図-20　セボレアを発生した白ネズミの一例

図-21　オレイルオレアートを投与してセボレアを発生したウサギの一例

係があると考え，オレイン酸と種々の飽和直鎖一価アルコールのエステルを合成し，これを基礎飼料に 15% の割合で混合，白ネズミに投与して，エステル炭素数とセボレア発生の関係について実験を行った。その結果[7]は炭素数 10 個までの飽和直鎖アルコールのオレイン酸エステルの投与ではセボレアは現れず白ネズミはよく成長するが炭素数 12 個以上の飽和直鎖アルコールのオレイン酸エステルではセボレアの発現がみられた。炭素数 12 個，14 個の場合は，炭素数 16 個以上のものに比較するとその発現は弱い。すなわちオレイン酸の飽和直鎖一価アルコールのエステルについては，エステルの炭素数が 30 程度以上の場合にセボレアが発現し，炭素数が増すにつれてセボレアの発現は強く，平均体重増加は鮮やかに順を追って減少することが明らかとなり，また一例ではあるが枝の長い第二アルコール（7-エチル 2-メチルウンデカノール-4）のオレイン酸エステルを与えた場合には特に激しい症状を呈することが究明された(表-6)。

3・2　セボレアの発生と側鎖を有するエステル投与の場合

側鎖を有するエステルは，直鎖構造のエステルと比較して代謝が非常に異なることが推察されるので，種々の側鎖を有する一価アルコールとオレイン酸とのエステルを合成して，同炭素数の飽和直鎖一価アルコールエステルとの比較を行った。飽和直鎖一価アルコールのオレイン酸エステルでは，総炭素数が 28 までの場合はセボレアは発現しなかったが，本実験の結果[7]によれば炭素数が 21 であってもセボレアを発生し，側鎖を有する場合は直鎖のときに比べて発現が激しいことを確認した(表-7)。

オレイン酸とのエステル化に用いた 8 種類のアルコールについてみると，何れも側鎖を有してはいるが第一アルコール型のもの 4 種，第二アルコール型 2 種，第三アルコール型 2 種であり総炭素数は 21 から 28 までである。比較的構造の似たものにおいては総炭素数の多いものの方が強く発現することが認められ，総炭素数 21～28 程度のものにおいては第三アルコール型のものとのエステルの場合その影響が最も強い。

上記のようなエステルを投与した場合に，白ネズミの体内においてその分解が円滑に行われず，エステルが体組織に蓄積し，これがセボレア発現の直接原因であると考えられる。側鎖を有するエステルの場合は直鎖エステルに比べて代謝が困難であるため，セボレアを発生しやすいと推察する。

表-6　各種直鎖構造エステルの投与によるセボレアの発生

エステル	示性式	セボレア発生の有無	平均体重増加%*
Ethyloleate	$C_{17}H_{33}COO-C_2H_5$	○○○○○	100
Amyloleate	$-C_5H_{11}$	○○○○○	100.3
Octyloleate	$-C_8H_{17}$	○○○○○○○	89.5
Decyloleate	$-C_{10}H_{21}$	○○○○○○○○○	83.9
Dodecyloleate	$-C_{12}H_{25}$	◐◐◐◐○○○○◐◐○○	62.2
Tetradecyloleate	$-C_{14}H_{29}$	◐◐◐◐◐	34.3
Cetyloleate	$-C_{16}H_{33}$	●●●●●	15.0
Octadecyloleate	$-C_{18}H_{37}$	× ●●●●●	25.0
Oleyloleate	$-C_{18}H_{33}$	×× ●●●●●	−30.0
7-Ethyl, 2-methyl undecanol 4-oleate	$-C_{14}H_{29}$	××× ●●●●●●●	−29.1

* ethyloleate を 100 とする。

○印はセボレアの発生しないこと，◐はセボレアを発生したが弱いこと，●は鮮かな強い発現を示し，○◐●の数は使用した白ネズミの数を示す。×印は 22 日間の飼育中にへい死したもので，平均体重増加の中には加えていない。

表-7　各種側鎖構造エステル投与によるセボレアの発生

エステル	示性式	アルコールの炭素数	エステルの総炭素数	セボレア発生の有無
iso-Propyloleate	R-C(-C)-C	3	21	●●●●●●●●●●
tert-Butyloleate	R-C(-C)(-C)-C	4	22	●●●●●●●●●◐
tert-Amyloleate	R-C(-C)(-C)-C-C	5	23	●●●●●●●●●●
iso-Amyloleate	R-C-C-C(-C)-C	5	23	◐◐◐◐◐○●●●●
1,3-Dimethylbutyl oleate	R-C(-C)-C-C(-C)-C	6	24	●●●●●●●●●●
2-Ethylhexyl oleate	R-C-C(-C)-C-C-C-C	8	26	●●●●●●●●●●
2-Methylheptyl oleate	R-C-C(-C)-C-C-C-C-C	8	26	●●●●●●●●●●
3,7-Dimethyl octa-2,6-dienyl oleate	R-C-C=C-C-C-C=C-C	10	28	●●●●●●●●◐●●

● セボレアの発生　　◐ セボレアの弱い発生

表-8　エーテル抽出物の化学的性状

		屈折率 (20℃)	ヨウ素価 (ウィイス法)	けん化価	酸価
オレイルオレアートを与えた場合	皮皮エーテル抽出物	1.4660	81.3	115.2	11.0
	同上メタノール不溶部	1.4661	93.8	105.2	0.3
	肝臓エーテル抽出物	1.4653	86.2	108.4	25.5
	同上メタノール不溶部	1.4559	94.5	107.9	0.5
オレイルオレアート		1.4660	92.5	107.0	0.4
エチルオレアートを与えた場合	皮皮エーテル抽出物	1.4662	68.4	197.0	3.2
	肝臓エーテル抽出物	1.4715	70.0	183.1	7.1
エチルオレアート		1.4519	83.8	181.2	4.2

3・3　セボレアを発生した白ネズミの表皮および肝臓の脂質[7]

合成したオレイルオレアート，さめ肝油から得られたスクアレン，これを水素添加したスクアランを 10% または 15% あて基礎飼料に混合して白ネズミに投与してセボレアを発生させた。オレイルオレアートを与えてセボレアを発生した白ネズミの表皮のエーテル抽出物（皮下脂肪を含む），肝臓のエーテル抽出物について化学的性状測定，TLC, IR, GLC 分析を行ったところ，オレイルオレアート，オレイン酸の存在を確認した。とくに上記両エーテル抽出物のメタノール不溶部には顕著にオレイルオレアートが含まれていることが見いだされた。エーテル抽出物の化学的性状は 表-8 のようである。

この表からも明らかなように，メタノール不溶部の性状は，オレイルオレアートのそれとまったく良く一致している。表皮エーテル抽出物，肝臓エーテル抽出物とも酸価がとくに高いのが注目される。対照としてエチルオレアートを与えた場合のエーテル抽出物はいずれも酸価は高くない。またスクアレンを用いた実験においても，体表面から分離されたエーテル抽出物がスクアレンそのものを含むことを認めた。10% 投与実験によるセボレア発生症状を比較すると，オレイルオレアートよりもスクアレンの方が激しく，スクアレンとスクアランではスクアレンの方が症状が顕著に認められた。

スクアレン，スクアランを投与したときセボレアが発生することについては桜井，増原[7]によって報告されていたことであるが，前述のように側鎖をもつ飽和一価アルコールのオレイン酸エステルを白ネズミに与えた場合，セボレアの発現が激しいことと考え併せてスクアレン，スクアランは炭化水素ではあるが，これらによるセボレアの発現は構造上側鎖を有することと密接な関係があるものと考察される。

秋谷[9]によれば炭素数 10 以上の炭化水素は毒性を示すと報告されているが，スクアレン，スクアラン以外の側鎖を有する炭化水素がセボレアを発生させるか否かについてはさらに究明する必要があると思われる。

オレイルオレアートを与えてセボレアを発生した白ネズミに対してその投与を中止しエチルリノレート投与にかえて飼育したところ，次第にセボレア症状を回復した。またスクアレンを与えてセボレアを発生した白ネズミに対してその投与を中止し，市販の固型飼料（オリエンタル酵母社製 M.F.）に切り換えたところ症状の回復をみた[99]。セボレアは体組織に悪い影響を与えず，代謝が不良であることによるものと推察される。

さらに，著者らは二塩基酸と側鎖を有するアルコールとのエステル[97]，側鎖をもつ脂肪酸のエステルを合成して[98]，白ネズミに投与しセボレアの発生についても研究を続けている。

（昭和51年8月25日受理）

文　献

1) N. Matsuo, *J. Biochem.*, 41, 647 (1954)
2) 戸谷洋一郎，松尾　登，成蹊大学工学報告，6，397 (1968)
3) 松尾　登，生化学，29，773 (1957)
4) 松尾　登，栄養と食糧，16，260 (1963)
5) 鮎　澄江，松尾　登，第37回日本生化学会総会(名古屋)発表 (1964)
6) K.A. Narayan, M. Sugai, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41, 254 (1964)
7) H.D. Dakin, *J. Biol. Chem.*, 1, 171 (1905), 4, 63 (1908), 5, 409 (1909)
8) F. Sanger, *Biochem. J.*, 44, 126 (1949)
9) N. Matsuo, "Lipids and Their Oxidation," AVI Pub. Co. Inc., Westport, Connecticut, U.S.A. (1962) p. 333
10) F. Bernheim, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38, 177 (1952)
11) A. Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56, 157 (1955)
12) N. Matsuo, *J. Biochem.*, 41, 481 (1954)
13) 金田尚志，石井清之助，日水誌，19，171 (1953)
14) 松尾　登，化学の領域，11，970 (1957)
15) 秋谷年見，油化学，14，733 (1965)
16) J.S. Andrews, W.H. Griffith, J.F. Mead, *J. Nutrition*, 70, 202 (1960)
17) 吉岡優子，金田尚志，油化学，21，316 (1972)
18) 戸谷洋一郎，松尾　登，成蹊大学工学報告，5，397 (1968)
19) 尾又茂昭，戸谷洋一郎，松尾　登，第14回油化学研究発表会（名古屋）発表 (1975)
20) 湯木悦二，大西隆三，畑　忠太，油化学，10，464 (1961)
21) 太田静行，向井　明，山本　巌，油化学，12，409 (1963)
22) 梶本五郎，栄養と食糧，15，221 (1962)；16，506，105 (1964)
23) 秋谷年見，油化学，14，347 (1965)
24) 松尾　登，生化学，29，769 (1958)
25) 戸谷洋一郎，戸谷永生，松尾　登，栄養と食糧，28，91 (1975)
26) 下岡　勉，山本良子，外山修之，名古屋産業科学研究所研究報告，38 (10)，(1957)
27) 日下兵蔵，深沢　輝，松尾　登，栄養と食糧，22，582 (1969)
28) 金田尚志，渡辺寛子，栄養と食糧，16，211 (1963)
29) 前本宏司，金田尚志，栄養と食糧，20，177 (1967)
30) 橋本美佐子，森豊　夫，栄養と食糧，20，363 (1967)
31) 山下太郎，油化学，14，754 (1965)
32) 戸谷洋一郎，松尾　登，油化学，19，307 (1970)
33) 松尾　登，生化学，29，885 (1957)
34) 松尾　登，栄養と食糧，10，255 (1958)
35) 松尾　登，栄養と食糧，12，118 (1959)
36) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, R.E. Johnson, *J. Nutrition*, 55, 577 (1955), 60, 237 (1956)
37) H. Kaunitz, C.A. Slanetz, R.E. Johnson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 33, 630 (1956)
38) E.W. Crampton, R.H. Common, F.A. Farmer, *J. Nutrition*, 43, 431, 533 (1951)；44, 177 (1951)；49, 333 (1953)；62, 341 (1957)
39) O.C. Johnson, T. Sakuragi, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 33, 433 (1956)
40) O.C. Johnson, E. Perkins, M. Sugai, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 34, 594 (1957)
41) E.G. Perkins, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 36, 371 (1959)
42) R.B. Alfin-Slater, S. Auerbach, L. Aftergood, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 36, 638 (1959)
43) 太田静行，油化学，12，436 (1963)
44) 秋谷年見，栄養と食糧，14，71，397 (1962)；15，226 (1962).
45) 梶本五郎，賀嶋千鶴子，森田満子，栄養と食糧，13，317 (1961)
46) 鯨沢　恒，油化学，9，380 (1960)；9，324 (1960)；10，531 (1961)；12，214 (1963)
47) 湯木悦二，油化学，17，19，232，295，341 (1968)
48) 松尾　登，栄養と食糧，12，206 (1959)
49) N.R. Artman, W.R. Michael, J.C. Alexander, *Lipids*, 1, 353 (1966)
50) 松尾　登，生化学，35，313 (1963)
51) N. Matsuo, *J. Biochem.*, 49, 635 (1961)
52) 松尾　登，栄養と食糧，12，210 (1959)
53) 松尾　登，成蹊大学工学報告，1，81 (1965)
54) 日下兵蔵，松尾　登，油化学，17，22 (1968)
55) 日下兵蔵，橋本彰夫，松尾　登，油化学，17，65 (1968)
56) 日下兵蔵，松尾　登，油化学，17，671 (1968)
57) 戸谷永生，戸谷洋一郎，松尾　登，油化学，23，532 (1974)
58) 戸谷永生，松尾　登，油化学，24，371 (1975)
59) H. Kusaka, N. Matsuo, 第1回 JOCS-AOCS Joint

68) 諫林　宗，工化，53，281，1332 (1950)
69) J.C. Friedrich, J.C. Cowan, E.W. Bell, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38, 329 (1961)；39, 420 (1962)；40, 584 (1963)
70) R.A. Eisenhauer, R.E. Beal, E.L. Griffin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40, 129 (9631)；41, 60 (1964)
71) R.B. Hutchison, J.C. Alexander, *J. Org. Chem.*, 28, 2522 (1963)
72) N.R. Artman, W.R. Michael, J.C. Alexander, *Lipids*, 1, 353 (1966)
73) W.R. Michael, *Lipids*, 1, 359 (1966)
74) W.R. Michael, *Lipids*, 1, 365 (1966)
75) 斎藤衛郎，金田尚志，油化学，25，79 (1976)
76) 戸谷洋一郎，戸谷永生，松尾　登，栄養と食糧，28，61 (1975)
77) N.V. Razu, R. Razagopalan, *Nature*, 176, 513 (1955)
78) O.C. Johnson, E. Perkins, M. Sugai, F.A. Kummerow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 34, 594 (1957)
79) 土屋洸子，日本栄養食糧学会第15回総会（徳島）発表 (1961)
80) 秋谷年見，栄養と食糧，14，71 (1961)；15，226 (1962)
81) A.H. Roffo, *Prensa Med. Argent.*, 26, 619 (1939)
82) A.H. Roffo, *Bol. Inst. de Med. Expt. Estud. Cancer*, 19, 471 (1941)；20, 503 (1942)
83) S. Beck, *Cancer Research*, 5, 135 (1945)
84) S. Beck, *Brit. J. Expt. Path.*, 24, 143 (1943)
85) S. Beck, *Nature*, 162, 252 (1948)
86) A.C. Ivy,, 私信
87) F.A. Kummerow, *Cancer Research*, 22, 510 (1962)
88) 佐橋佳一，理研欧文報告，20，245 (1933)；23，264 (1934)
89) 柴川英一，理研欧文報告，21，149 (1933)；35，121 (1938)；38，304，497 (1941)；39，313，410 (1942)；42，67，72 (1947)；44，74 (1949)
90) 金田尚志，桜井寿恵，日水誌，19，1165 (1954)；23，324 (1957)
91) 松尾　登，生化学，29，816 (1958)
92) 松尾　登，油化学，12，261 (1963)
93) 松尾　登，生化学，35，317 (1963)
94) 松本　修，戸谷洋一郎，松尾　登，油化学，24，127 (1975)
95) 戸谷洋一郎，戸谷永生，松尾　登，栄養と食糧，28，79 (1975)
96) 桜井芳人，増原寿三，食糧研究所研究報告，7，107 (1952)
97) 秋谷年見，清水妙子，油化学，14，520 (1965)
98) 戸谷永生，戸谷洋一郎，松尾　登，第10回国際栄養学会議（京都）発表 (1975)
99) 戸谷永生，戸谷洋一郎，松尾　登，第47回日本生化学会総会（岡山）発表 (1974)

総説「油脂の加熱による変性」松尾　登，油化学，11，261 (1963)および総説「不飽和脂肪酸エステルの環状化」松尾　登，油化学，18，447 (1969) をも参照されたい。

