews<sup>15)</sup> は銅および炭化水素を触媒として 60°C で通気して過酸化物質を 100, 400, 800, 1200 meq/kg とした酸化大豆油を飼料とし、これを 15% または 20% の割合で飼料に添加して白ネズミの成長試験を行った。その結果では



図-5 自動酸化植物油ニステルを飼料において投与した場合の白ネズミの症状



図-7 自動酸化植物油ニステル投与によりへい死したウサギの胃の内部 (a, b 部において胃壁が薄くなっているのが見られる)

表-1 ウサギの飼料結果

性	初めの体重 (g)	最終体重 (g)	体重減少 (%)	へい死
A <sub>1</sub> ♀	1500	1290	-210	5日目
A <sub>1</sub> ♂	1570	1350	-220	12日目
A <sub>2</sub> ♀	1500	1520	+20	15日目
A <sub>2</sub> ♂	1720	1575	-145	5日目

過酸化物質が 100 meq/kg の試料油では、白ネズミはほとんど対照の大豆油と同じ程度に成長するけれども、400 meq/kg となるとその成長はかなり劣り、800 meq/kg で成長は停止し、1200 meq/kg で死亡することが明らかとなった。

Cauplion は過酸化物質が 100 meq/kg 以下の場合には悪い症状は現れなかったと報告しているが、著者の研究の結果も同様であった。以上からして 100 meq/kg 以下を限度とするのがよいであろうが、安全試験を考慮する必要がある。安全試験を大きくみて過酸化物質が 30 meq/kg 以上の油脂は食用に用いなくとするのがよいのではなか

表-2 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	30以上	最高	
即席ラーメン	31	9	25	30	31	0		
ポテトチップス	14	9	11	13	14	0		
揚げせんべい	14	7	9	10	12	2	33.6	
バターピーナッツ	10	0	0	2	3	7	55.7	
クラッカー	15	12	14	15	15	0		
ドーナツ	10	8	9	9	10	0		
かりん糖	6	3	6	6	6	0		
計	100	48	74	65	91	9		

ろう。近年、自動酸化の過酸化値下降期(分程、重合の起こる時期)の油脂中に含まれる分解物の中に極く微量ではあるが揮性の強い物質の存在が認められた。下降期の自動酸化油脂の揮性は過酸化値、分解物の影響の緩和として現れるものと見るのが妥当である。

油脂を使用する場合は加熱を伴うのが普通であるから、酸化の影響と加熱の影響が同時に起こり複雑である。酸化した油脂の揮性は上昇期においては過酸化物質が主因であって、加熱重合油脂の揮性は別個のものである。

前述したように油脂を空气中で高温に加熱した場合は生成した過酸化物質の分解は早く、過酸化物質をほとんど含まない。低温加熱の場合は、その温度、時間、油脂の性質などによって含有する過酸化物質の種類があるが、一般にはさほど多くないのが普通である。加熱酸化の過程は、過酸化値だけから判断するのは当を得ていないわけである。このような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いるが、現状ではどの一つをとってみても、それのみで充分という方法はないと思われ、今後さらに各方面から資料、研究の必要がある。

#### 1-4 油脂含有食品酸化の実態

油脂を用いた食品中の油脂の栄養は食品の商品価値を損なうだけでなく、保健、栄養の面でも重要な問題である。したがって揚げ油およびピーナッツ用油脂などにこれらを使用して製造した食品の生産に際して、内外において多くの研究が行われている。

本邦においては、湯水らの揚げ油用大豆油の劣化についての研究、太田<sup>26)</sup>、梶本<sup>27)</sup>、杉谷<sup>28)</sup>らによる加熱酸化による調理用油脂の劣化についての研究、揚げ油の劣化に關する研究などが広く行われている。

著者の研究室では市販の油漬含有食品(即席ラーメン3種、ポテトチップス14種、揚げせんべい14種、バターピーナッツ10種、クラッカー15種、ドーナツ10種、かりん糖6種、計100種)から油脂を抽出してその酸化変性の状態を調べた<sup>29)</sup>。過酸化値についてみると

表-3 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
即席ラーメン	30	24	28	2
ポテトチップス	14	12	14	0
揚げせんべい	14	1	8	6
バターピーナッツ	10	8	9	1
クラッカー	14	12	14	0
ドーナツ	19	0	4	5
かりん糖	6	2	5	1
計	97*	59	82	15