56) F. Dobinson, P.S. Bailey, *Chem. Ind. (London)*, 1961, 632
57) P.S. Bailey, P. Kolsaker, B. Sinha, J.B. Ashton, F. Dobinson, J. E. Batterbee, *J. Org. Chem.*, 29, 1400 (1964)
58) J. Vrbik, *Czech. Pat.*, 114,732 (1965); *Chem. Abstr.*, 65, 9656a (1966)
59) V.A. Yakobi, V.I. Plakidin, P.P. Varpuklin, *Kataliticheskie Reaksii v Zhidkon Faze. Akad. Nauk Kaz. SSR, Kazakhsk. Gos. Univ., Kazakhsk. Resp. Pravlenie Mendeleevskogo Obshchetva, Tr. Vses. Konf., Alma-Ata*, 1962, 354; *Chem. Abstr.*, 60, 13204a (1964)
60) F. Dobinson, P.S. Bailey, *Tetrahedron Lett.*, 1960, No. 13, 14; *Chem. Abstr.*, 54, 22526b (1960)
61) P. Kolsaker, P.S. Bailey, F. Dobinson, B. Kumar, *J. Org. Chem.*, 29, 1409 (1964)
62) P. Bruyn, *Bull. Soc. Chim. Belges*, 60, 328 (1960); *Chem. Abstr.*, 56, 4696f (1962)
63) J.E. Batterbee, P.S. Bailey, *J. Org. Chem.*, 32, 3899 (1967)
64) J. Rigaudy, K.V. Thang, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1959, 1620
65) C.C. Price, A.L. Tumolo, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 4691 (1964)
66) H.M. White, P.S. Bailey, *J. Org. Chem.*, 30, 3037 (1965)
67) L.F. Budennaya, A.Z. Kozorezov, *Kataliticheskie reaksii v zhidk. faze*, 1974, 593; *Chem. Abstr.*, 84, 4903d (1976)
68) F.G. Fischer, *Ann.*, 476, 233 (1929)
69) R.E. Erickson, R.T. Hanser, J. Harkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6777 (1968)
70) A. Maggiolo, S.T. Niegowski, A.L. Tumolo, 138th. National Meeting of the Am. Chem. Soc., Sept. 1960, p. 10P; *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 4691 (1964)
71) 宮崎昭治, 須原康夫, 畑上みちこ, 日本特許, 796,792 (1975)
72) 宮崎昭治, 須原康夫, 日本特許, 796,793 (1975)
73) S. Miyazaki, Y. Suhara, *US Pat.*, 3,895,040 (1975)
74) 宮崎昭治, 日本特許, 834,625 (1976)
75) 宮崎昭治, 須原康夫, 日本特許, 847,326 (1977)
76) L.G. Galimova, *Khim. Vysokomol. Soedin., Neftekhim.*, 1973, 9; *Chem. Abstr.*, 81, 24746w (1974)
77) A.A. Vikhorev, A.M. Syroezhko, V.M. Potekhin, V.A. Proskuryakov, *V Sb., Okislenie Uglevodorodow, Kaustobiolitov*, 1975, 3; *Chem. Abstr.*, 84, 104779m (1976)
78) A.A. Vikhorev, A.M. Syroezhko, V.A. Proskuryakov, V.M. Potekhin, *Zh. Prikl. Khim.*, 48, 2059 (1975); *J. Appl. Chem. USSR*, 48, 2124 (1975)
79) A.A. Vikhorev, A.M. Syroezhko, V.A. Proskuryakov, *Zh. Prikl. Khim.*, 49, 588 (1976); *J. Appl. Chem. USSR*, 49, 601 (1976)
80) A.A. Vikhorev, A.M. Syroezhko, V.A. Proskuryakov, *Izv. Vyssh. Uchebn. Zavert. Khim. Tekhnol.*, 19, 1499 (1976); *Chem. Abstr.*, 86, 71988q (1977)
81) A.Ya. Gerchikov, E.P. Kuznetsova, E.T. Denisov, *Kinet. Katal.*, 15, 509 (1974); *Chem. Abstr.*, 81, 24750t (1974)
82) T.M. Galstyan, G.A. Galstyan, V.A. Yakobi, V.V. Tsutsarin, M.A. Butlerovskii, *Khim.-Farm. Zh.*, 10, 107 (1976); *Chem. Abstr.*, 85, 123520g (1976)
83) S. Braslavsky, J. Heicklan, *Int. J. Chem. Kinet.*, 8, 801 (1976); *Chem. Abstr.*, 86, 105542q (1977)
84) A.A. Syrov, V.K. Tsyskovskii, *Zh. Org. Khim.*, 6, 1392 (1970); *Chem. Abstr.*, 73, 87242j (1970)
85) B.I. Tarunin, M.N. Klimova, Yu.A. Aleksandrov, *Tr. Khim. Khim. Tekhnol.*, 1975, 103; *Chem. Abstr.*, 85, 108155y (1976)
86) C.B. Dick, R.F. Hanna, *J. Org. Chem.*, 29, 1218 (1964)
87) G. Slomp, J.L. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 915 (1958)
88) R.E. Erickson, D. Bakalik, C. Richards, M. Scanlon, G. Huddleston, *J. Org. Chem.*, 31, 461 (1966)
89) P. Deslongchamps, C. Moreau, *Can. J. Chem.*, 49, 2465 (1971)
90) P. Arlani, D. Frehel, A. Malaval, C. Moreau, *Can. J. Chem.*, 52, 3651 (1974)
91) P. Deslongchamps, C. Moreau, D. Frehel, P. Atlani, *Can. J. Chem.*, 50, 3402 (1972)
92) A.Ya. Gerchikov, E.M. Kuramshin, V.D. Komissarov, E.T. Denisov, *Kinet. Katal.*, 15, 230(1974); *Chem. Abstr.*, 80, 119938d (1974)
93) A.Ya. Gerchikov, V.D. Komissarov, E.T. Denisov, G.B. Kochemasova, *Kinet. Katal.*, 13, 1126 (1972); *Chem. Abstr.*, 78, 42528a (1973)
94) V.D. Komissarov, A.Ya. Gerchikov, E.T. Denisov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, 1974, 2619; *Chem. Abstr.*, 82, 72362k (1975)
95) V.M. Klochko, V.A. Yakobi, P.P. Karpukhin, M.B. Rozkina, *Kataliticheskie reaktsii v zhidk. faze*, 1974, 595; *Chem. Abstr.*, 83, 147340h (1975)
96) H. Taube, *Trans. Faraday Soc.*, 53, 656 (1957)
97) 宮崎昭治, 特許出願中, "二塩基酸の製造法"
98) G.A. Cook, A.D. Kiffer, C.V. Klumpp, A.H. Malik, L.A. Spenco, *Advan. Chem. Ser.*, 1959 (21), 44; *Chem. Abstr.*, 54, 2679g (1960)
99) B. Delmond, J.C. Pommier, J. Valade, *J. Organomet. Chem.*, 42, 337 (1973)
100) E. Proksch, A. de Meijere, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 15, 761 (1976)
101) 野依良治, 化学と工業, 28, 636 (1975)
102) G.A. Olah, N. Yoneda, D.G. Parker, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 5261 (1976)
103) G.A. Olah, N. Yoneda, D.G. Parker, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 2251 (1976)
104) G.A.Olah, N. Yoneda, R. Ohnishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7341 (1976)
105) G.A. Olah, A.M. White, D.H. O'Brien, *Chem. Rev.*, 70, 561 (1970)

自動酸化油脂の長期投与飼育試験*

柴田宣和・衣巻登輔

農林省水産庁東海区水産研究所
(東京都中央区築地5の5の1)

A Long-Term Nutritional Study with Autoxidized Oil

Nobukazu SHIBATA and Toyosuke KINUMAKI

Tokai Regional Fisheries Research Laboratory
(Kachidoki 5-5-1, Chuo-ku, Tokyo)

In the previous paper, authors reported that triglyceride content in the liver of rat given orally autoxidized methyl linoleate increased 18 h after the administration of the oxidized ester, but during these periods, no change was observed in the activities of the enzymes such as α-glycerophosphate dehydrogenase and triglyceride synthetase related with lipid synthesis in the liver.

One of the purposes of this experiment is to examine whether the same phenomenon observed in the previous experiment occures among the mice fed on autoxidized safflower oil for long time. Commercial stock diet, 10g per mouse are fed as basal diet to one of the three groups each consisting of 50 mice. Mice in other two groups recieved 0.1 ml of fresh or autoxidized safflower oil per mouse by mixing each with 10g of the basal diet, respectively. Feedings were continued for 9 months and observation was performed on growth rate and mortality during this period. Five mice of each group were killed at 2, 9, 14, 30 and 39 weeks after the start of feeding to determine blood glucose level, hepatic triglyceride and cholesterol contents and activities of various enzymes in liver.

The following results were obtained:

1. The autoxidized oil obviously caused the lowerimg of average gain of the body weights of mice of the group fed this oil as compared with other two groups fed on basal diet or with fresh oil.

2. At the time when the lowering of body weight gain was observed, the mortalities of the mice of this group became higher than those of other two groups.

3. The glucose levels in bloods, triglyceride and cholesterol contents in livers did not show any difference among three test groups fed on basal diet, with fresh oil and with oxidized oil.

4. In the present experimetal conditions, no clear difference in tested enzyme activities in livers of mice was observed among the three test groups mentioned above.

1 緒　　言

周知のとおり水産食品中に含有される油脂は農産物や畜産物に含有される油脂に比べて，酸化されやすい高度不飽和脂肪酸の含量が一般に高いため，市販される水産加工品特に乾製品，冷凍品などでは高い過酸化物価のものが見いだされている。従って，水産物については酸化防止技術が要求される一方，過酸化物や酸化重合物の毒性の本質を明らかにすることが肝要である。従来，過酸化物やその他の油脂酸化物の毒性については金田[1]，松尾[2]あるいは俣野[3]らの報告が数多く知られているが，毒性の本質についてなお不明な点が多く，特に長期間にわたって過酸化物を与えた実験は数少ない。

著者らは先にラッテにリノール酸メチルの過酸化物を強制的に経口投与した 18h 後に，肝臓中のグリコーゲンが急減し，トリグリセリドが蓄積したことを報告した[4]。今回はマウスに対し約9か月間にわたって油脂の過酸化物を与えた場合，肝臓中にトリグリセリドが蓄積するかどうかについて検討すると同時に，成長率，へい死率および肝臓中の酵素活性などに対する影響について調べた結果について報告する。

2 実　　験

* 東海区水産研究所業績　B第 636 号

2・1 実験動物と飼料

この実験では5週令の体重15g程度の *ddn* 系マウス150匹を用いた。7日間の予備飼育中は市販の粉末飼料[注1]（日本クレア株式会社）を1匹当たり，4gの割合で適当量の水で練って与えた。予備飼育終了後，各区50匹ずつの3区にマウスを分けた。各区のマウスにはそれぞれ実験期間中，異なった飼料をマウスの大部分が食べきれる程度与え，飽食に近い制限食とした。3区の実験区のうち第1の区には予備飼育期間と同じ粉末飼料のみを引き続き与え，これを油脂無添加区とした。第2の区のマウスには新鮮なサフラワー油を粉末飼料4gに対して外割で0.1mlを混合して与え，これを新鮮油添加区とした。第3の区のマウスにはサフラワー油を下記のように自動酸化したものを新鮮油と同じ割合で添加し与え，これを酸化油添加区とした。

自動酸化の方法は新鮮なサフラワー油に乾燥した空気を吹き込みつつ酸化し，POVが2,000 meq/kg程度[注2]になった時点で通気を中止し，これを酸化油の試料とした。なお，油脂試料の添加は毎日行い，使用後は N_2 ガスを充てんし，−20℃の冷凍庫中に保存し，極力試験期間中の油脂試料の変化を防止した。

2・2 実験期間と処理

実験期間は9か月とし，その間月に1～2回，体重を測定した。また酸化油試料は1か月後に，新しく同じ条件下で新鮮なサフラワー油から調製した自動酸化油に取りかえ，これを使用して実験を継続した。

実験開始より2，9，14，19，30，39週目のそれぞれの時点で，各試験区より5匹をとり，エーテル麻酔下で下大静脈より採血した。採血後，マウスより肝臓を摘出し，その重量を測定し，さらに，肝臓中の各種酵素活性についても測定した。

2・3 分析法

2・3・1 成分測定法

血中グルコースはグルコースオキシダーゼ法[9]，トリグリセリドは Van Handel 法[10]，コレステロールは Zak-Henly 変法[11]により測定を行った。

2・3・2 酵素活性の測定法

グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）とグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）：Friedman 反応に基づいた Reitman-Frankel法[12]によった。

トリグリセリド合成酵素（TS）：Hütscher 法[13]によった。

アデノシントリホスファターゼ（ATPase）とグルコース-6-ホスファターゼ（G-6-Pase）：50 mM トリス-HCl 緩衝液（ATPase：pH 8.5，G-6-Pase：pH 6.5）0.2 ml，25 mM $MgCl_2$ 液 0.1ml，基質液（20 μmol/ml）と肝臓ホモジネート液0.1 mlを試験管中でよく混合し，37℃で30 min インキュベートした後2 mlの冷5%トリクロロ酢酸液を添加した。その混合液を遠沈し上澄み液中の無機リン酸の含量を Fiske-Subbarow 法[14]によって定量した。

α-グリセロリン酸脱水素酵素（α-GPDH）とイソクエン酸脱水素酵素（ICDH）：0.1 M トリス-HCl 緩衝液（α-GPDH：pH 8.6，ICDH：pH 7.6）0.2 ml と 250 mM $MgCl_2$ 液 0.2 ml と 0.5 M 基質液 0.2 ml と NAD[注3]（α-GPDH）あるいは NADP[注4]（ICDH）の 50 mg/ml 濃度の溶液 0.2 ml とを同一試験管に入れ，よく混合し 37℃で30 min インキュベートした後 10% Na_2WO_4 液 0.2 ml とアセトン 1.4 ml とを添加した。その混合液を遠心分離し，上澄み液の吸収を 340 nm で測定した。

3 実験結果と考察

Fig.-1 に各試験区のマウスの平均体重増を図示した。この図より，区間の差異が顕著となるのは14週みるで，酸化油投与区では他の2区に比し体重増が明らかに劣ってきた。なお動物の摂じ（餌）状況を観察すると，実験開始直後では酸化油添加区のマウスは他の2区に比し，食えさが多かったが，1～2週目後より飼料になれ，食えさがほとんどみられなくなった。しかがって，上記の体

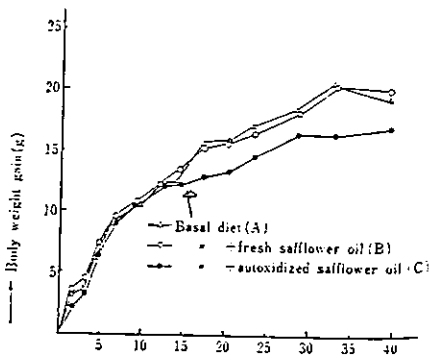


Fig.-1 Body weight gains of male mice feeding various diets.

注1) 水分 6.0%，粗タンパク質 24.0%，粗脂肪 3.5%，粗繊維 4.5%，粗灰分 6.0%，可溶無窒素物 56.0%．ビタミン添加量（1 g 中）：ビタミン A10 I.U.，ビタミン D 2 I.U.，ビタミン E 10 γ，ビタミン B_1 5.6 γ，ビタミン B_2 10 γ，ビタミン B_6 4 γ，ビタミン B_{12} 0.02 γ，パントテン酸 Ca 25 γ，ナイアシン 44 γ，葉酸 0.8 γ，塩化コリン 400 γ．

注2) 通常この条件では POV 3,000～5,000 meq/kg 程度に達し，以後は分解により低下する．

注3) β-ジホスホピリジンヌクレオチド

注4) トリホスホピリジンヌクレオチド

Table-1 Mortality in different feeding periods of male mice fed various diets.

Feeding periods (weeks)	Basal diet(A)	A+Safflower oil	
		Fresh(B)	Autoxidized (C)
0～2	0/50	0/49	0/50
2～5	0/45	0/44	0/45
5～9	0/40	1/39	1/40
9～14	0/35	0/33	0/34
14～19	0/30	0/29	4/29
19～30	0/25	6*/24	3/20
30～39	1/20	0/13	1/12

* Four mice were killed in accident.

The numerical values show the number of mice in each group dying between successive withdrawls of mice.

重増が他の2区に比して劣る原因は酸化油摂取の影響と考えられる。これと同様の結果は L'Estrange ら[15]の豚を用いた試験および Andrews ら[16]のラッテを用いた試験においても観察されている。

へい死率についても，Table-1 にみるように酸化油添加区のマウスについて，平均体重増の減少し始めた14～19週目にかけて，他の2区よりも高くなることが観察された。ただし，新鮮油添加区のマウスも19週以後30週目にかけて，へい死するマウスが増加する傾向が認められた。しかし，へい死した6匹中の4匹は飼料と全く関係のない事故死によるものであった。また，残りの2匹中の1匹は正常な体重増を示していたにもかかわらず不明の原因で急死し，他の1匹は体重増が試験開始時より悪く，へい死する17週に達する以前より体重が減少し始めてへい死したものである。一方，酸化油添加区のマウスの場合は，へい死するマウスは概して体重増が少なく，へい死直前には体重の減少が起こることが観察され，へい死の状況は明らかに異なっていた。この点はまた，油脂無添加区の実験後期（30～39週）あるいは新鮮油添加区と酸化油添加区の実験初期（5～9週）にへい死したマウスがすべて正常な体重増を示しながら急死したこととも相違していた。

上記の結果をまとめてみると，酸化油添加区の場合，マウスの体重が減少し始めた時期にへい死率が高まることが推測される。

これに似た酸化油を長期投与した動物におけるへい死率の増加は Kaunitz ら[17]もラッテにおいて認めているが，組織学的所見ではわずかに心臓障害が認められたに

Table-2 Average body weight, relative weight of liver to body weight and blood glucose level of male mice in different feeding periods.

Feeding periods (weeks)	Experimental group	Average body weight (g)	LW/BW*	Blood glucose (mg/dl)
0	A**	18.0±1.9(50)		
	B**	17.8±1.9(49)		
	C**	17.4±1.9(50)		
2	A	21.1±3.1(50)	6.0±0.5(5)	181±24(5)
	B	21.3±3.0(49)	5.8±0.8(5)	166±31(5)
	C	19.5±2.7(50)	5.8±0.6(5)	145±35(5)
9	A	28.3±4.8(40)	5.7±0.4(5)	164±61(5)
	B	31.4±3.1(38)	5.3±0.3(5)	176±30(5)
	C	29.8±4.7(39)	5.3±0.2(5)	143±17(5)
14	A	31.4±4.9(35)	5.1±0.6(5)	145±70(5)
	B	31.4±3.1(33)	5.6±1.0(4)	100±19(4)
	C	29.8±4.7(34)	5.2±0.3(5)	171±40(5)
19	A	33.7±5.5(30)	4.3±0.5(5)	161±48(5)
	B	33.0±3.1(24)	5.2±0.1(4)	144±59(5)
	C	29.2±6.4(22)	5.4±0.3(5)	146±44(5)
30	A	37.1±6.9(25)	5.0±0.6(5)	84±12(5)
	B	36.7±4.9(19)	4.5±0.1(5)	185± 9(5)
	C	36.1±5.0(17)	4.5±0.1(5)	214±14(5)
39	A	37.2±8.6(14)	4.5±0.3(4)	164±25(4)
	B	38.2±6.0(9)	4.2±0.2(5)	131±40(5)
	C	35.2±5.1(8)	4.5±0.5(5)	121±28(5)

Each value presents the mean ± standard deviation. The numbers of determinations performed for each value quoted are in parentheses.

* Relative weight of liver to body weight.

** See in Table-1.

すぎないと報告している。従来報告された酸化油投与の急性障害においても，組織学的障害は消化盲内壁のレベルに止まることが報告されているが[1]，慢性的な障害でも組織の損傷が認められることはきわめて希と考えられる。

Table-2 には平均体重，肝臓体重比と血糖値を示した。肝臓体重比は加令とともに減少する傾向にあるが，3区の間での差は少なく，酸化油の摂取により，肝臓肥大あるいは萎縮は起こらないと考えられる。血糖値は30週目の値が各区間で大きく異なり，特に油脂無添加区の値が低かったが，この時点の値を別とすれば，飼育期間での3区間の有意差は認められなかった。30週目の油脂無添加区のマウスは単に血糖値が低いだけでなく，肝臓体重比も一たんいっ低下してまた上昇しており，この時期に何らかの変化が体内に生じたとも推測される。またこの時期に新鮮油添加区および酸化油添加区ではマウスのへい死があったのに，油脂無添加区ではへい死がなかったことと何らかの関連があるのかもしれない。いずれにしてもこの点に関する原因を明らかにすることはできなかった。

Table-3 Comparison of triglyceride and cholesterol contents of mice liver among 3 experimental groups in different feeding periods

Feeding periods (weeks)	Experimental group	Triglyceride (mg/g liver)	Cholesterol (mg/g liver)
14	A*	3.8±1.1(5)	7.9±0.4(5)
	B*	3.6±1.0(4)	8.0±0.6(5)
	C*	3.8±0.4(5)	7.4±1.2(5)
19	A	13.2±5.2(5)	5.5±0.8(5)
	B	7.8±3.0(5)	6.5±1.4(5)
	C	10.2±3.6(5)	5.5±0.2(5)
30	A	9.0±1.5(4)	3.5±0.6(5)
	B	8.8±2.2(5)	4.7±1.8(5)
	C	11.5±4.7(5)	3.5±1.1(5)
39	A	9.6±2.7(5)	4.6±0.4(5)
	B	8.6±5.7(4)	4.0±0.5(4)
	C	6.1±1.8(3)	3.8±0.3(3)

For the indication(*) and presentation of each value, see footnote in Table-2.

Table-4 Various enzyme activities of mice liver among 3 groups in different feeding periods.

Enzymes	Groups	Feeding periods (weeks) 14	19	30	39
GPT*	A**	9.38±0.77(5)	9.98±0.80(5)	8.47±0.75(5)	9.00±1.02(5)
	B**	9.30±0.64(4)	9.93±0.63(5)	7.99±0.91(5)	10.12±0.99(4)
	C**	8.32±0.55(5)	9.44±0.56(5)	6.62±1.90(5)	9.21±0.91(3)
GOT*	A	7.07±0.48(5)	7.35±0.58(5)	4.59±0.37(5)	4.94±0.86(5)
	B	6.76±0.43(4)	7.06±0.85(5)	3.95±0.58(5)	5.58±0.90(4)
	C	5.74±0.43(5)	6.31±0.25(5)	3.75±0.61(5)	5.08±0.42(3)
TS*	A	2486±396.5)	3268±226(5)	3380±346(4)	4523±940(5)
	B	2913±217(4)	3123±223(5)	2699±311(5)	3140±750(4)
	C	1956±322(5)	2440±423(5)	2529±430(5)	2865±1283(3)
α-GPDH*	A	1230±253(5)	1403±281(5)	1094±338(5)	1256±174(5)
	B	971±163(4)	1192±171(5)	1346±182(5)	1141±273(4)
	C	760±266(5)	1369±128(5)	1093±410(5)	1284±214(3)
ICDH*	A	916±139(5)	868±39(5)	1416±611(5)	1155±716(5)
	B	843±120(4)	777±86(5)	1440±615(5)	1617±787(4)
	C	901±49(5)	859±65(5)	1655±184(5)	642±405(3)
ATPase*	A	6.50±1.76(5)	6.15±0.39(5)	5.98±2.98(4)	9.66±1.78(5)
	B	6.84±1.21(4)	6.48±1.40(5)	9.66±3.36(5)	10.05±1.05(4)
	C	6.19±1.84(5)	4.97±0.65(5)	6.58±1.51(5)	—
G-6-Pase*	A	15.4±2.3(5)	14.9±1.3(5)		11.6±5.3(5)
	B	13.5±0.9(4)	13.1±4.3(5)		12.5±4.3(4)
	C	14.8±0.5(5)	13.9±2.3(5)		13.9±5.0(3)

* GPT: Glutamate pyruvate transaminase (mmol/mg protein), GOT: Glutamate oxalacetate transaminase (mmol/mg protein), TS: Triglyceride synthethase (cpm/mg protein), α-GPDH: α-Glycerophosphate dehydrogenase (OD $_{340m\mu}$/mg protein×1,000), ICDH: Isocitric dehydrogenase (10^{-3} mol/mg protein), ATPase: Adenosine triphosphatase (μmol/mg protein), G-6-Pase: Glucose-6-phosphatase (μmol/mg protein).

** For this indication and presentation of each value, see footnote in Table-2.

きなかった。

Table-3 には肝臓中のトリグリセリドとコレステロール含量について示した。14週目ではトリグリセリド含量がコレステロール含量よりも低いが，19週目以後ではこの関係が逆転することが観察された。しかし，それぞれの値の有意差は3区間で認められなかった。この実験結果は著者らがすでに報告した強制的にリノール酸メチル過酸化物を経口投与した実験結果[4]とは異なっていた。この点の矛盾は短期間に試料油を大量投与した場合と長期間，任意に比較的少量ずつ与えた場合などの実験条件の違いから生じたと考えられる。

Table-4 には肝臓中の各種酵素の活性を示す。各酵素活性はそれぞれの時点で3区間で有意差を示さなかった。GOT あるいは GPT の活性が酸化油投与により，影響を受けないことは，肝臓体重比が変化ないことと考え合わせ，肝臓組織の損傷が起こってないことを示すと考えられる。次に，トリグリセリド合成に関与する TS および α-GPDH の活性に対しても酸化油の摂取は今回の実験条件においては影響を及ぼさなかったが，このことは既報[4]の強制経口投与の場合と全く同じであった。また，TCA 回路の ICD，解糖系の G-6-Pase およびエネルギー供給系の ATPase の活性にも酸化油の摂取は影響しないことが観察された。測定した酵素中で ICD に関して，Green ら[15]は *in vitro* でリノール酸メチル過酸化物にとってこの酵素が阻害されると報告した。本実験の結果 ICD 活性が阻害されないことから考えると著者ら[16]や Andrews ら[17]あるいは Bergans ら[17]が報告しているようにヒドロペルオキシドそのままの形では吸収されないとの結果と思われる。

以上のように，酸化油の長期投与によって体重増加の減少およびへい死率の増大が認められたが，その原因を推測できるような生体内での変化は今回行った脂質関連物質，酵素活性の測定によってははあくできなかった。今後さらに視点をかえてこの問題を明らかにする予定である。

終わりに，実験動物の飼育及び管理に協力を頂いた当研究所利用部，荒井君枝技官に深く感謝いたします。

(昭和52年5月12日受理)

文 献

1) L. Raul Tovar G, T. Kaneda, *Yukagaku*, **26**, 169 (1977)
2) 松尾 登, 油化学, **25**, 743 (1976)
3) 保野景典, 油化学, **19**, 713 (1970)
4) N. Shibata, T. Kinumaki, H. Okuda, S. Fujii, *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1899 (1973)
5) Z.P. Cawly, F.E. Spear, R. Kendall, *Am. J. Clin. Path.*, **32**, 195 (1959)
6) E. Van Handel, D.B. Zilversmit, *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 152 (1957)
7) 柴田 進, 北村元仕, "日常臨床生化学定量法", 中山書店 (1963) p. 137
8) S. Reitman, S. Frankel, *Am. J. Clin. Path.*, **28**, 56 (1957)
9) D.N. Brindley, G. Hünbsher, *Biochem. Biophys. Acta*, **106**, 495 (1965)
10) C.H. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
11) J.L. L'Estrange, K.J. Carpenter, *Br. J. Nutr.*, **21**, 377 (1967)
12) J.S. Andrews W.H. Griffith, J.F. Mead, R.A. Stein, *J. Nutr.*, **70**, 199 (1960)
13) H. Kaunitz, R.E. Johnson, L. Pegus, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 770 (1965)
14) H.S. Olcott, A. Dolev, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 820 (1963)
15) R.C. Green, C. Little, P.J. O'Brien, *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 598 (1971)
16) 衣巻豊輔, 柴田宣和, 荒井君枝, ビタミン, **35**, 188 (1967)
17) J.G. Bergan, H.H. Draper, *Lipids*, **5**, 976 (1970)

(M⁺−側鎖−18−42) が認められる。380(M⁺−18) が認められず，365 (M⁺−15−18) のピークが低いことなど，これらの開裂パターンは 5α-エルゴスト-7, 22-ジエン-3β-オールの文献値[12)-16)] のそれとよく一致した。

UV (nm)：272, 282 に吸収極大がみられず，$\Delta^{5,7}$-ステロールでないことを示す。

なお，このものは，エルゴステリルアセタートより合成して得られた 7,22-エルゴスタジエニルアセタートの IR 及び NMR の主吸収スペクトルと一致した。以上の結果からめしまこぶの主ステロールは 7,22-エルゴスタジエノールと同定した。

3 考 察

3・1 脂質の量的関係及び脂肪酸組成

脂質の含有率は 0.1～3.0% で一般のきのこと同様に低い値を示している。脂質中の不けん化物含有率は 16.9～42.3% と高い値を示し，とんびまいたけの 42.3% は今まで著者らの調べたものの中ではえぞひずめたけ[1)] の 43.5% につぐ高い値である。

主飽和酸は C_{16} 酸であり，主不飽和酸は $C_{18:2}$ 酸（ほうろくたけ）と $C_{18:1}$ 酸（他の4種）であることなど一般のきのこと同様である。

3・2 ステロール組成

GLC と UV 吸収の結果から，とんびまいたけの主ステロールはエルゴステロール (96.4%)，他の4種の主ステロールは 7,22-エルゴスタジエノールと考えられ，その含有率はそれぞれ，めしまこぶ 86.9%，きつねかわらたけ，63.5%，しろちゃさるのこしかけ 94.0%，及びほうろくたけ 87.9% であった。めしまこぶからはこれを $AgNO_3$-TLC により単離し，IR, GLC, NMR 及び MS により，7,22-エルゴスタジエノールと同定した。

めしまこぶのステロールについては，小島，高橋らは[11)]，その mp, IR によりエルゴステロールとしているが，われわれの実験結果からは，それは認められなかった。

終わりに，本研究に当たり，終始御指導をいただいた東京学芸大学三橋達雄教授，数多くの御助言をいただいた日本大学理工学部松本太郎教授ならびに MS, NMR を測定していただいた伊藤佐博氏，滝戸俊夫氏に深く感謝する。

（昭和53年2月2日受理）

文 献

1) 横川洋子，油化学，19，50 (1970)
2) 三橋達雄，横川洋子，東京学芸大紀要，25，124 (1974)
3) 横川洋子，油化学，18，258 (1969)
4) 横川洋子，油化学，19，97 (1970)
5) 横川洋子，油化学，20，831 (1971)
6) 遠藤節子，渋谷勇一，田辺和子，三橋達雄，日化，92，1009 (1971)
7) 小島英幸，高橋 健，日化，79，1458 (1958)
8) G.R. Pettit, J. G. Knight, *J. Org. Chem.*, 27, 2696 (1962)
9) L.I. Stringina, Y.N. Elkin, G.B. Elyakov, *Phytochem.*, 10, 2361 (1971)
10) 白井 浩，吉富和彦，油化学，11，551 (1962)
11) M. Glover, J. Glover, R.T. Morton, *Biochem. J.*, 51, 1 (1952)
12) A. Seher, H. Vogel, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 78, 106 (1976)
13) W.V. Ruyle, E.M. Chamberlin, J.M. Chemerda, G.E. Sita, L.M. Aliminosa, R.L. Erickson, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5929 (1952)
14) B.A. Knights, *J. Chromatog.*, 1967, 273
15) P. Eneroth, K. Hellström, R. Ryhage, *Steroids.*, 6, 707 (1965)
16) M. Lenfant, E. Zissmann, E. Lederer, *Tetrahedron Lett.*, 1967, 1049

自動酸化油の毒性に関する研究（第7報）

自動酸化油投与マウスの病理組織学的研究（慢性毒性）

白 台 鴻*・金 田 尚 志

東北大学農学部食糧化学科（仙台市堤通雨宮町 1-1）
* 現住所：ソウル特別市城東区杏堂洞山 8-2 漢陽大学校医学科部

Studies on the Toxicity of the Autoxidized Oils. VII.

Histopathological Studies on Mice Administered with Autoxidized Oils. (Chronic Toxicity)

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[1)], the acute toxicity of methyl linoleate hydroperoxides (LMHPOs) and secondary oxidation products on mice were reported histopathologically. In that paper, the authors noticed that LMHPOs and secondary oxidation products showed similar toxic effects, i.e. gross symptoms were observed in small intestine, liver, lung and kidney. Marked symptoms which were observed in tissues were necrosis, fatty accumulation, and congestive hyperemia. The present study was designed to clarify histopathologically the mechanism of chronic toxicity induced by autoxidized oils. Two kinds of autoxidized methyl linoleate were used for experiments, one contained hydroperoxides (AOML-1) and the other was secondary oxidation products rich (AOML-2).

Those autoxidized methyl linoleates were administered to mice orally in one-tenth or one-twentyth of the amounts of acute toxicity for 2 months. The mice were inspected during the feeding period. The died and/or survived mice were anatomized and small intestine, liver, lung, and kidney were separated immediately from body. The chronic toxicity occurred only when sample oils were administered over a definite amount (one-tenth of the amount of acute toxicity) to mice. The chronic toxicity was similar to acute toxicity in the symptoms. However, such symptoms were more severe than that of acute toxicity. From the fact that feeding of small amounts of sample oils had no detectable toxic effects, whereas they were toxic when sample oils were ingested in larger amounts, we noticed the existence of a barrier for the occurrance of chronic toxicity. From the results obtained, we conclude that the mechanism of chronic toxicity caused by autoxidized oils is almost similar to that of acute toxicity.

1) *Eiyo to Shokuryo* (*J. Jap. Soc. of Food and Nutrition*), 29, 85 (1976)

1 緒 言

著者らは，本研究の第5報[1)] において自動酸化油の毒性発生機構を明らかにするため，リノール酸メチルヒドロペルオキシド (LMHPO) 及びその二次酸化生成物のマウスに対する急性毒性試験を行い，各種臓器を病理組織学的に検討し，LMHPO と二次酸化生成物による死亡マウスの小腸，肝，肺，じんなどの組織に壊死，脂肪沈着，血管の拡張と充うっ血を認めた。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おり，特に二次酸化生成物は各組織に対し一層強い障害を与えることを認めた。

過酸化物投与時の急性毒性の病理的変化については従

LMHPO : Methyl linoleate hydroperoxides
AOML : Autoxidized methyl linoleate
AOML-1 : Autoxidized methyl linoleate contained hydroperoxides
AOML-2 : Autoxidized methyl linoleate contained secondary oxidation products

来いくつかの知見が得られているが[1-4]，慢性毒性についての病理組織学的研究はほとんどされていない。そこで著者らは過酸化物及び二次酸化生成物を含む自動酸化リノール酸メチル（AOML）を少量ずつ長期間マウスに経口投与した時発現する慢性毒性による組織障害を病理組織学的に検討したので報告する。

2 実 験

2・1 試料の調製

前報[1]と同様に調製した。すなわち，純度 98% のリノール酸メチルを 60℃ で酸素を吹きこみ自動酸化させた。25 h 後，過酸化物価（POV）が最高値付近に達したとき試料を採取し（AOML-1），さらに 90 h 酸化させ，POV が極大値を過ぎ過酸化物がこわれて二次酸化生成物を多く生成するようになったものを試料とした（AOML-2）。これら試料の化学特数を Table-1 に示した。

Table-1 Characteristics of autoxidized methyl linoleate used for feeding experiments.

Sample	POV meq/kg	COV meq/kg	*MMW
**AOML-1	2670	876	407
AOML-2	1167	1720	447

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

慢性毒性試料にはこれらをオレイン酸メチルで 10 倍量に希釈した。

2・2 動物実験

1群5匹よりなる体重 21～22g の DDI 系雄マウスに AOML-1, AOML-2 の各試料を Table-2 に示すように，急性毒性時[1]の 1/10～1/20 量を経口投与した。すなわち AOML-1 給与群にはオレイン酸メチルで 10 倍に希釈したものを 3 匹には 0.15 ml/d, 2 匹には 0.3 ml/d, AOML-2 群では 3 匹に同様希釈したものを 0.1 ml/d, 他の 2 匹には 0.1～0.2 ml/d (0.1 ml/d 45 d, 0.2ml/d 15 d) 与えた。また，対照群5匹にはオレイン酸メチルを 0.3 ml/d 与えた。これら試料は stomach tube を用い，一定時刻に 1日1回 60 d 連続経口投与した。試料投与前後，固型飼料と水道水を自由に摂取させた。飼育期間中はマウスの状態を観察するとともに体重の変化も調べた。

Table-2 Toxicity of each sample orally administered on mice.