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

30.1 meq/kg以上のものはバターピーナッツに多く(10種中7種)、その最高は95.7 meq/kgであり、酸価については揚げせんべいとドーナツに比較的高いものがあった。

その他、名古屋薬業科学研究所報告にみられる下岡らの実験<sup>30)</sup>、山下<sup>31)</sup>、渡辺<sup>32)</sup>、折本<sup>33)</sup>、塚<sup>34)</sup>、山下<sup>35)</sup>らによる研究も報告されている。

加工食品中の過酸化値が共存する他の成分の影響を大きく受けることは、前述した自動酸化値とタンパク質、アミノ酸などの相互作用を考慮しても容易にわかることである。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小さくなり、油脂は酸化を受けやすくなる。水分の含有量が多くなると過酸化値の上昇は比較的少なく、むしろ酸価が増大する。この過程では生成してきた過酸化物質の分解も水によってひきおこされていると考えられる。

油脂食品の流通消費の過程での酸化の問題には充分な注意が必要である。油脂を用いた食品の現状をみると、工場から出た製品の保存法、すなわち小売店の陳列場所、家庭での保存場所が重要と考えられているように思われる。製造者は酸化、変質の防止に万全の処置をとらなくてはならない。包装はもちろんだ、日光、温度につい

ての注意、製造年月日の明記が必要であり、消費者の知識が充分でないために、油脂の自動酸化による事故も起きてくるようであるから、小売店および消費者への注意書も必要であらうし、毒性が認められた際は何らかの行政的処置をとる必要がある。

## 2 油脂の加熱による変性

### 2-1 加熱油脂の栄養価

油脂を加熱した場合においては、油脂の種類、加熱条件によって異なるけれども、一般的にその分程<sup>36)</sup>、重合に伴い、ヨウ素価の減少、分子重および粘度の増加、折新率の変化、着色などが起こり、また栄養価は低下する。著者はまず加熱による影響をどくに受けやすい魚油を用いて実験を行った<sup>37)</sup>。魚油(ヨウ素価194.6、分子重680(ラスト油))に炭酸ガスを吹き通じつつ、65℃(120hr加熱(無酸素))を行った。ヨウ素価の低下は2~3%程度であり、分子重は10%以上、これを基準期(20%)の割合で重合し、白ネズミによる動物実験を行った結果、その成長は原料油を与えた白ネズミに比べていくぶん劣り、一部のものに成長曲線が10日目から20日目ころまで平坦となったものが認められた。次にこの魚油を250℃に10hr(無酸素)炭酸ガス気流下において加熱重合させた。加熱重合油の色調は原料油と異なり、赤褐色になった。加熱重合油を含有するヨウ素価121.9、分子重1220であった。60~80gの白ネズミを用い、この加熱重合油を20%の濃度で混合飼料として、こ

ろいられ、15日ぐらいたまに死した。しかし、混合飼料とした場合は原料油に比べて白ネズミの成長はいくぶん劣る程度であった。また上記魚油を空气中で215~235℃に加熱して得られた加熱重合油について上記と同じ実験を行って見ると、同様な結果が得られた。

次になたね油を空气中で250℃に50hr加熱(無酸素)して得られた加熱重合油の色調は黒っぽい色、過酸化値を含まない)を基準飼料に20%の濃度で混合飼料としたところ、かなりの栄養価の低下がみられた<sup>38)</sup>。

加熱油脂の栄養価については多くの論文が発表されており、その加熱の方法も空気中、通気、真空<sup>39)</sup>、断下<sup>40)</sup>、Johnson<sup>41)</sup>、Kummerow<sup>42)</sup>、Petkins<sup>43)</sup>、Alfinton<sup>44)</sup>、Slater<sup>45)</sup>らの研究があり、国内においては太田<sup>26)</sup>、秋谷<sup>27)</sup>、梶本<sup>28)</sup>、湯水<sup>29)</sup>らによる食用油脂の劣化

または実態に關するものも発表されている。これらの多くの報告をみると、油脂の構成脂肪酸の種類、不飽和度、加熱温度および時間、空气中または通気しての加熱、無酸素状態で加熱、基準飼料の組成、添加量などのすべてを点から比較検討しなくてはならないことはい