Sample	Amount of sample orally administered, ml/mouse	No. of mice	Mortality after 2 months	
			No. of death	No. of survival
MO*	0.30	5	0	5
AOML-1**+MO (1 : 9)	0.15	3	0	3
	0.30	2	2	0
AOML-2**+MO (1 : 9)	0.10	3	0	3
	0.20	2	1	1

* Methyl oleate
** Autoxidized methyl linoleate
All mice were used for histopathological observation.

飼育途中，死亡したマウスは死亡直後，生存したものは 60 d 後同時に断頭と殺し，ただちに，小腸，肝，肺，じんの各組織を採取し，前報[1]のとおり組織標本を作製し，病理組織学的検索を行った。

3 結 果

3・1 各実験群の症状とその出現経過

各試料を 60 d 連続経口投与した結果（Table-2），AOML-1 0.15 ml/d, AOML-2 0.1 ml/d の投与では毒性を発現せず，両群とも対照群よりやや劣るが体重は増加し，正常に近い成長を示した。すなわち，いずれも中毒を思わせる外観的症状を示さず，死亡はなかった。しかし，投与量を2倍にすると急性毒性時と同様な外観的症状を呈し AOML-1 0.3 ml/d 投与マウス中1匹は試料投与 48 d 後他の1匹は 57 d 後に死亡した。AOML-2 0.1 ml/d を 45 d 間投与しても毒性が発現しないため，2匹は 0.2 ml/d と2倍にしたが，うち1匹は試料投与 54 d 後死亡した。また，他の1匹は生存したが衰弱が目立った。なお，AOML-1 群でも毒性が発現すると衰弱状態になり，体重は急減し 60 d 以内に死亡した。生存マウスは体重の増加を示したが，その程度は対照群が最も大きく，次いで AOML-1 群，AOML-2 群の順となり AOML-2 を投与したものの方が体重の増加が少なかった。

3・2 病理組織学的所見

1) 小腸：Table-3 に示すように死亡マウスには急性毒性時と同様，粘膜の融解壊死が強く，とくに粘膜下組織にまで及んでおり，高度のかいようが認められた（Fig.-1）。脂肪の沈着は組織の破壊のため確認できなかった。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が，その程度は急性毒性時より強かった。生存マウスではじゅう毛先端部の壊死と，リンパ管の拡張が軽度に見られたが，血管中の異染色性と脂肪の沈着は認められなかった。本実験における小腸の障害は前報[1]で報じたリノール酸メチルヒドロペルオキシド投与急性毒性時と類似している。また，小腸の障害は他の臓器に比べ強かった。

2) 肝臓：Table-4 に示すように両群の死亡マウスの肝臓にも急性毒性と同様な症状が出現した。すなわち血管に近接した部位にびまん性壊死がみられた。肝細胞のグリコーゲンは消失し，中性脂肪が蓄積していた。一方，静脈洞内皮細胞は肥大し，多糖類が軽度に沈着しており，同細胞の活性化が認められた。血管系では門脈系血管の拡張とうっ血が強く，出血も強くみられたが出血

Table-3 Histopathological observation in the small intenstines of mice administered orally AOML-1 and AOML-2.

Group	Status	Vacuolic degeneration of the epithelial cells*1	Villi*2			Fatty deposition			Dilatation of the blood vessels*6	Degeneration of blood cells
			Necrosis	Dilation of the lymphatic vessels*3	Glandular degeneration of the tunica propriae*4	Epithelial cells*5	Tunica propriae*6	Tela submucosae*7		
Control	Survival	−	−	−	−	−	−	−	−	−
AOML-1	Death	−	**++++	−	−	／	／	／	+	+++
	Survival	−	+	+	−	／	／	／	+	−
AOML-2	Death	−	**++++	−	−	／	／	／	±	++
	Survival	−	±	+	−	+	−	−	−	−

** Necrosis is reached to mucosa and tela submucosa.
The degree or symptoms is roughly indicated by the number of + signs : − negative, ± very weak, + weak, ++ maderate, +++ strong, ++++ very strong, ／ can't identify.
*1 上皮細胞空胞変性 *2 リンパ管拡張 *3 上皮細胞 *4 粘膜下組織
*5 じゅう毛 *6 固有層か拡張 *6 固有層 *6 血管拡張

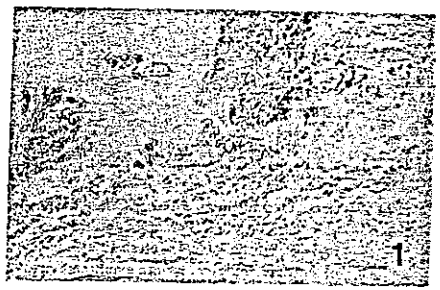


Fig.-1 Jejunal in dead mouse fed AOML-2 with severe coliquative necrosis at the tip of jejunal villi.
Symptoms induced by chronic toxicity are similar to that of acute toxicity. (H-E stain, ×100)

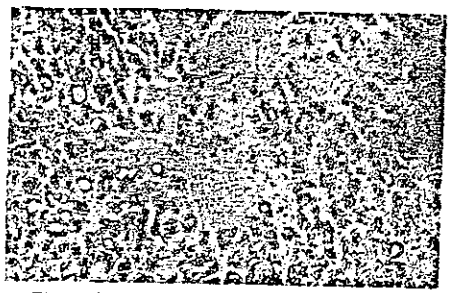


Fig.-2 Liver in dead mouse fed AOML-2 with vacuolic degeneration surrouding nuclei, severe diffusional necrosis and hemorrhage. The degree of injury in the livers is more severe than that of acute toxicity. (H-E stain, ×100)

Table-4 Histopathological observation in the livers of mice administered orally AOML-1 and AOML-2.

Group	Status	Diffusional necrosis in the livers	Nuclei of liver cells				Atrophy of the liver cells*1	PAS stain		Activation of reticuloendothelial sys.*2	Sudan black B stain		Dilatation of the portal vein*3	Congestive hyperaemia of the livers*4	Hemorrhage	Intracellular vacuoles*5
			Disappearance of nuclei	Appearance of large and giant nuclei	Irregularity in the nuclear sizes	Appearance of binuclear cells		Glycogen deposition	Polysaccharides (Endothelium*2) Liver cells		Fatty deposition	Lipids				
Control	Survival	−	−	−±	⊥	+	−	++	−	−	−	−	+	−	−	−	+
AOML-1	Death	+	+⊥	+	++	+	++	+⊥	−	⊥	+	++	+	++	+−+	+	+
	Survival	−	⊥	+	+	+	−	+++	−	?	−	−	+	⊥	⊥	−	+
AOML-2	Death	++	++	−⊥	++	+	++	−	+	+	+	++	+	+++	+++	+++	++
	Survival	⊥	+	+	+	+	−	+++	−	?	−	−	+	+	+	−	+

*1 萎縮 *2 内皮細胞 *3 門脈拡張 *4 細胞変性
*5 肝細胞変性 *6 細網内皮細胞活性化 *6 充うっ血

Table-5 Histopathological observation in the lungs of mice administered orally AOML-1 and AOML-2.

Group	Status	Alveoli of lung*1									Hemorrhage
		Epithelial dropping*2	Epithelial thickness*3	Epithelial proliferation*4	Deposition of substance like protein	Atelectasis*5	Focal necrosis*6	Appearance of macrophagocytes*7	Dilatation of the blood vessels	Congestive hyperemia of the lungs*8	
Control	Survival	−	±	−	−	−	−	−	±	±	±
AOML-1	Death	−	+	− ~ ±	± ~ ++	++	++	−	++	++	++
	Survival	−	+	±	−	−	±	−	+	+ ±	++
AOML-2	Death	−	+	− ~ ±	++	+	++	−	+	± +	+++
	Survival	−	+	±	−	−	+	−	+	+	+±

*1 肺胞 *2 上皮脱落 *3 上皮肥厚 *4 上皮増殖 *5 無気肺 *6 壊死巣 *7 大食細胞出現 *8 充うっ血

の程度は AOML-2 群において顕著であった (Fig.-2)。急性毒性時と同様肝細胞の異常が認められたがその程度は強く，特に核周囲の空胞形成と核濃縮が顕著であった。また，肝細胞はひどくい縮していた。肝臓に対する障害は急性毒性時と同様，AOML-2 を投与した群の方が著しかった。両群の生存マウスには核の消失と血管の拡張，うっ血が軽度に見られたが大きい変化は認められず，グリコーゲンは残存し，脂肪の沈着はみられなかった。

3) 肺臓：Table-5 に示すように両群の死亡マウスにおける肺の障害はリノール酸メチルヒドロペルオキシド投与時の急性毒性と同様であるがその程度は強かった。すなわち，強い出血と充うっ血さらには無気肺部と壊死，タンパク様物質の出現が強くみられた。急性毒性時と異なっていた点は AOML-2 投与群でも肺に対する影響が強いことである (Fig.-3)。生存マウスでは血管の拡張と充うっ血，出血が中等度，肺胞上皮肥厚と壊死巣が軽度にみられた。

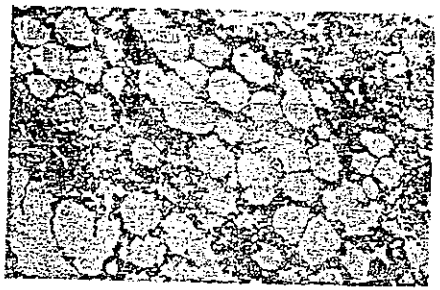


Fig.-3 Lung in dead mouse fed AOML-2 with alveolar dilatation, hemorrhage and necrosis of epithelial cells etc. In the case of chronic toxicity, severe symptoms are observed on the lungs fed secondary oxidation products. (H-E stain, ×40)

4) じん臓：Table-6 に示すように急性毒性時と症

Table-6 Histopathological observation in the kidneys of mice administered orally AOML-1 and AOML-2.

Group	Status	Glomerulus*1				Renal tubules*2							Hemorrhage
		Necrosis	Epithelial thickness of Bowman's capsule*3	Dilatation of Bowman's space*4	Congestive hyperemia*5	Necrosis	Pyknosis*6	Albuminuria cylinder*7	Dilatation of tubules*8	Vacuolic degeneration of proximal portion*9	Fatty degeneration of proximal portion*10	Hyaline droplet degeneration of epithelial cells*11	
Control	Survival	−	±	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
AOML-1	Death	+	−	++	++	+ ~ ±	+++	±	−	−	+	−	+
	Survival	±	−	−	−	±	−	−	−	−	±	−	−
AOML-2	Death	++	++	−	++	++	+++	++	++	++	+	+	++
	Survival	+	+	−	+	±	−	−	+	−	−	−	−

*1 糸球体 *2 尿細管 *3 ボウマンのう上皮肥厚 *4 ボウマンのうこう拡張 *5 充うっ血 *6 核濃縮 *7 タンパク性尿円柱 *8 尿細管拡張 *9 上部尿細管空胞変性 *10 上部尿細管脂肪変性 *11 硝子滴出現

状は類似していた。すなわち，糸球体の壊死と充血，尿細管の崩壊及び壊死．このほか主部尿細管の上皮細胞では硝子的変性が認められ主部尿細管の空胞形成と脂肪沈着が認められた。ボーマンのうこうの拡張と同上皮細胞の肥厚，拡張性の尿細管などがみられた (Fig.-4)。一方，生存マウスでは，対照群と同様異常を認めなかった。

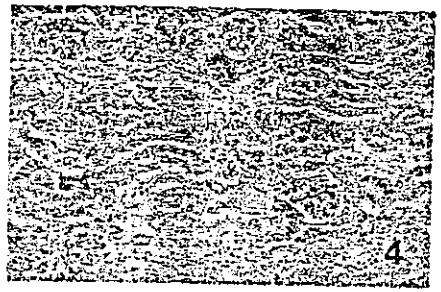


Fig.-4 Kidney in dead mouse with necrosis on the renal tubules and epithelial thickness of Bowmans' capsule etc. (H-E stain, ×100)

4 考 察

以上の結果から考察すると過酸化物及び二次酸化生成物の慢性毒性は一定量以上の長期投与によって出現し死亡マウスの小腸，肝，肺，じんの各組織には壊死と脂肪の沈着，血管の拡張，充うっ血及び出血などが共通にみられ，急性毒性時の症状と類似していたがその障害度は急性毒性以上であった。また，各組織に対する障害は AOML-2 の方が AOML-1 より顕著であった。しかし，一定量以下少量を長期間投与して生存したマウスの各組織には大きな変化を認めなかった。すなわち，慢性毒性は一定量以上を長期間投与することにより発現することから，毒性発現にはある barrier が存在することを認めた。著者らは前報[3]で急性毒性時の各組織における形態学的変化が少ない場合には可逆的なもので永続的後遺症を残さないが，症状がひどくなると不可逆的となり障害が顕著になることを認めている。一定量以上を長期間投与した場合，慢性毒性による障害がより顕著になるのは過酸化物及び二次酸化生成物は小腸から直接吸収され，各組織に運ばれ組織に蓄積されると思われる。金田ら[2]も過酸化物は一部小腸から吸収され各組織に蓄積されると報告している。

慢性毒性により死亡したマウスには急性毒性と同様に，小腸においてビロう毛の融解壊死が強く，壊死は粘膜下組織にまで及んでいた。肝臓での障害は AOML-2 投与群の方が顕著だったのは，二次酸化生成物は容易に吸収され大部分門脈から，直接肝臓に運ばれ体内に蓄積される量も多いためと思われる。AOML-2 は肺に対し血管の拡張，充うっ血，出血など血管系に強い障害を与えており，AOML-2 の肺に対する影響は急性毒性よりかなり強いといえるがこの違いの原因についてはなお明らかでない。

全体的にみた場合，慢性毒性は一定量以上を長期間投与することにより毒性が発現したことから，過酸化物及び二次酸化生成物は小腸から吸収されリンパ管から循環系に入り，または門脈系より各組織に運搬され一部は解毒されるが，解毒されない過酸化物及び二次酸化生成物は組織タンパク質と結合して組織に蓄積され細胞機能の低下ないし破壊により組織の障害が起こるものと推察された。また，この障害は循環系にまで及ぶと考えられた。

慢性毒性を病理組織学的にみると，程度の差はあるがいずれも急性毒性時と同様な症状を呈した。このことから，慢性毒性と急性毒性の毒性発現機構は同様と推察された。

5 要 約

過酸化物及び二次酸化生成物の一定量を長期間マウスに経口投与し，慢性毒性実験を行い，小腸，肝，肺，じんの各組織について病理組織学的に検討し，次の結果をえた。

1) 過酸化物及び二次酸化生成物の慢性毒性は一定量以上を長期間投与することにより発現したことから毒性発現にはある barrier が存在する。

2) 過酸化物及び二次酸化生成物による死亡マウスの小腸，肝，肺，じんなどの組織には急性毒性時の症状と同様，細胞壊死と脂肪沈着が共通にみられ，さらに各器官には血管の拡張と充うっ血，出血が認められた。これらの障害の程度は急性亜急性毒性時より一層顕著であった。このことから，慢性毒性は過酸化物及び二次酸化生成物が小腸から直接吸収され，各組織に運搬されそれが組織に蓄積した結果組織の障害が起こると推察された。

本研究を行うに当たり，組織学的研究に対し懇切な御指導をたまわった東北大学農学部畜産学科 農野忠彦助教授に厚く感謝の意を表します。 (昭和 53 年 4 月 17 日受理)

文 献

1) 白 台鴻，農野忠彦，金田尚志，栄養と食糧，29 (2)，85 (1976)
2) 金田尚志，石井清之助，酒井寿恵，荒井君枝，東海水研報，12，1~73 (1955)；日水誌，20，658 (1954)；武田茂，金田尚志，第 13 回油化学討論会 講演予稿集 p. 51 (1974)
3) M. Nakamura, H. Tanaka, Y. Hattori, M. Watanabe, *Lipids*, 8, 566 (1973)
4) 土田雅子，三浦利之，武藤 雄，宮本商明，油化学，22，259 (1973)
5) R. Cortesi, O.S. Privett, *Lipids*, 7, 715 (1972)
6) R.T. Holman, S.I. Greenberg, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 35, 707 (1958)

Vol. 29 No. 5 CONTENTS

REVIEWS

Takashi KANEDA : Recent Topics on Lipids Peroxides 295

Hiroyuki SHIMASAKI : Formation and Determination of Lipid Peroxides 301

Tetsuya NAKAMURA : Formation and Inhibition of Lipid Peroxides *in vivo* 309

Mitsuyosh MATSUO : Lipid Peroxides and Active Oxygen Species 316

Yoichiro TOTANI : Interactions berween Lipid Peroxides and Nitrogen Compounds 323

ORIGINALS

Yoshimasa WADA, Eiji KOMORI, Teruyuki KODAMA, Toshio YAMAKI, and Yasuzo UCHIDA : Biotransformation of 3-Methyl-2-buten-1-ol and 3-Methyl-3-buten-1-ol by the Suspension Cultures of *Glycine Max* 330

Hirobumi HIRATA, Satoshi NAKASATO, Katsuhiko HIGUCHI, Miyuki OKIMURA, and Toru SHIMADA : Synthesis of 2-Amino-1,3-alkanediols 336

Hyoji KUSAKA, Jun-ichi KAKIZAKI, Teruhiro SHINOZAKI, and Shizuyuki OHTA : On Functions of Silicone Oil in Frying Oil. II.-Antioxidative Effect of Silicone Oil on Autoxidation of Edible Oil 341

NOTES

Takashi IIDA, Toru ISHIKAWA, Toshitake TAMURA, and Taro MATSUMOTO : Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Evidence of Chondrillasterol Isolated from Gourd Seed Oil 345

Masahide TAKANASHI, Yasuomi TAKIZAWA, and Tatsuo MITSUHASHI : Sterol Compositions in Flower and Seed Oils of Solidago altissimaL 347

Shuichi MIYASHITA and Yuhei UZU : DTA Study of Hydrolytic Precipitates in Fatty Acid Soaps 350

Seiichi INOKUMA, Eiichi KAMEYAMA, Takao OHSAWA, and Tsunehiko KUWAMURA : Synthesis and Properties of Bis (aminimides) Containing Ether Linkages 354

SHORT REVIEW

Shin-ichi TOMIYAMA : 1976 World Production and Consumption, 1977 Western European Production and Consumption, 1978 Western European Production of Soaps, Detergents and Cleaning Compounds 356

LECTURE

Akira HAYASHI : Lipids (XVII) 363

ABSTRACTS 368

The Japan Oil Chemists' Society
YUSHI KOGYO KAIKAN, 13-11, Nihombashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103, JAPAN

総　説

過酸化脂質・最近の話題

金田尚志
東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通雨宮町 1-1)

Recent Topics on Lipid Peroxides

Takashi KANEDA
Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tohoku University (1-1, Amemiya-cho,
Tsutsumi-dori, Sendai)

筆者に与えられた題は他の4人の方々の内容と重複しそうである。それは，現在の過酸化脂質の研究方向は生体内過酸化脂質，つまり，成人病との関連において多く論じられており，本企画も題名から察すると，ねらいは同じように思われる。そのため，私としては益に書きにくいのだが，なるべく重複しないように心がけ，最近5年間ぐらいの過酸化脂質の研究について触れることにする。

1　脂質の自動酸化に関するもの

リノール酸メチルの自動酸化時には主として Table-1 のような4種のヒドロペルオキシド (HPO) を生成するが，Chan ら[1]は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により各 HPO を単離後，40℃, 16h 保つと，HPO の再配列がおこり，それぞれの HPO から新たな HPO を生成するという。

Table-1　Major isomeric hydroperoxides formed from autoxidized methyl linoleate.