うまでもない。①油脂を加熱する場合、200℃直後と250℃以上では変化による差があること、②リノール酸とリノレン酸とでは加熱による酸化変化に大きな違いがあること、③酸化を伴う加熱の場合と酸素遮断下の加熱の場合とでは酸化による差があること、④酸化を伴う加熱の場合と酸素遮断下の加熱の場合とでは酸化による差があること、などが考えられるのでこれらの点も常に考慮しつつつづいてみるべきであらう。

### 2-2 環状化合物の生成と毒性

魚油と炭酸ガス気流下において250℃に10hr加熱したものを、水酸化ナトリウムを触媒としてエタノールに抽出し、水酸化ナトリウムを触媒としてエタノールに抽出し、付加物をつくる環状構造エステルと、付加物をつくらない環状構造エステルとに分れた。前者は淡黄色、後者は無色(色い)に抽出された。この環状構造エステルを90%の濃度で基準飼料に混合して、60~80gの白ネズミに投与したところ、著しい体重の減少を認め、3~4日の間に死した。10%投与したところ、5~7日の間に死した。一方、環状構造エステルを与えたほうは良好な成長を示した。動物実験した際には、加熱重合油の過酸化値はごく微量であった<sup>37)</sup>。

環状化合物の毒性とその構造を究明する目的をもつて、あまに油を原料としてリノレン酸ニテルをつくり、これを用いて炭酸ガス気流下において250℃に40hr加熱重合(無酸素)して重合リノレン酸ニテルとした。次に原料油に重合させた重合リノレン酸ニテルと環状構造エステルとに分れると、その収率は前者は21.2%、後者は63.3%であった。この環状構造エステルを真空蒸留して、1.8~2.0mmHgにおいて、175℃まで留出し、60gの白ネズミに投与したところ、著しい体重の減少を認め、3~4日の間に死した。一方、環状構造エステルを与えたほうは良好な成長を示した。動物実験した際には、加熱重合油の過酸化値はごく微量であった<sup>37)</sup>。

60g前後の白ネズミを用い、基礎飼料にこれらエステル20%を加えて動物実験を行った。図-8のように留

表-4 全試料ニテルの性状

試料名	留出率(%)	留出率(%)	留出率(%)	留出率(%)
リノレン酸ニテル	1.4658	22.5	183.1	1.0
重合リノレン酸ニテル	1.4638	157.5	170.1	6.5
環状構造ニテル	1.4692	20.5	177.4	0.4
環状構造ニテル	1.4891	142.5	168.6	7.3
留出ニテル	1.4751	159.4	171.0	7.4
残留ニテル	1.4948	135.8	168.6	8.2

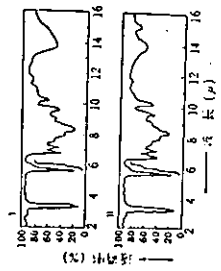


図-8 リノレン酸ニルニステル(I)と留出エステル(II)の赤外スペクトル

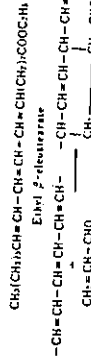


図-10 (A)  $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステル-アーク  
(B) シクロヘキサジエンカルボキシ- $\eta$ -ブタノールニステル

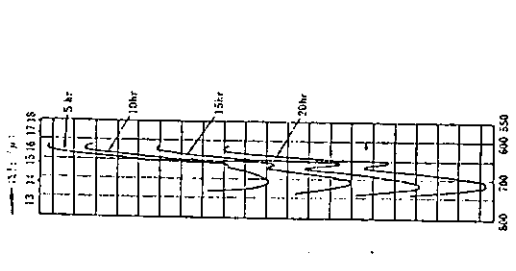


図-11 留出エステル(環状単量体)赤外スペクトル(15.2 $\mu$ (600 $\text{cm}^{-1}$ )の吸収)の加熱による変化(NaClプリズム法透過)

物(図-10(A))<sup>11)</sup>、他の一つはシクロヘキサジエンカルボン酸の $\eta$ -ブタノールニステル(B)<sup>11)</sup>であって、いずれも留出エステルと同様な毒性を示した。さらに著者は魚油、あまに油、リノレン酸ニルニステル、