I	Methyl 9-hydroperoxy-*trans*-10,*cis*-12-octadecadienoate
II	Methyl 9-hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-octadecadienoate
III	Methyl 13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate
IV	Methyl 13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoate

例えば，I の HPO より II～IV の HPO も生ずる。このことはシス-トランス異性体でなく，トランス-トランス異性体でも認められる。Chan らは HPO の再配列機構をより明らかにするため，トマトのリポキシダーゼを用い，$^{18}O_2$ を標識した I をつくり，40℃ に 24 h 保ったところ，異性体を生じ，その組成は I-37.5%, II-27.1%, III-6.7%, IV-28.7% となった。^{18}O- 異性体の割合は，I-81.8%, II-54.2%, III-56.4%, IV-53.9% で，残りは ^{18}O がついていた。この変化は再配列の際，空気中の三重項酸素と ^{18}O が入れ代わったものと想定している。

池田，福住ら[2]はシス及びトランス酸の酸化速度の比較を行っている。すなわち，オレイン酸及びエライジン酸の各メチルエステルの自動酸化速度を比較し，誘導期までは，オレイン酸はエライジン酸の 10.4 倍速く酸化すること，誘導期以降では 20 倍速やかであったとしている。また，リノール酸メチル及び *trans*-9, *trans*-12-オクタデカジエン酸メチルの場合は，前者が酸化しやすく，自動酸化に対する幾何異性体効果を認めている。オレイン酸，リノール酸，リノレン酸，$C_{20:2}+C_{22:2}$ 酸 (50 : 50) の各メチルの誘導期の比較からみた相対酸化速度は 1 : 8.0 : 21.7 : 39.10 であるという。また，*cis-trans* 及び *trans-trans* 共役オクデカジエン酸メチルの自動酸化においては，リノール酸メチルの自動酸化の場合のような明らかな誘導期が現れず，はじめから酸化が進行するが，誘導期後の酸化速度は小さいとした。しかし，酸化速度は小でもラジカルの生成速度は大で，また生成量も多いこと，共役ジエンの減少量が大で，孤立トランス二重結合形成が大なこと，HPO の形成は少ないこと，シス-トランス共役体はトランス-トランス共役体よりも自動酸化されやすいことなどを報告した。

2　ヒドロペルオキシドの分解

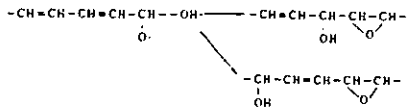
Selke, Frankel ら[3]はオレイン酸メチル HPO を加熱した際に生成する揮発性物質について検討している。この HPO は 8-HPO (27%), 9-HPO (23%), 10-HPO (23%), 11-HPO (27%) の混合物だが，これを GC-MS に直接注入し，19 余の主ピークを得ている。これらはヘプタン，オクタン，ヘプタナール，1-ヘプタノール，オクタナール，1-オクタノール，ノナナール，2-ノネナール，デカナール，2-デセナール，2-ウンデセナール，9-オキソノナン酸メチル，10-オクタデセン酸メチルなどを主とした。これら揮発物は，同氏らがさきに報

告した[9] トリオレイン酸化物の加熱により生成する揮発性物質と同様であった。

ヘム化合物による HPO の分解産物については従来，その詳細は不明だったが，ヘモグロビンによる分解について検討された。すなわち，Hamberg[10] は 13-L-ヒドロペルオキシ-9,11-オクタデカジエン酸をエタノールに溶かし，ヘモグロビンを加えて 37℃ に 5 min 保ち，生成物を分離したところ，主成分は 13-ケト-9,11-，13-L-ヒドロキシ-9,11-オクタデカジエン酸及び *erythro*-12,13-エポキシ-11-ヒドロキシ-9, *threo*-12,13-エポキシ-11-ヒドロキシ-9-，9-DL-12,13-エポキシ-ヒドロキシ-10-のオクタデセン酸をえた。このうち，13-オキソ-9,11-オクタデカジエン酸は下記のような経過で 13-ペルオキシラジカルから OH· が離れ 2-オキソ酸になるとした。

$$-\mathrm{CH}- \longrightarrow -\dot{\mathrm{C}}- \longrightarrow -\mathrm{C}-\!\!+\mathrm{OH}\cdot$$
$$\quad\dot{\mathrm{O}}\mathrm{O}\cdot \qquad\quad \dot{\mathrm{O}}\mathrm{OH} \qquad \mathrm{O}$$

エポキシ-ヒドロキシ-オクタデセン酸は下記のようにオキシラジカルをもったオクタデカジエン酸に対する OH· の付加と考えた。



エポキシドの生成については，Sevanian, Mead ら[11] も白ねずみの肺における生成を認めているが，これは 6.5 ppm の NO_2 をふくむ空気を白ねずみに 24 h 吸わせたとき肺組織に脂質エポキシドが生成したという。これは Hamberg の報告とは異なり，肺組織中のリノール酸にペルオキシラジカルを生じ，これが RO· に分解するとき隣接したリノール酸の二重結合がエポキシ化されるとしている。

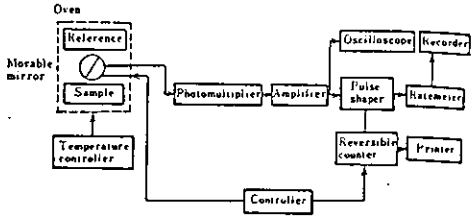


Fig.-1 Schematic diagram of the single photon counting system for the measurement of ultraweak chemiluminescence.

3 極微弱光計測による過酸化脂質の測定

ソ連の Vassilev ら[12] は 1962 年に，各種の有機化合物が酸化する際，極微弱光を発することを認めた。東北大電気通信研の稲葉教授らは 10^{-11} W という微弱光を検知する方法を開発した。すなわち，Fig.-1 に示すように，光電子増倍管 (photomultiplier) を用い，光電子計測方式により所定のゲートタイムにおける受光量を光電子パルス数として計測する方法である。

筆者らは本法を用いて各種食用油脂の劣化度と発光量の関係を検討した[13]。その結果，例えば，180℃ に加熱した大豆油の過酸化物価 (POV) 及びその他の化学特数と発光量の間には相関がみとめられた (Table-2)。また，室温で酸化した大豆油についても同様なことがいえた (Table-3)。即席ラーメン含有油脂の劣化程度もこの方法で求められるが，その際，ラーメンから油脂を抽出する必要はなく，砕いた試料粉末をそのまま使用できる。

筆者らはこの測定法を生体内過酸化脂質の測定に応用しようとしている。すなわち，老化に関する最近の研究によると，加令と過酸化脂質，あるいは生体内ラジカルとの関係が問題とされ，とくに一重項酸素やスーパーオ

Table-2 Chemiluminescence and chemical characteristics of thermally oxidized soybean oils with different heating times.

Heating time at 180℃ (h)	AV	POV	COV	IV	Conjugated unsaturated fatty acid (%)		Brown color*	Emission intensity (counts/32 s)
					Diene	Triene		
0	0.046	0.9	3	129	0.34	0.055	0.056	728
1	0.048	3.6	7	128	0.53	0.080	0.096	655
2	0.049	5.4	16	128	0.68	0.146	0.122	667
4	0.073	5.1	38	126	1.55	0.148	0.175	719
6	0.094	5.7	37	125	1.35	0.147	0.157	991
8	0.129	6.3	70	122	1.54	0.156	0.247	1361
14	0.309	8.1	87	120	1.90	0.128	0.404	2464
24	1.85	8.7	302	103	3.78	0.125	1.99	12193
32	2.01	9.6	304	96	4.45	0.116	4.41	22193

* Brown color was represented by the optical density of oils at 440 nm.

Table-3 Chemiluminescence of autoxidized soybean oils.

Period of autoxidation* (d)	POV	AV	Emission intensity (counts/32 s)
0	0.86	0.021	2,200
7	16.6	0.025	6,400
9	25.9	0.037	5,700
20	48.7	0.043	5,400
31	64.9	0.055	8,000
42	108.6	—	12,000

* At room temperature

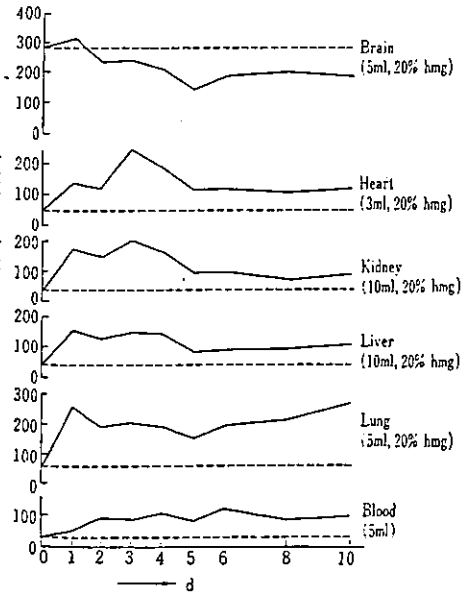
キシドアニオンなどの活性酸素が老化に強く関与しているとされる[9),10)]。従来，生体内過酸化脂質の定量や老化の判定には TBA 法が医学方面では多く用いられてきたが，定量結果は人により差を生じやすく，本法のみで生体老化度を判定するのは不充分といえる。そこで，生体に生成するであろう極微弱光を測定して老化度を判定しようとした。

まず，老化の際と同様，生体内の TBA 値が増加する自動酸化油 (POV 400) を白ねずみに 50% 致死量の 1/5 量，10 d 与え，体各部臓器の一般特数を測定するとともに発光量を測定した[13]。その結果，自動酸化油を与えると，白ねずみの各組織の TBA 値と POV は増加したが，とくに肺，脳，じん，心の TBA 値は顕著に増加した。また，POV は肺，じんでの増加がめだった。この際の発光量を示すと Fig.-2 のようである。すなわち，対照群に比べ，心，じん，肝，肺，血液などで発光量は増加した。一方，脳では減少が認められた。また，白ねずみに UV 照射を行ったところ，Table-4 のように，照射後の発光量は明らかに増加し，TBA 値との相関性もみとめられた。以上のように，生体内の発光量と過酸化脂質とは相関を有するように思われるので，老化と生体内発光の関係をより明らかにしようと目下研究中である。

Table-4 UV irradiation and the change of ultraweak chemiluminescence, TBA value in rat tissues.

Tissue	Irradiation	Chemiluminescence (count/30 s)	TBA value (O.D. 535 nm, $\times 10^{-2}$)
Plasma (5 ml)	Before	8	3.1
	After**	141	3.4
Liver*	Before	10	4.8
	After**	126	29.5
Lung*	Before	34	4.0
	After**	238	20.0
Heart*	Before	19	3.4
	After**	90	8.5
Kidney*	Before	64	4.7
	After**	87	21.0

* 5 ml, 10% homogenate.
** 90 h, 15 W.



——: Autoxidized oil fed rats, ---: Standard meal fed rats.

Fig.-2 Autoxidized oil feeding and the change of ultraweak chemiluminescence in rat tissues.

4 脂質過酸化物と毒性

筆者らは脂質過酸化物が毒性を呈することを 1953 年に報告したが，その後，各種二次酸化物とくに炭素数 5～9 のヒドロペルオキシアルケナールの毒性が強いことを認めた[14]。また，リノール酸メチル HPO のマウスに対する 50% 致死量も求めた[15]。さらにリノール酸メチル HPO の分解により生ずる各種酸化物の 50% 致死量を求め Table-5 のような結果を得ている。本結果によれば，二次分解物は飽和アルデヒドを除き，いずれも，HPO に比べはるかに強い毒性を示し，とくにヒドロペルオキシアルケナールは HPO の 100 倍にも及ぶ強い毒性を示した。

筆者らは，また，リノール酸メチル HPO 及びその分解物による毒性発生機構を解明するため，マウスを用い，急性及び慢性毒性試験を行い，臓器の病理組織学的検討を行った[16]。その結果，両酸化物を与えて死亡したマウスの小腸，肝，肺，じんなどの組織には細胞壊死が共通してみられ，脂肪沈着がおこっていた。また，いずれの器官にも血管の拡張と充うっ血が認められ，そ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。このことは各酸化物が小腸から吸収され，各組織に達し，障害をおこ

Table-5 Comparative LD_{50} of oxidation products formed in autoxidized methyl linoleate.

Compound	LD_{50} mmol/kg mice	LD_{50} mg/kg mice
n-Hexanal	82.79	8,292
trans-2-Hexenal	6.98	685.0
2-Hydoxyhexanal	5.15	598.2
4-Hydroperoxy-2-alkenals	0.45	as pentenal 32.5 as nonenal 77.5
Methyl linoleate hydroperoxide	39.10	12.760

すと思われた。

柴田，衣巻ら[11]はマウスに自動酸化サフラワー油 (POV 2000) を9か月間与えた際の血中グルコース量，肝トリグリセリド及びコレステロール量を定量したところ，対照の新鮮サフラワー油給与群との間に差を認めなかった。また，肝におけるグルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミラーゼ (GOT)，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ (GPT)，ATPase，α-グリセロリン酸脱水素酵素 (α-GPPH) などの活性も対照群と差がなかったという。

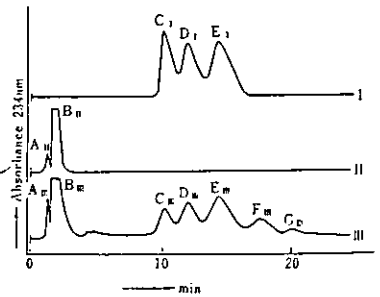
Budowski や Frankel ら[12]はサフラワー油を 145℃ で 24 h 加熱し鳥に与えると脳疾患 (Encephalopathy (NE)) を生じることを認めた。本油は新鮮油に比べリノール酸やビタミンEが少なかったが，このこと以外にも原因がありそうに思えた。合成オキソオクタデカン酸及びオキソデカジエン酸は鳥に NE をおこさせるが，加熱油より製した脂肪酸メチルの極性部分は NE の発生を促進した。このことより，加熱油中の共役ケトポリエン酸，または加熱により油中のビタミンEが少なくなり内因的に生成した同様ケト酸により NE を生ずるとしている。

5 不飽和酸ヒドロペルオキシドの腸管よりの吸収

脂質過酸化物は未変化の脂質に比べ栄養的に劣り，毒性さえも呈するが，この際の毒性発生機構については多くの報告が出されている。しかし，いちばんもとになる脂質過酸化物の腸における吸収形態については不明の点が多く，いろいろな仮説が出されている。すなわち，筆者らは 25 年も前から不飽和酸ヒドロペルオキシドの一部は分解されず，そのままの形で腸管を通過するとしていたが，他にも同様な見解が報告されている。しかし，脂質過酸化物を動物に与えてもリンパ中に過酸化物は見いだされず，過酸化物は腸壁で分解し，この分解物が腸管より吸収されて毒性を呈するとした報告も出された。ただし，この際，どのような形に分解され，吸収されるか知られていない。

Bergan ら[13]は 1-^{14}C-リノール酸メチル HPO をねずみに与え，リンパを集めて，脂質を検討したところ，ヒドロキシ酸を見いだしたが，ヒドロペルオキシドは存在しないとした。また，リンパトリグリセリドのトリエン酸に ^{14}C が取り込まれるとしている。そして，ヒドロキシ酸やトリエン酸は HPO の吸収の際，HPO の還元-脱水反応により生成すると述べている。

この報告が出されて以後，不飽和酸 HPO の吸収についてはあまり報告されていなかったが，筆者らはうさぎを用いて HPO の吸収形態を調べた[14]。すなわち，99.8% の純度のリノール酸メチル HPO を調製してうさぎに与え，リンパ液を集めて，含有脂質の高速液体クロマトグラフィーを行った。その結果，Fig.-3 に示すように，未変化の HPO が移行していることを突きとめた。また HPO はトリグリセリドにも取り込まれていた。この結果に基づき，筆者らは不飽和酸 HPO は吸収されにくいが，一部は未変化のままで吸収され，体各部において酵素の不活性化をおこし毒性を呈すると結論した。



Peak A and Peak B: Triglycerides and their related substance; Peak C: Methyl 13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate; Peak D: Methyl 13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoate; Peak E: Methyl 9-hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-octadecadienoate; Peak F and G: Derivatives of MLHPs which are not identified yet. MLHPs = methyl linoleate hydroperoxides.

Fig.-3 High performance liquid chromatography of original MLHPs (I), extracts from control lymph (II) and extracts from lymph of rabbit dosed MLHPs (III).

6 過酸化脂質と老化

生体内に生成する過酸化脂質と老化との関係について最近多くの研究が報告されるようになった[15)~22)]。

生体内過酸化脂質の老化への影響として各種酵素の不活性化が考えられるが，この反応機構が *in vivo* 及び *in vitro* で検討されている。また，組織中に生成する老化と関係のある色素の生成過程についても多くの報告がある。このほか，生体内脂質過酸化に関与する酸素の形

態についても報じられているので，そのうちのいくつかを紹介する。

生体に生じたスーパーオキシド $O_2\cdot^-$ は脂質過酸化に関与することが知られている。キサンチンのキサンチンオキシダーゼによる酸化により脂質は過酸化されるが，この際，Khan[23] によれば

$$2O_2\cdot^- + 2H^+ \longrightarrow {}^1O_2 + H_2O_2$$

のように一重項酸素を生じ，酸化されるという。また，Kellogg ら[24]は脂質過酸化は

$$O_2\cdot^- + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH\cdot + {}^1O_2$$

のようにして生じた $^1O_2$ によるとしている。

Svingen ら[25]は脂質過酸化におけるスーパーオキシドや一重項酸素の役割について検討し，キサンチンオキシダーゼにより触媒される脂質過酸化の機構はスーパーオキシド，一重項酸素，アデノシン 5'-ジホスホキレートイオン (ADP-Fe^{3+}) 依存性であり，ADP-Fe^{3+} がないときやスーパーオキシドディスムターゼの存在において，酵素的脂質過酸化は完全に阻害されることを認めた。また，一重項酸素のトラップ剤として 2,5-ジフェニルフランを用いたところ，一重項酸素は過酸化の開始には関与せず，むしろ，過酸化脂質の連鎖生成に関与していた。

生体内に生成する lipofuscins やセロイドとよばれるけい光を有する色素は Tappel ら[26)~33)]により多くの研究が行われ，その基本構造は

$$-N=\overset{1}{C}-\overset{2}{C}=\overset{3}{C}-N-$$

とされている。すなわち，脂質の過酸化により生じたマロンアルデヒドが2個の第一級アミンと結びつけし，共役シッフ塩を生じ，これがけい光発色団となるとされている[26]。Taubold ら[33]は人脳の lipofuscin を分け，その組成を検討し，重合脂質とアミノ酸または脂質またはタンパク質を含むリン脂質より成るとしている。

lipofuscin 色素はミトコンドリア，ミクロソーム，リゾソームなどで脂質過酸化により生成する。本色素のけい光発光極大は 420 から 470 nm に，励起極大は 340 から 370 nm にある[26),34),35)]。lipofuscin の定量に際してはレチノールのような妨害物質をあらかじめ除く必要があるが，Csallany ら[36]はセファデックス LH-20 のカラムを使い，組織のクロロホルム，メタノール抽出液からレチノールやより低分子のけい光物質を除いたのち定量を行っている。

脂質過酸化物とアミノ酸，タンパク質のラジカル反応についてはいくつかの報告があるが，Schaich ら[37]は酸化リノール酸メチルからアミノ酸，タンパク質への遊離基の移動をモデル系で検討している。すなわち，リシン，アルギニン，トリプトファン，システイン，還元型グルタチオンなどをリノール酸メチルと混合し，37℃ に 20 d 間保ち，ESR によるラジカルの測定をした結果，上記アミノ酸やグルタチオンにフリーラジカルのシグナルを生じた。本反応は次式のようにペルオキシラジカルやアルコキシルラジカルの連鎖生成の過程で，アミノ酸やタンパク質にラジカルが移行するためとしている。

$$LO_2\cdot + PH \longrightarrow P\cdot + LOOH$$
$$LO\cdot + PH \longrightarrow P\cdot + LOH$$

LOOH＝脂質 HPO，PH＝タンパク質

タンパク質中のアミノ酸残基のうち含硫アミノ酸は酸化に対し最も不安定とされ，SH-酵素は脂質過酸化物により容易に不活性化される。SH 基をもつタンパク質を脂質過酸化物にさらすと thiyl ラジカルを生ずる[38]。また，システインを含めチオール類は脂質過酸化物によりジスルフィドにまで酸化される[39]。この際，遷移金属や含金属タンパク質は酸化を促進する[40),41)]。

リノール酸 HPO とシステインの鉄イオン触媒による反応生成物については多くの知見がえられているが，Gardner[42] は Fe^{2+}-Fe^{3+} の酸化還元系におけるラジカルによりシステインから thiyl ラジカルを生じ，RO・が HPO より生ずるとしている。また，80% エタノール中でリノール酸 HPO に *N*-アセチルシステインと鉄イオンを加えると，チオール結合の生成を認めている。すなわち，13-ヒドロペルオキシ-*trans*-11, -*cis* 9-オクタデカジエン酸と *N*-アセチルシステインより 9-*S*-(*N*-acetyl cysteine)-10-ethoxy-13-hydroxy-*trans*-11-octadecenoic acid などが生成するという。

生体内における過酸化脂質とタンパク質の反応を解明するため過酸化リン脂質を用いた実験もある。Nielsen[43] はカルジオリピンの懸濁液をワールブルグ検圧計フラスコに入れ，Cu^{2+} の存在下に 30℃，120 h 酸化させ，各段階の酸化物にアルブミンを加えてインキュベートしたところ両者間に共有結合がみられた。15 mol までのカルジオリピンは 1 mol のアルブミンに結合するが，重合反応はおこらなかった。また 20~25 mol 程度までカルジオリピンを増すとわずか重合がおこり，314 mol にすると重合がおこった。このことは，過酸化カルジオリピンとアルブミンの結合はタンパク質の分子内橋かけなしにおこることを示唆した。

Sundholm ら[44]は酸化脂質存在下でのコラーゲンの橋かけを検討するため，ゼラチン膜にとうもろこし油を加え，UV 及び日光照射したところ，コラーゲンの橋かけ反応を認めたが，本反応は添加脂質の酸化により生じたカルボニル化合物とアミノ酸の縮合によると推定している。

Matsushita らは脂質過酸化物及び二次分解物の酵素に対する作用をいくつか報告している。すなわち，リノール酸メチル HPO は RNase を不活性化するが，この際本 HPO は RNase 中へ取り込まれる。HPO の二次

酸化物による RNase の不活性化はリノール酸 HPO ほどではなかった。しかし，トリプシンに対しては不活性化を示した。ペプシンに対しては活性化の傾向を示した[41]。ペプシンに対する作用は筆者らも認めているが[42]，どうして，ペプシンの場合のみ，不活性化されぬばかりでなく，逆に活性化されるのかなお不明であり，今後のおもしろい研究題目となるだろう。

はじめに述べたように，過酸化脂質の研究方向は主として生体内脂質の過酸化に関する問題及び各種疾病との関係に向けられており，この分野の研究は今後，益々発展すると思われる。

(昭和 55 年 3 月 3 日受理)

文 献

1) H.S. Chan, G. Levett, J.A. Matthew, *Chemistry and Physics of lipids*, 24, 245 (1979)
2) 池田辰雄，福住一雄，油化学，27，21，26，33 (1978)
3) E. Selke, E.N. Frankel, W.E. Neff, *Lipids*, 13, 511 (1978)
4) E. Selke, W.K. Rohwedder, H.J. Dutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 62 (1977)
5) M. Hamberg, *Lipids*, 10, 87 (1975)
6) A. Sevanian, J.F. Mead, R.A. Stein, *Lipids*, 14, 634 (1979)
7) R.F. Vassilev, A.A. Vichutinskii, *Nature*, 194, 1276 (1962)
8) R. Usuki, T. Kaneda, A. Yamagishi, C. Takyu, H.Inaba, *J. Food Sci.*, 44, 1573 (1979)
9) 平井俊策，代謝，15，1329 (1978)
10) 八木国夫，老年医学，16，1327 (1978)
11) 宮沢陽夫，金田尚志，脂質生化学研究，21，366 (1979)
12) 吉岡優子，鈴木勝久，金田尚志，油化学，21，881 (1972)
13) 吉岡優子，金田尚志，油化学，23，321 (1974)
14) L.R. Tovar G, T. Kaneda, 油化学，26，169 (1977)
15) 白 台鴻，豊野忠彦，金田尚志，栄養と食糧，29，85 (1976)；31，651 (1978)
16) 柴田宣和，衣巻豊輔，油化学，26，529 (1977)
17) P. Budowski, I. Bartov, Y. Dror, E.N. Frankel, *Lipids*, 14, 768 (1979)
18) G.M. Findlay, H.H. Draper, J.G. Bergan, *Lipids* 5, 970, 976 (1970)
19) K. Nakatsugawa and T. Kaneda, Joint Meeting of Am. Oil Chem. Soc. and Japan Oil Chem. Soc. April, 1979, San Francisco
20) 最新医学，特集 過酸化脂質障害の再検討，33，No. 4 (1978)
21) 老年医学，特集 老年者と過酸化脂質，16，No. 11 (1979)
22) ビタミン，特集 過酸化脂質とビタミン，53，No. 12 (1979)
23) A.U. Khan, *Science*, 168, 476 (1970)
24) E.W. Kellogg, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 250, 8812 (1975)
25) B.A. Svingen, F.O. O'Neal, S.D. Aust, *Photochemistry and Photobiology*, 28, 803 (1978)
26) C.J. Dillard, A.L. Tappel, *Lipids*, 5, 715 (1971)
27) C.J. Dillard, A.L. Tappel, *Lipids*, 8, 183 (1973)
28) V.G. Malshet, A.L. Tappel, *Lipids*, 8, 194 (1973)
29) U. Reiss, A.L. Tappel, *Lipids*, 8, 199 (1973)
30) W. Bidlack, A.L. Tappel, *Lipids*, 8, 203 (1973)
31) K.S. Chio, U. Reiss, B. Fletcher, A.L. Tappel, *Science*, 166, 1535 (1969)
32) B.L. Fletcher, C.J. Dillard, A.L. Tappel, *Anal. Biochem.*, 52, 1 (1973)
33) K.S. Chio, A.L. Tappel, *Biochemistry*, 8, 2821 (1969)
34) R. Trombly, A.L. Tappel, *Lipids*, 10, 441 (1975)
35) R.D. Taubold, A.N. Siakotos, E.G. Perkins, *Lipids*, 10, 383 (1975)
36) B.L. Fletcher, C.J. Dilland, A.L. Tappel, *Anal. Biochem.*, 52, 1 (1973)
37) K. Reddy, B. Fletcher, A.L. Tappel, *J. Nutrition*, 103, 908 (1973)
38) A.S. Csallany, K.L. Ayaz, *Lipids*, 11, 412(1976)
39) K.M. Schaich, M. Karel, *Lipids*, 11, 392 (1976)
40) M. Karel, K. Schaich, R.B. Roy, *J. Agri. Food Chem.*, 23, 159 (1975)
41) W.T. Roubal, A.L. Tappel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 113, 5 (1966)
42) C. Little, P.J. O'Brien, *Biochem. J.*, 106, 419 (1968)
43) P.J. O'Brien, *Can. J. Biochem.* 47, 485 (1969)
44) H.W. Gardner, *J. Agri. Food Chemi.*, 23, 129 (1975)
45) H.W. Gardner, D. Weisleder, R. Kleiman, *Lipids*, 11, 127 (1976)
46) H. Nielsen, *Lipids*, 13, 253 (1978)
47) F. Sundholm, A. Visapää, J. Björksten, *Lipids*, 13, 755 (1978)
48) S. Matsushita, *J. Agri. Food Chem.*, 23, 151 (1975)

過酸化脂質の生成と分析

島 崎 弘 幸

帝京大学医学部第一生化学教室 (東京都板橋区加賀2-11-1)

Formation and Determination of Lipid Peroxides

Hiroyuki SHIMASAKI

Department of Biochemistry, School of Medicine, Teikyo University (2-11-1, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo)

1 はじめに

過酸化脂質の生体機序は，Farmer, Bolland, Gee らを中心とした，1940 年代の研究を Holman[1]，Uri[2]，Lundberg[3] らが総説にまとめ，一応の完成をみたものと思う。金田[4] はその理論も細部には不明りょうな問題点を残すと指摘しているが，今のところこれに代わる新しい理論はみられない。今日，過酸化脂質の生成が新たに注目されるのは，1969 年の Superoxide dismutase[5] の発見と，1974 年の血小板リポキシゲナーゼ[6] の発見で代表される，生体内の過酸化脂質の生成と消去に関するものであろう。本項では古典的な過酸化脂質の生成理論を基に，今日注目されている生体での過酸化脂質の生成と分析について，研究の現状を紹介する。

2 過酸化脂質の生成機序 I (自動酸化)

2・1 過酸化脂質の定義

過酸化脂質の定義は金田[4] に従い，「過酸化物 (peroxide) を含む脂質」とする。また，ここでは特に断らないかぎり，過酸化脂質はヒドロペルオキシド (-OOH) の結合した脂肪酸，又は脂質に用いた。

主な略号は次のようにした。ROOH：過酸化脂質，LOOH：リノール酸ヒドロペルオキシド，MLH：リノール酸メチルヒドロペルオキシド，R・：脂肪酸から水素原子が離脱してできたラジカル，又は同脂質，PUFA：高度不飽和脂肪酸，PG：プロスタグランジン，PGG_2：プロスタグランジンG_2，ADP：アデノシンジホスフェート，NADPH：nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (還元型)，$NADP^+$：同 (酸化型)。EDTA：エチレンジアミン四酢酸。

2・2 油脂の自動酸化

油脂の自動酸化 (autoxidation) は自触媒で進行するラジカル連鎖反応であり，理想的な条件下での過酸化脂質の生成は 図-1a のように表される[7]。反応の初期は誘導期 (induction period) と呼ばれ，過酸化脂質の生成は非常にゆっくり進む。誘導期を過ぎると過酸化脂質は急激に増加し，その過程は自触媒 (autocatalysis) で進行するラジカル連鎖反応 (propagation) と呼ばれる。一般に油脂の自動酸化は次のように説明される[7,8]。

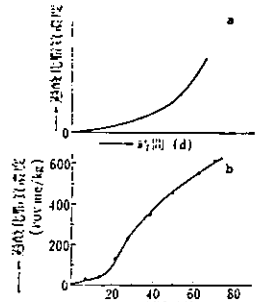


図-1 a. 典型的な油脂の自動酸化[7]と b. 実測例 (筆者ら，未発表)

① Initiation (反応開始)

$$RH \longrightarrow R\cdot + H\cdot$$

②Propagation (反応連鎖)

$$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$$

$$ROO\cdot - RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$$

③ Termination (反応停止)

$$R\cdot + R\cdot \longrightarrow RR$$

$$R\cdot + ROO\cdot \longrightarrow ROOR$$

$$ROO\cdot - ROO\cdot \longrightarrow ROOR + O_2$$

①不飽和脂肪酸から水素原子が引き抜かれ，ラジカルが生成する。②R・ ラジカルは酸素と結合してペルオキシラジカル (ROO・) となり，他の脂肪酸から水素を引き抜いてヒドロペルオキシド (ROOH) となる。他方，水素を失った脂肪酸は，新しい R・ ラジカルとして再び

qualities of crackers produced with good hydrogenated shortenings.

Oat flour and oat flour extracts were found to have but a slight favorable effect on the keeping qualities of crackers (Triebold, 1938). The oat flour and extracts were added to the cracker sponge, in doughing up the sponge, or sprayed or dusted upon the baked crackers. A protective factor from 0 to 2, which for all practical purposes is negligible, was exerted by the various treatments.

Lundberg, Halvorson, and Burr (1944) found that NDGA (nordihydroguaiaretic acid) when added to a lard used in making pie crusts and soda crackers exerted some stabilizing effect on the resulting product (protective factor of approximately 2 in crackers and 10 in pie crusts). The lesser effectiveness of the NDGA in crackers was thought to be due to the alkalinity imparted by the baking soda since alkaline solutions of NDGA oxidize rapidly when exposed to air.

Higgins and Black (1944) studied the effect of several antioxidants added to lard used in the preparation of crackers. They found gum guaiac to be an effective antioxidant for lard with the stability carrying over into the baked product (protective factors of 2.5-7, depending upon concentration). Propylgallate exerted a stabilizing effect on the lard but practically none on the resulting crackers. The same was also true for the tocopherols and for a wheat germ oil derivative (an ethylene dichloride extract of wheat germ oil combined with citric acid).

Mixing, Fermentation and Baking. These manipulative procedures involved in the manufacture of baked goods likely play a role in the keeping quality of the resulting product. This has been referred to previously in the destruction of pro-oxidants and antioxidants present in a fat when baked into crackers. Mixing spreads the fat over a greater area and also in the presence of salt may cause the solution of certain fat components into the aqueous phase, thereby facilitating their oxidation later. Fermentation produces sugars and organic acids, and these may have an effect upon the stability of the shortening.