リノレン酸ニルニステル、きり油、 $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステル等を種々の条件下に加熱し、環状単量体を分離し、その特性について詳細なる検討を行っている。その一部を記述する。魚油(いか油)を250°Cにおいて無触媒で5、10、15、20 hr 二酸化炭素気流中で加熱し得られた加熱魚油より分離した環状単量体の15.2 $\mu$ (660 $\text{cm}^{-1}$ )の吸収強度を比較した結果は図-11に示す通りであって、15 hr 加熱の場合の吸収が最大であった<sup>11)</sup>。

また、あまに油、 $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステルを用いて得られた環状単量体の赤外スペクトルの特性を比較し、とめて記せば次の表-5のようである。

表-5 環状単量体の赤外スペクトル特性

波数	吸収	他の環状構造
(I)	682	750-1490-1603-3030
(II)	685	750-1490-1603-3060
(III)	665	966 (trans)
(IV)	660 (weak)	743-1497-1603-3065
(V)	660	747-1495-1603-3030

- (I) あまに油をアルカリおよび溶媒存在下に加熱(255°C, 15 min, in  $\text{N}_2$ )して得られた環状単量体<sup>11)</sup>
- (II)  $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステルを無触媒、無溶媒にて加熱(250°C, 10 hr, in  $\text{CO}_2$ )して得られた環状単量体<sup>11)</sup>
- (III) あまに油を無触媒、無溶媒にて加熱(275°C, 12 hr, in  $\text{CO}_2$ )して得られた環状単量体<sup>11)</sup>
- (IV) 環状単量体(III)を芳香族化したもの<sup>11)</sup>
- (V) 環状単量体(III)を脱水環化したもの<sup>11)</sup>

以上の結果からしても、リノレン酸ニルニステルからはシクロヘキサジエン系を有し、二つの側鎖の一方に二重結合1個を有する構造、 $\beta$ -エロオステアリン酸、アルカリ異性化したリノレン酸からシクロヘキサジエン系を有する化合物の生成が確認され、また芳香族系を有する化合物は上記のものより不均斉化反応によって生ずることが証明された<sup>11),12),13)</sup>。

次に環状単量体のガスクロマトグラフについてその一部を記す。あまに油を275°C, 12 hr, 無触媒、無溶媒、炭酸ガス気流中で加熱し、これをメチルエステルとし真空蒸留、戻り蒸留を行って得られた環状単量体はメチルエステルに対して11%であった。そのGLCは図-12のようであって、IRとともに考察すると、シクロヘキサジエン系および芳香族化合物の生成はないものと考えられ、シクロヘキサジエン系の側鎖に二重結合1個(trans構造)を有するものの存在が認められた。

この環状単量体を芳香族化した場合のGLCは図-13に示すようであって、芳香族の置換体(B)およびシクロヘキサジエン系環状化合物(A)が存在する。これらはい

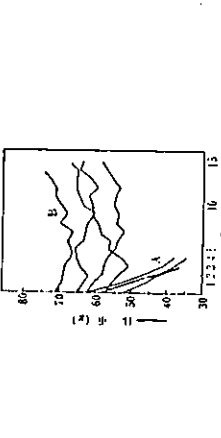


図-9 白ネズミの成長曲線

出エステル(A)投与の場合は実に激しい毒性がみられ3~4日すべての白ネズミがへい死したが、残留エステル(B)投与のほうはいずれも軟便の排せつが見られる程度で毒性は弱かった<sup>11)</sup>。この結果より Crampton の実験結果と同様に留出エステル(環状単量体)が毒性の主体であることが明らかとなった。Arman ら<sup>11)</sup>は、リノレン酸メチルに溶媒として等量のラウリン酸メチルを混合し、200°C, 200 hr, 空気存在下で処理したものと分離した環状単量体を用いて Crampton, 著者の結果を再確認している。

2.3 環状化合物の検出  
前記環状リノレン酸ニルニステルから分離した留出エステルは環状単量体であると考えられ、リノレン酸ニルニステルおよび留出エステルの赤外スペクトルは図-9 I, II のようであった<sup>11)</sup>。

この二つを比較すると、リノレン酸ニルニステルには見られなかった15.2 $\mu$ (660 $\text{cm}^{-1}$ )の新たな吸収が現れていることからシクロヘキサジエン系を有することが明らかであり、ミリ蒸留から二重結合は2個であって、10.35 $\mu$ (966 $\text{cm}^{-1}$ )にtransの吸収がみられるので側鎖にtrans二重結合1個を有する構造であると認められる。6.1 $\mu$ (1650 $\text{cm}^{-1}$ )の新たな吸収も環構造に起因しているものと考えられる。またこの留出エステルの芳香族化を試み、生成物の赤外および紫外スペクトルを検討したところ、環構造を有することがさらに明らかとなり、 $\alpha$ -位の位置に側鎖を有することも確認された。すなわち、この留出エステルは激しい毒性を示すが、シクロヘキサジエン系を有し環外の側鎖部分に1個の二重結合(trans結合)を持った化合物がその主体をなしていることが究明された。

さらに著者は、上記留出エステルとほぼ同じ分子構造をもち分子内にシクロヘキサジエン系を有する構造の明らかな化合物を合成し、その毒性についても究明した。その一つは $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステルとアクトロインをディールマン-アルダー反応によって付加させた化

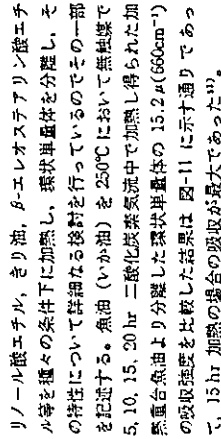


図-12 加熱あまに油から得られた環状単量体のガスクロマトグラム

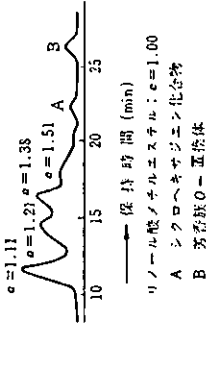


図-13 芳香族化した環状単量体のガスクロマトグラム

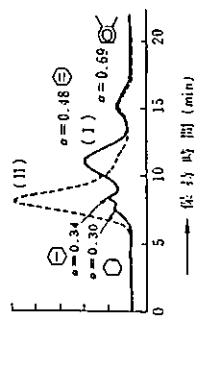


図-14 加熱 $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステル(250°C, 10 hr)から得られた環状単量体(I)および芳香族化した環状単量体(II)のガスクロマトグラム

ずれもシクロヘキサジエン系環状化合物より生成してきたものである。きり油を異性化した後、常法により得られた $\beta$ -エロオステアリン酸ニルニステルを無触媒、二酸化炭素気流中で250°C, 10 hr 加熱を行った後分離した環状単量体のGLCおよびその水素添加物のGLCは図-14のようである<sup>11)</sup>。

図-14において $\alpha=0.69$ は芳香族 $\alpha$ -置換化合物、0.48はシクロヘキサジエン系を有する化合物、0.34, 0.30はそれぞれシクロヘキサジエン系、シクロヘキサジエン系を有する化合物であり、それより計算した平均二重結合数は4回行った実験において、それぞれほぼ同じ値を得た。このことは不均斉化反応を真つづけるものと思われる。加熱条件を310°C, 10 hr にかえたときも得られ

た環状単量体の GLC より算出した平均二重結合数もやはり 2 に近い値を示していた。4-エチレンオステアリン酸メチルを有する化合物、ベンゼン環を有する化合物について少し詳細に示せば図-15 のようである。

あまに油をアルカリ存在下で加熱した場合、および 4-エチレンオステアリン酸メチルを加熱した場合、シクロヘキサジエン環を有する化合物と芳香族 6-置換体の生成を認め、この芳香族 6-置換体の生成機構はシクロヘキサジエン化合物の不斉酸化反応によることに、原料を C<sub>10</sub> のトリニオンとすれば、いくつかの場台が考えられる。

図-15 で、 $n=1, m=9$  の 10-(0-ニアルフェニル)デカン酸メチルおよびその水素添加物である 10-(2'-ニアルフェニル)デカン酸メチル<sup>11)</sup>、 $n=3, m=7$  の 8-(2'-ニアルフェニル)オクタ酸メチルおよびその水素添加物<sup>11)</sup>、 $n=0, m=10$  の 11-(2'-メチルフェニル)ウンデカン酸メチルおよびその水素添加物<sup>11)</sup>等を Friedrich の方法<sup>11)</sup>を参考に合成を行い、NMR, IR, 質量分析などを用いてその性状および構造を確認した。また GLC を用いて、そのピーク位置を決定し、今までの研究における生成物との比較検討を行った。その合成経路の一つを 8-(2'-メチルフェニル)オクタ酸メチル<sup>11)</sup> およびその水素添加物について示すと図-17 の通りである。