The temperature and length of baking time might be anticipated to have an effect on the stability of the fat in baked products. Apparently as long as there is sufficient moisture present so that the product does not scorch, the effect is not great. However, crackers with scorched spots or crackers that have been crisped by successive reheatings show a marked decrease in keeping quality.

Packaging. The possibility of the absorption of fat from a baked product by the package must not be overlooked. The lining of cracker packages with grease-proof paper has helped greatly. However, some baked products are packaged in cardboard boxes. In such packages the fat may be absorbed rapidly by the cardboard, thereby spread over a large surface, and consequently undergoes rapid oxidation. This emphasizes the need for proper packaging to insure a good keeping quality product.

Several patents have been taken out on the impregnation of cardboard packages and wrappers with antioxidants and these are used to some extent. In certain instances these have proved helpful in retarding spoilage of the products contained, while in other instances they have been ineffective.

The use of colored glass to cut out the blue and ultraviolet rays of light was suggested by Burr (1907) as a means of protecting dairy products from oxidative deterioration. This has led to the development and effective use of colored cellophanes for packaging food products that will be exposed to light when merchandized.

Summary. In summarizing, it would appear that effects on the stability of cereal products to oxidative deterioration by formula components as well as methods of processing, are not understood to the degree that they should be and that there is a great need for studies along these lines.

REFERENCES

1. Bohn, R. M., and Olson, R. S., Oil and Soap *11*, 210 (1934).
2. Burr, A., Illust. Landw. Ztg. *27*, 274 (Abst. in Chem. Abs. 1, 1679, 1907).
3. Carlin, G. T., and Lannerud, E., Oil and Soap *18*, 60 (1941).
4. Elder, L. W., Jr., Oil and Soap *18*, 88 (1941).
5. Fine, M. S., and Olsen, A. G., Ind. Eng. Chem. *20*, 652 (1928).
6. Higgins, J. W., and Black, H. C., Oil and Soap *21*, 277 (1944).
7. Holm, G. E., and Greenbank, G. R., Ind. Eng. Chem. *16*, 598 (1924).
8. Lundberg, W. O., Halvorson, H. O., and Burr, G. O., Oil and Soap *21*, 33 (1944).
9. McKinney, R. H., and Bailey, A. E., Oil and Soap *18*, 147 (1941).
10. Triebold, H. O., Cereal Chem. *8*, 518 (1931).
11. Triebold, H. O., and Bailey, C. H., Cereal Chem. *9*, 50 (1932-a).
12. Triebold, H. O., and Bailey, C. H., Cereal Chem. *9*, 91 (1932-b).
13. Triebold, H. O., Webb, R. E., and Rudy, W. J., Cereal Chem. *10*, 263 (1933).
14. Triebold, H. O., Food Ind. *10*, 71 (1938).
15. Wilder, H. K., and Lindow, C. W., U. S. Patent 2,093,260 (Sept. 14, 1937).

Toxicity of Rancid Fats*

F. W. QUACKENBUSH
Purdue University, Lafayette, Ind.

THE scientific literature contains a number of reports of malnutrition resulting from rancid dietary fat. The symptoms include ophthalmia, gastric papillomatosis, and other digestive disturbances, reproductive failure, anemia, dermatitis, and cancer. In some cases the symptoms have been attributable to known deficiencies. Some others are not so readily explained even in terms of present knowledge. Whether rancid fats exert a direct toxic action is also uncertain.

First, I should like to discuss briefly some effects which oxidized fats are known to produce through the oxidation of dietary essentials, especially the vitamins. The five fat-soluble dietary essentials, linoleic acid, tocopherol, vitamins A, D and K, are susceptible, though not equally so, to oxidation. Tocopherol and vitamin A are the least resistant, and their oxidation is accelerated by the peroxides of linoleic acid. It has long been recognized that dry foods or food materials containing them lose their potency on continued exposure to air. Recently it has been shown (1, 2) that even when these materials are fed in fresh condition, they may lose potency in the digestive tract before absorption. Carotene fed in linoleic ester was found ineffective unless fed with tocopherol. Undoubtedly, the tocopherol itself was partially inactivated in protecting the carotene from oxidation. Water-soluble antioxidants such as hydroquinone were ineffective in the tract.

The loss of dietary essentials through oxidation by rancid fat is not confined to those which are fat-soluble. Some of the water-soluble vitamins are known to be inactivated as well. Biotin has been shown to be destroyed by oxidized fat (3), and ascorbic acid may be oxidized to some extent in performing its synergistic role with antioxidants of the phenolic type (4). Not nearly enough work has been done to establish the effects of rancid fat on other B-vitamins, either directly or through an influence on the microflora which produce vitamins in the intestinal tract.

So much for effects on known dietary essentials. The symptoms which result from the individual deficiencies are well known, and many of them have been observed in animals on rancid diets.

Secondly, I should like to review briefly some of the symptoms which have been observed on rancid diets but which were not readily attributable to known deficiencies. One of these is anemia. Gyorgi et al. (5) fed rats a synthetic diet containing thiamin, riboflavin, pyridoxine, pantothenic acid, and 16% of crude linoleic acid. The rats lost weight, developed an anemia of the secondary type, and a leucopenia. The condition was prevented by the addition of yeast to the diet.

Burr and Barnes (6) fed a synthetic diet containing lard, cod liver oil, and wheat germ oil and found that rats lost weight and died. Even when the cod liver oil was fed separately from the rancid lard diet the animals lost weight and became anemic, and their white and red blood cell count fell. Vitamin A deficiency was ruled out since the livers of these animals contained normal amounts. Yeast prevented the anemia. Since yeast also prevented the development of rancidity in the diet, its effect was attributed to its antioxidant activity. It was suggested that the rancid fat exerted a direct toxic action. A study of the relationship to certain B-vitamins might be worthwhile in this connection.

Dermatitis is another symptom sometimes reported to occur on rancid diets. Whipple (7) fed four dogs a diet containing 25% rancid lard and produced an "oxidized fat syndrome." The symptoms were loss of hair, skin lesions, emaciation, intestinal hemorrhage, and death. Three dogs on fresh fat all remained normal. Since the dermal symptoms resembled those of linoleic acid deficiency in rats, the probable cause was believed to be destruction of the unsaturated fat linkages. Similar symptoms were subsequently (8) produced in rats on a low fat diet. Ether-extracted yeast was fed as a separate supplement. The rats which were fed .10 cc. daily of oxidized lard (per. no. 15 to 20) lost weight, lost hair, and developed scaly legs and later edematous swelling of lips and paws. The symptoms were similar to those later described as acrodynia. Increasing the lard supplement to .20 cc. did not cure but hastened death. On the other hand, increasing the yeast supplement caused the animals to resume their previous rate of growth.

In our studies (9) on acrodynia, several highly oxidized fats (per. no. 300 to 400) were tested for curative properties. The only B-vitamins contained in the basal diet were thiamin and riboflavin. Ten mg. daily of linoleic ester effected permanent cures. Twenty mg. of oxidized wheat germ oil or corn oil likewise effected prompt cures; however, many of these were followed by relapse and death two or three weeks later. Increased supplements of rancid fat intensified the symptoms and hastened death. In view of these observations and the comparatively low degree of oxidation of the lard used by Whipple, it seems doubtful that linoleic deficiency caused the death of her dogs and rats. Apparently the rancid lard exerted some other effects.

Some attention has been given to reproductive failure as one of the symptoms caused by rancid dietary fat. Kudrjashov (10) reported a direct toxic effect on the fetus during pregnancy and in some cases the prevention of implantation of the fertilized egg. Pregnant rats fed rancid fats resorbed their fetuses on the 6th to 9th day, not because of vitamin E deficiency but because of toxic decomposition products in the fat. These were believed to be higher aldehydes and ketones. Others (11) have reported degenerative changes in the testicles of rats which were fed 10 to 25% rancid fat in addition to a diet containing ample vitamin E. On the other hand, Mattill and his coworkers (12) found that rancid fats and their degradation products did not interrupt pregnancy in rats. Litters were born normally unless the doses were large enough to produce systemic intoxication in the mother. However, mortality of the young was high.

Finally, mention should be made of the alleged carcinogenic properties of rancid fats. Roffo (13) has reported that olive oil or animal fats which had been oxidized by heating tended to produce cancer when fed to rats. He pointed out that the spectral characteristics of the heated fats resembled those of carcinogenic phenathrene derivatives. Lavik and Bauman (14) found that high fat diets increased tumor formation on the skin of rats which had been painted with methyl cholanthrene. The action of fat was increased by heating one hour at 300° C. Prolonged heating had no further effect. The carcinogenic effect of fats was found to be at least partly due to an increased caloric intake. Apparently it was not related to rancidity since fats rancidified by treatment with ultraviolet light or copper oleate were not more carcinogenic than fresh fats.

In summary, it is evident that one of the chief adverse effects of rancid fat is the destruction of vitamins and other dietary essentials. However, some symptoms which have been observed and confirmed are not readily explained in such terms. These include certain types of anemia, dermatitis, and reproductive failure. It is probable that further work will provide additional specific instances in which rancid fat exerts its effect through inactivation of dietary essentials. However, until such experimental evidence provides the full explanation, it must be assumed that rancid fats are able to exert a direct toxic effect.

REFERENCES

1. Quackenbush, F. W., Cox, R. P., and Steenbock, H.—J. Biol. Chem. *145*, 169 (1942); *140*, civ (1941).
2. Sherman, W. C.—J. Nutrition *22*, 153 (1941).
3. Pavcek, P. L., and Shull, G. M.—J. Biol. Chem. *146*, 351 (1942).
4. Columbic, C., and Mattill, H. A.—J. Am. Chem. Soc. *63*, 1279 (1941).
5. Gyorgi, P., Tomarelli, R., Ostergard, R. P., and Brown, J. B.—J. Exp. Med. *76*, 413 (1942).
6. Burr, G. O., and Barnes, R. H.—Physiol. Rev. *23*, 268 (1943).
7. Whipple, D. V.—Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. *30*, 319 (1932).
8. Whipple, D. V.—Oil and Soap *10*, 228 (1933).

* Presented at the Conference on Problems Related to Fat Deterioration in Foods, under the auspices of Committee on Food Research, Research and Development Branch, Military Training Division, Office of the Quartermaster General, in Washington, June 1945.

9. Quackenbush, F. W., Steenbock, H., Kummerow, F. A., and Platz, B. E.—J. Nutrition *24*, 225 (1942).
Quackenbush, F. W. and Cox, R. P.—Unpublished.
10. Kudrinshov, B. A.—Arch. Exp. Path. Pharm. *169*, 275 (1933).
11. Kolodziejska, Z., and Duszynska, J.—Acta Biol. Expil. (Warsaw) *13*, 10 (1939). Chem. Abs. *36*, 7085.
12. Deatherage, F. E., McConnell, K. P., and Mattill, H. A.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *46*, 399 (1941).
13. Roffo, A. H.—Prensa méd. argent. *26*, 619 (1939). Chem. Abs. *37*, 2065.
14. Lavik, P. S., and Baumann, C. A.—Cancer Research *1*, 151 (1941), ibid. *3*, 749 (1943).

A Volumetric and a Weighing Method for Measuring Semi-Micro Oil Samples*

RUSSELL O. SINNHUBER
Seafoods Laboratory, Oregon Agricultural Experiment Station
and
J. G. RUGGLES
Bioproducts, Oregon Ltd.
Astoria, Oregon

DURING several years of spectrophotometric vitamin A assay and plant testing of the liver reduction process two methods for measuring semi-micro oil samples have been developed which have served almost all laboratory and plant requirements. The volumetric procedure described below enables the analyst rapidly to test vitamin A bearing oils for routine control work. The volumetric method also has been of value in conducting vitamin A stability tests on oils during storage. The weighing procedure described has been used as an accurate and rapid method in the quantitative estimation of vitamin A in fish liver oils and concentrates.

Volumetric Method: This procedure is suitable for routine use in vitamin A liver processing plants. Blood pipettes commonly in use for red and white cell counts are employed. The red cell type holds approximately 9 mg. of oil and the white cell type approximately 26 mg. of oil. The pipettes are standardized by weighing them filled to the mark below the bulb with the oil commonly being analyzed. In the assaying procedure the pipette is filled to the mark with the oil, and the tip is wiped carefully with a cleansing tissue or towel. The filled pipette is then attached to a siphon containing the desired solvent, and the sample is washed thoroughly into a volumetric flask. The pipette may then be cleaned with petroleum ether and dried with suction. Acetone should not be used since it may dissolve the mixing bead.

Weighing Method: In vitamin A assay, a simple method of weighing small oil samples is that of using a micro cover glass. The square cover slip, which has been cut into halves or thirds by using the edge of a carborundum pencil or stone, is suitable as long as it will easily slip through the neck of the volumetric flask. The cut cover slip will weigh approximately 100 mg. With the aid of a small glass rod, samples of oil from 10 to 30 mgs. may be transferred to the slip and weighed. With forceps the slip with oil is dropped into a volumetric flask, which contains a small amount of suitable solvent. The flask is swirled for a few seconds until all visible oil is dissolved then made up to volume and mixed. This technique eliminates the washing error that may be inherent in some oil weighing methods since fish liver oils frequently vary as regards their solubility, e.g. in isopropanol. The error involved in using the cover slip procedure is roughly plus 0.04% in 100 ml. and is of little concern in the present vitamin A assay.

* * *

THE foregoing note by Sinnhuber and Ruggles was shown before publication to the members of the Vitamin Committee of the American Oil Chemists' Society, and two of them made further suggestions.

For field use, when samples of 100 to 500 mg. are needed, we have satisfactorily employed a calibrated 0.5 cc. tuberculin syringe. The conventional weighing of a sample of a vitamin A oil in a volumetric flask can be somewhat simplified by adjusting the length of brass jack chain (used to secure the stopper to the volumetric flask used for the primary dilution) so that the tare is always within + 100 mg. of an even gram. This permits the tare to be obtained on a chainomatic balance without the use of the weight on the notched beam and simplifies somewhat the manipulation and arithmetic involved. A small card in the balance case giving flask numbers and tare weights also facilitates the weighing of the sample.

T. D. SANFORD
F. E. Booth Company, Inc.
San Francisco 11, California

* * *

A useful and accurate method for weighing semi-micro samples is the following, which was suggested by Dr. K. C. D. Hickman in 1935, and has since been used for rapid tests as well as exact control work:

The carrier for the oil is a light gauge nichrome wire about three inches long bearing a loop on one end and on the other a helix consisting of five or six turns ⅛" in diameter and spaced about ¼" apart. The coil is dipped into the oil sample to pick up a 20 to 40 mg. drop. To be weighed, the carrier is then hung by the loop on a balance. The drop of oil is rinsed off into the volumetric flask, or the whole carrier may be dropped in before the flask is filled with solvent. Very rapid weighings can be made with the use of a Roller-Smith 125 mg. torsion balance with counterweight.

NORRIS EMBREE
Distillation Products, Inc.
Rochester 13, New York

*Published as Technical Paper No. 467 with the approval of the Director of the Oregon Agricultural Experiment Station. Contribution of the Department of Food Industries through the Seafoods Laboratory.

Abstracts

Oils and Fats

Edited by
M. M. PISKUR and SARAH HICKS

SOLVENT EXTRACTION OF COTTONSEED AND PEANUT OILS. BOILING POINT-VAPOR PRESSURE-COMPOSITION RELATIONS FOR MISCELLAS OF OILS IN HEXANE. E. F. Pollard, H. L. E. Vix and E. A. Gastrock. *Ind. Eng. Chem. 37*, 1022-6 (1945). The boiling points and densities of mixtures of cottonseed and peanut oils with commercial hexane are reported. They are useful in the design of vacuum evaporators and strippers and for control operations involving temperature, time of heating, and concentration of oil-solvent mixtures of various compositions, to prevent or minimize fixation of objectionable coloring matter or other deteriorative heat effects.

THE DETERMINATION OF FAT IN MIXTURES CONTAINING FATTY ACIDS, AND THE DETERMINATION OF UNSAPONIFIABLE MATTER IN OILS AND FATS. N. D. Sylvester, A. N. Ainsworth and E. B. Hughes. *Analyst 70*, 295-8 (1945). The method depends on adsorbing the free fat acids on Al_2O_3 in an adsorption column. With oils free fat acids are removed from glycerides and unsaponifiable. When the glycerides are saponified, and the acid freed with acid, the acids can be removed from the unsaponifiable by the process.

SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES OF THE OXIDATION OF FATS. V. THE COLOR OF OXIDIZED FATS IN ALCOHOLIC ALKALI. R. T. Holman, W. O. Lundberg and G. O. Burr. *J. Am. Chem. Soc. 67*, 1669-72 (1945). The ultraviolet absorption spectra of diacetyl, acetylpropionyl, 9,10-diketostearic acid, *p*-xyloquinone, duroquinone, diduroquinone, chroman-5,6-quinone, and rancid lard have been determined and compared with their spectra in alkaline solution. Diketostearic acid in alkali may give rise to a quinone homologous to duroquinone. The alcoholic alkali color of rancid fats is probably not due to the formation of *p*-quinones from α-dicarbonyl compounds formed during the oxidation of the fat. The alcoholic alkali color is only to a very small extent due to chroman-5,6-quinone derived from tocopherol or its degradation products in alkali. The alcoholic alkali color may to an appreciable extent be due to compounds derived from the unsaturated fatty acids which are closely related to the compounds obtained from chroman-5,6-quinone by treatment with alkali. The alcoholic alkali color may largely result from other unsaturated carbonyl compounds which are oxidation products of unsaturated fatty acids.