筆者の研究室においては環状単量体の構造をさらに詳細に検討するため原料付加、低温結晶法、微量水素添加法、芳香族化、オゾンによる酸化、紫外スペクトル、紫外スペクトル、ガスクロマトグラフィー、赤外線分析、質量分析などを用いて研究を続けているが、加熱による五員環を持つ化合物の生成<sup>11)</sup>、ヒドロナフタレン環を有する化合物の生成<sup>11)</sup>についても研究が進んでいる。環状化に関しては、MacDonald<sup>12)</sup>、Faschke<sup>13)</sup>、Wheeler<sup>14)</sup>、Ishii<sup>15)</sup>、Friedrich<sup>16)</sup>、Eisenbauer<sup>17)</sup>、Hutchison<sup>18)</sup>、Armat<sup>19)</sup>、Michael<sup>20)</sup>、斎藤<sup>21)</sup>らによって多くの研究が報告されている。

### 2-4 構造的な問題

油脂を比較的低い温度で加熱した場合には、過酸化物質を含有する加熱油が得られるが、その量はさして多くはなく、また高温加熱の現象は二の過酸化物質は極微量であるのが普通である。加熱油は動物実験に使用する場合には注意してその酸化を防いで蓄え、実験終了時に過酸化物質を再度測定して酸化のなかつたことを確認すべきである。したがって過酸化物質による影響はほとんどないと認められる。

250°C に 10 時間炭酸ガス気流中または真空中で加熱した魚油を卵アルブミンその他のタンパク質の水溶液に加入

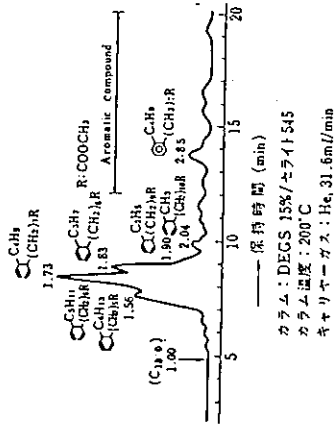
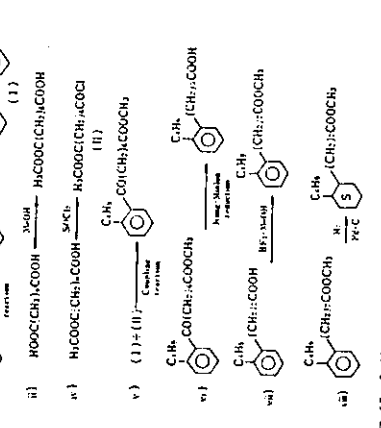
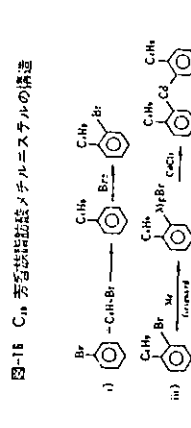


図-15 加熱 4-エチレンオステアリン酸メチルニアルフェニルから得られた環状単量体のガスクロマトグラム 250°C, 10hr  
 カラム: DEGS 15% / カライ 545  
 カラム温度: 200°C  
 キャリヤガス: He, 31.5ml/min



え、これを 37°C に保つてときどき振とう、長時間放置しても酸化油脂の場合のようにタンパク質が付加物をつけて沈殿することはみられなかった。また上記加熱油を 5% または 10% 炭酸ガス気流中または真空中で 250°C に 1 時間加熱した結果によれば、軽いセボレア症状を呈したことが認められた。

これは重合による 1 分子中の炭素数の増加が一つの原因となっているのであらうと考察する。上記長期飼育実験を行った白ネズミの解剖による肉眼的所見は一肝臓には脂肪病変が多く脂肪肝の状態を現している場合が多かった。

魚油から得た高度不飽和脂肪酸をエチレンオステアリン酸と無水炭酸ガス気流中 250°C, 10 hr 加熱した後、環状単量体を分離した。この環状単量体を 60~70°C の白ネズミに基礎飼料に対して 10% 投与すると 4~7 日で死すため、臓器の変化を顕微鏡的にくいので、最初 9%, 10 日目から 2.5%, 20 日目から 5%, 31 日目から 38 日目まで 7.5% を投与、解剖した後臓器を顕微鏡で観察した結果、じん臓、小腸、腎臓については充血が認められる程度でその他に著しい変化は認められなかった。大腸、肝臓については肉眼的にも赤色に変色し、そのうち肝臓肥大の傾向が強く、さらに脂肪病変が明瞭に認められた。また図-18 に示したように肝臓には、ラダ油を環状単量体と同量投与したコントロールグループよりも、

大腸においては全体的に腸浮腫が強く、さらに神経細胞の脱色、変性が著しく組織の充血、疎しょう(軽)化、白質の軟化も認められた。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壊死、う化、細胞の壊死がみられ神経細胞の脱落が起ることとなり、環状単量体は神経毒としての作用もあると思われる。

Ram および Razagopalan<sup>22)</sup> は真空中で 270°C に加熱したアクリル酸、ごま油、やし油を 15% 飼料に混合し、白ネズミに与えた場合、肝臓重量の増加を見だし、また Kummerow<sup>5)</sup> は 180°C に 48 hr 真空中で加熱した油を 20% 混合投与した場合に肝臓重量が増加し、体重が非常に大きくなることを認め、この原因は明らかでないが、正常代謝に酸化を受けた結果に違いないと述べている。土倉<sup>23)</sup>、秋本<sup>24)</sup>も加熱油を与えた白ネズミでは肝臓重量が増加し、肝臓肥大の傾向があることを確かめている。

また Refofo<sup>25)</sup>, Deck<sup>26)</sup>, Ivy<sup>27)</sup> によって加熱油が腎臓の原因となっているのではないかとする報告がなされ、Kummerow<sup>5)</sup> によれば加熱油から分離したリパーゼによって消化されない成分、または尿素と付加物を作らない成分が、2-アセチルアミノフルオレンの発がん性を促進したとの報告もなされている。すでに前述したように、200°C 以下の加熱と 250°C 以上の加熱では、油質に与える変化が大きく異なる。食用油の場合においては、とくに不飽和度が高く、普

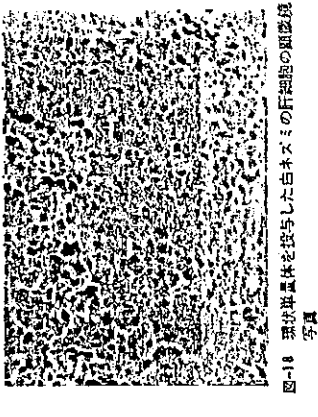


図-17 環状単量体投与した白ネズミの肝臓の顕微鏡写真

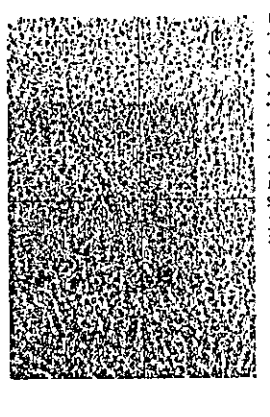


図-18 リノールサラ油を投与した白ネズミ(コントロール)の肝臓の顕微鏡写真

通の使用条件の温度では環状化合物の生成はほとんどみられない。調理のときには 200°C より高い加熱は注意して避けるべきである。

### 3 セボレア(皮膚病)の発生

3-1 セボレアの発生と投与エステル炭素数との関係  
 大豆のまっこの煎油を白ネズミに与えると、皮膚病変いわゆるセボレアを発生し皮膚より油状物質を分泌して、あたかも油に浸して取りだしたような症状を呈する(図-20, 21)。

このことは古くは佐藤<sup>28)</sup>によって見いだされたが、その後、幾川<sup>29)</sup>によってもオレイルオレオートを大盛に与えると、セボレアを発生することが明らかになり、また金田<sup>30)</sup>はオレイルオレオートのみならず、セチルオレオート、オクタデシルオレオートの 15% 投与によりセボレアを発生することを認めた。

著者は白ネズミを使い、基礎飼料に対し 15% のオレイルアルコール、オレイルオレオートをゾンデを用いて与えたところ、オレイルアルコールの場合はセボレアは発現しないが、その毒性はオレイルオレオートより強く認められることを認めた。また魚油、あまに油等を加熱重合したものを 20% 程度白ネズミに与えた場合にも認められ、セボレアに似た状態が見られたことより、セボレアの発生は投与エステル炭素数と密接な関