FLAVOR REVERSION IN HYDROGENATED LINSEED OIL. II. EFFECT OF VARIATIONS IN PROCESSING PROCEDURES. H. W. Lemon, A. Lips and W. H. White. *Can. J. Res. 23F*, 295-303 (1945). Shortenings prepared from various linseed oils by different methods were stored at 43.3° and sampled at 8-week intervals for 56 weeks. Storage life in terms of flavor reversion was not highly correlated with mean peroxide value or unsaturation. All shortenings were resistant to normal oxidation, but unstable to reversion unless hydrogenated to a very low I number. Hot and cold pressed oils yielded products equally susceptible to flavor reversion. Changes in stability attributable to variations in methods of alkali refining, bleaching, and hydrogenation were only minor. High alkali concentrations (30-40° Bé) were beneficial, while hydrogenation at 190° was preferable to hardening at lower temperatures (140° and 115°). Blending with other vegetable oils, or the use of hydroquinone or a wheat-germ oil preparation as antioxidants, slightly retarded the onset of reversion. None of the laboratory or commercially prepared samples examined was considered to be a satisfactory stable product.

CORROSION OF LEAD BY OXIDIZING AGENTS AND LAURIC ACID IN HYDROCARBON SOLVENTS. C. F. Prutton, D. Turnbull and D. R. Frey. *Ind. Eng. Chem. 37*, 917-24 (1945). Corrosion of lead by an acyl peroxide is independent of acid concentration down to concentrations as low as 10^{-3} mole of acid per liter and is determined only by peroxide concentration. Detailed studies of the mechanism of reaction of quinone and lauric acid with Pb in benzene at 70° showed that at reactant concentrations below 0.05 mole per liter the reaction is second order, and the rate is proportional to the concentration of both quinone and lauric acid. Further, Pb laurate had a pronounced catalytic effect upon the rate of this reaction. For hydroperoxides and O_2 it is probable that $Pb(OH)_2$ or PbO is intermediate in the corrosion process. At low temperatures insoluble soap films formed on the Pb surface are very effective in slowing the corrosion rate. A film formed slowly appears to be more protective than one formed rapidly.

HYDROXYLATION OF MONOUNSATURATED FATTY MATERIALS WITH HYDROGEN PEROXIDE. D. Swern, G. N. Billen, T. W. Findley and J. T. Scanlan. *J. Am. Chem. Soc. 67*, 1786-9 (1945). A new and rapid general reaction for the quantitative hydroxylation of long-chain, monounsaturated, aliphatic compounds has been described. The oxidizing agent, performic acid, is not isolated but is prepared and utilized in situ. This is accomplished by dissolving the unsaturated compounds in HCOOH and adding H_2O_2. Because of the rapidity of the reaction and the mild conditions, only one mole of H_2O_2 is required for each mole of monounsaturated compound. This reaction has been applied to pure oleic, elaidic, and hendecenoic (undecylenic) acids, oleyl alcohol, and Me ricinoleate to give excellent yields of the corresponding hydroxy derivatives. In addition, it has been shown that substantially identical results are obtained when HOAc containing catalytic quantities of H_2SO_4 is substituted for HCOOH in the mixture with H_2O_2. The oxidizing agent in the case is peracetic acid. Either of the 2 hydroxylation methods described should be suitable for the industrial production of hydroxylated fatty acids and related compounds.

TALL OIL ESTERS AS PLASTICIZERS FOR GR-S. W. I. Harber and C. S. Yoran. *Ind. Eng. Chem. 37*, 953-6 (1945). Tall oil is a rich source of resin and fatty acids. Previous work has shown that this material exerts a plasticizing effect on GR-S. The structure of tall oil was modified by esterification with alcohols. Most interesting were those esters derived from hydroxy compounds related to GR-S unit structure. They were superior to tall oil in rate of incorporation

SUMMARY

Experiments were conducted with young male albino rats to determine: (1) whether lamb protein is deficient in cystine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan or valine at the 7.5% protein level; and (2) the biological value of the protein in different cuts of lamb at 4 levels of intake.

The results of these experiments indicate that the protein from the entire carcass of lamb is deficient only in cystine or methionine. The addition of the same quantity of either amino acid to the diet was equally effective in promoting much more rapid growth and better utilization of the lamb protein.

When the protein in the leg, shoulder, and entire carcass of lamb was fed at the 7.5, 10.0, 12.5, and 15.0% levels of intake, it was found in one experiment, at the first three protein levels, that the protein in the entire carcass was superior in biological value to that in the leg. In a second experiment with another lot of lambs, when protein constituted 12.5 and 15.0% of the diets, practically the same biological values were obtained for the three cuts of lamb at each protein level.

LITERATURE CITED

HOAGLAND, R., N. R. ELLIS, O. G. HANKINS AND G. G. SNIDER 1948 Supplemental value of certain amino acids for beef protein. J. Nutrition, *35:* 167.

HOAGLAND, R., AND G. G. SNIDER 1926 Nutritive value of the protein in voluntary muscle, heart, liver and kidney from cattle, sheep and hogs. J. Agr. Res., *32:* 1025.

———— 1946 Nutritive value of protein in dehydrated meat. Food Res., *11:* 494.

SCHWEIGERT, B. S., B. T. GUTHNECK, H. R. KRAYBILL AND D. A. GREENWOOD 1949 The amino acid composition of pork and lamb cuts. J. Biol. Chem., *180:* 1077.

U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, BUREAU OF AGRICULTURAL ECONOMICS 1950 The National Food Situation. N. F. S. 53, July-September.

THE EFFECT OF HEAT TREATMENT ON THE NUTRITIONAL VALUE OF SOME VEGETABLE OILS

EARLE W. CRAMPTON, FLORENCE A. FARMER AND F. MARION BERRYHILL[1]

Department of Nutrition, Macdonald College, McGill University, Province of Quebec, Canada

(Received for publication October 16, 1950)

INTRODUCTION

Oil-seed crops are becoming increasingly important to Canadian economy. While the meal plays a significant role in livestock feeding, the oils pressed from seeds have been adapted to many uses. Of current concern is the manufacture of vegetable oils into edible products such as margarine and salad oils.

Because certain of the more highly unsaturated vegetable oils develop undesirable odors and flavors on exposure to heat or light, their use as edible products was hindered. In 1945 Privett and his co-workers showed thermal polymerization to be a simple and yet satisfactory method for rendering such vegetable oils less susceptible to this "flavor reversion." Polymerization has reportedly been used in the processing of herring oil for human consumption in the United States (Lassen et al., '49), and in Norway (Schwitzer, '48) to replace olive, cotton seed and groundnut oils with herring oil for canning, cooking and to some extent as a table and salad oil.

However, when linseed oil prepared by the method of Privett et al. ('45) was fed in 28-day tests to rats in this laboratory (Crampton and Millar, '46) a high incidence of death occurred.

[1] Contribution from the Faculty of Agriculture, McGill University, Macdonald College, Que., Canada. Journal Series No. 276.

Issued as paper no. 257 of the Canadian Committee on Food Preservation.

Because unheated linseed oil is known to be wholesome and nutritious (Molotkow, '32), it was suspected that heat polymerization had somehow deleteriously affected the nutritional value of that oil.

Reports in the literature of adverse affects on fats of severe heat are scanty. Roffo ('44) found that rats fed sunflower seed and olive oils heated to 350°C. for 30 minutes developed stomach tumors which became cancerous over a period of 12 to 30 months. Although no other published reports confirm these observations, Morris et al. ('43) noted growth failure and weight loss in rats fed diets containing 50% lard which had been heated at 300°C. for 120 minutes. Accompanying these effects on growth, Morris observed in some animals a paralysis similar to that produced in rats fed a vitamin E-deficient diet by Mackenzie et al. ('40); also some cirrhosis of the liver and chronic gastric ulcers. However, both these groups of workers used fat heated in air, where oxidation may have been an important factor, whereas Privett's polymerization is conducted in an atmosphere of inert gas.

In 1947, Harris fed rats fish oils heated at 280°C. under a vacuum of 10 mm of mercury for 8 to 12 hours and observed symptoms of retarded growth and general ill-health.

Subsequent to our original findings, a series of experiments was conducted, the most pertinent of which are reported herein, to investigate further the influence of heat on the nutritiousness of herring oil, linseed oil and other vegetable oils which are potentially important to the food industry.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

The general plan of each of the tests in this study involved feeding to young growing rats basal diets in which one or the other of the several fats, subjected to heats of varying duration, was incorporated at levels of 10% or 20% by weight. Fats examined in the tests reported include linseed, soybean, rapeseed, corn, peanut, and herring oils.

The vegetable oils were heated in a salt bath at 275°C. for the desired time in all-glass apparatus. Carbon dioxide was blown through the oil continuously to exclude air and to remove volatile decomposition products thoroughly. The herring oil was a caustic soda-refined, bleached, deodorized product of a process reportedly used in Norway (Schwitzer, '48), involving heating while passing through steam at 280°C. under a vacuum of 10 mm of mercury for 10 hours.

The effect of the heat treatment on the nutritive value of the oils was measured by the growth rates of the rats, their feed consumption, and their general conditions of health and thrift as compared to those of animals fed identical basal diets but containing the unheated oil. Post mortem examination of the viscera was performed on all rats failing to survive the planned feeding period and on representatives of the groups at the close of the test.

Equal numbers of male and female white rats of approximately 28 days of age were allotted at random within sexes to the test groups, which ranged in size from 6 to 16 animals per lot. Thus each lot contained equal numbers of male and female animals. They were housed in individual wire-bottom cages, and were allowed feed and water ad libitum throughout each 28-day test period. Weekly weight gain and feed consumption for each rat were recorded.

Diets

The percentage compositions of the three basal diets used are shown in table 1.

It will be noted that diets I and III differed only in the level of fat, which varied by weight at the expense of the flour. Diet II was a modification of diet I through the addition of yeast in place of the thiamine, riboflavin and niacin. The level of protein in the basal diets was such that it supplied between 20% and 24% of the Calories.

In preparation for feeding, the oils were added to the thoroughly mixed dry ingredients and the whole baked at 375°F.

for approximately 20 minutes. The resulting biscuit was then granulated and air-dried for 24 hours, after which the supplements were added. Diets were refrigerator-stored until the beginning of the test period, during which time they were held at room temperature.

In addition to the diet, weekly doses of cod liver oil were administered orally to supply 175 I.U. of vitamin A and 35 I.U. of vitamin D.

TABLE 1

Percentage compostion of the basal diets

INGREDIENTS	I	II	III
White flour	47.0	44.0	57.0
Casein	11.5	11.5	11.5
Milk powder	19.0	19.0	19.0
Oil	20.0	20.0	10.0
Bone meal	2.0	2.0	2.0
Salt	0.5	0.5	0.5
Yeast [1]	..	3.0	..
Thiamine [1]	10 p.p.m.	..	10 p.p.m.
Niacin [1]	230 p.p.m.	..	230 p.p.m.
Riboflavin [1]	5 p.p.m.	..	5 p.p.m.
Protein in the diet (%)	20.4	20.4	24.3

[1] Added after baking.

RESULTS OF FEEDING TRIALS

Clinical observations

Symptoms of defective diet were most pronounced in those animals fed polymerized linseed oil, and the severity of the symptoms varied with the amount of oil incorporated in the diet. However, animals fed any of the polymerized oils, and whose weight gains were significantly lower than those of their controls, excreted dark, sticky feces. Lassen et al. ('49) noted abnormal feces from adult rats fed polymerized sardine oil as 5% of the diet. In our tests, in addition to the sticky fecal residue, animals fed polymerized oil as 20% of the diet showed oily, matted coats.

Growth and feed consumption

In examination of the results which follow it must be understood that the data presented were collected from a series of individual tests. Control groups of animals fed the appropriate unheated oils were carried in each experiment, and quantitative comparisons of the data shown in these tables are strictly valid only within tests.

TABLE 2

Summary of data showing the effects of heat treatment of oils as measured by daily gains of rats, feed intakes, and gains per 1,000 Calories eaten

TEST AND OIL USED	DIET NO.	OIL IN DIET	DURATION OF HEAT TREATMENT AT 275°C.	NO. OF ANIMALS	AVE. DAILY GAIN	AVE. DAILY FEED INTAKE	GAIN/1,000 CALORIES
		%	hrs.		gm	gm	gm
Linseed	III	10	nil	10	3.9	9.6	91
		10	2	10	3.8	9.6	91
		10	4	10	3.4 [1]	9.5	80
		10	8	10	2.5 [2]	8.1	69
Rapeseed	III	10	nil	10	3.4	10.0	76
		10	15	10	2.9	9.5	69
		10	30	10	2.3 [1]	7.8	64
Corn	III	10	nil	12	3.6	10.4	78
		10	15	12	2.8	8.7	71
		10	30	12	2.2 [1]	8.0	64
Peanut	III	10	nil	12	3.6	9.3	87
		10	15	12	3.6	10.0	80
		10	30	12	0.8 [1]	5.2	30
Soybean	II	20	nil	10	4.6	10.2	90
		20	3	10	4.0	9.4	85
		20	6	10	3.3 [1]	8.3	80
		20	9	10	2.9 [1]	7.7	76
Herring	I	20	nil	16	2.6	8.1	64
		20	10	16	0.89 [1]	6.3	28

[1] Weight gains significantly lower than those of control animals fed the unheated oil.

[2] Weight gains significantly lower than those of animals fed linseed oil heated only 4 hours.

In table 2 is presented a summary of the average daily gains and feed intakes of animals fed in 6 different tests covering a series of potentially edible oils.

It should be noted that the duration of heating stated is not necessarily the earliest point at which the nutritional value of the oil is damaged. Our experiments, for example, have shown linseed oil heated two hours at polymerizing temperatures, and soybean oil heated three hours, to be as nutritious as the unheated control oils. The intermediate periods between 15 and 30 hours for rapeseed, corn, and peanut oils have not been tested, nor the periods up to 10 hours with herring oil.

TABLE 3

Effect of 10% vs. 20% of heated oil in the diets as measured by daily gains and feed intake ratios of rats

TEST AND OIL FED	OIL IN DIET	DURATION OF HEAT TREATMENT	NO. OF ANIMALS	AVE. DAILY GAIN	AVE. DAILY FEED INTAKE	GAIN/1,000 CALORIES
	%	hrs.		gm	gm	gm
Linseed	20	nil	10	3.7	10.1	80
	10	12	10	2.3[1]	8.2	72
	20	12	10	−0.1[2]	6.0	4
Soybean	10	nil	10	3.7	10.3	92
	10	6	10	3.5	10.4	87
Soybean	20	nil	10	4.6	10.2	90
	20	6	10	3.3[1]	8.3	76

[1] Weight gain significantly lower than that of group fed unheated oil.
[2] Weight gain significantly inferior to that of group fed heated oil as 10% of the diet.

That the duration of heating is a factor in the extent of the damage in linseed and soybean oils is clearly indicated by the progressive decrease in weight gains as the heating period was prolonged.

The data presented in table 3 indicate that the diet becomes progressively poorer as the proportion of heated oil in it increases.

When linseed oil, heated 12 hours, was fed as 10% of the diet, the growth resulting over a 4-week period was significantly lower than that of animals fed unheated oil. When the heated oil was included in the diet as 20% by weight, the final weight of the group was even lower than the starting weight, showing extreme growth inhibition.

When soybean oil was fed as 10% of the diet, oil heated 6 hours appeared as nutritious as the unheated oil. However, when oil treated in the same manner was fed as 20% of the diet, significantly lower gains resulted.

While the results from this series of trials leave no doubt that heat polymerization does adversely affect the nutritive value of the oils examined, the mechanism of this damage was not elucidated. Digestion studies rule out incomplete absorption as a causal factor. It can be postulated that growth inhibition was either the result of some factor in the heated oil toxic to the animals, or that it was a consequence of the destruction by abnormal products of fat polymerization of some necessary dietary component other than fat. To differentiate between these two possibilities as a guide to further investigations, the effect of feeding polymerized linseed oil by dropper was compared to that of feeding the oil mixed into the diet.

Animals fed the oil by dropper were given free access for 16 hours daily to diet III minus the fat. Subsequently, and following three hours of fasting, an amount of oil was administered equal to 10% of the fat-free diet consumed during the preceding 16-hour feeding period. Five hours then elapsed before access to the diet was again permitted.

The results of a 28-day feeding trial conducted in this manner are summarized in table 4.

The method of oil feeding had no effect on the growth of animals receiving unheated oil. However, the growth of animals fed the heated oil by dropper appeared superior to that of animals receiving the heated oil as part of the diet mixture, perhaps because the oil-free diet was more acceptable than the mixture containing the heated fat. However, comparison of gains made in relation to equal caloric intake shows that feed utilization was equally poor in the diets in which heated oil was included, regardless of the method of oil feeding.

We are not prepared at this point to explain why appetite was depressed only when the heated oil was a diet component. However, the observation that growth was depressed even when the oil was fed apart from the rest of the diet indicates that the deleterious effects exerted by polymerized oils were not incurred through the destruction of some essential non-lipid diet component, but through some oil constituent that acted in a toxic manner directly upon the animals' metabolic pools. This is in accord with the previous observations that the growth depression was intensified as the level of polymerized oil in the diet was increased, and also as the time of heating was lengthened.

TABLE 4

Summary of daily gains, feed intake and gains per 1,000 Calories eaten of animals fed polymerized linseed oil by dropper and as a dietary component

TREATMENT OF OIL	METHOD OF OIL FEEDING	NO. OF ANIMALS	AVE. DAILY GAIN	AVE. DAILY FEED INTAKE	GAIN/1,000 CALORIES
			gm	*gm*	*gm*
Unheated	As a diet component	8	4.2	12.4	87
Unheated	by dropper	8	4.1	12.5	85
Heated 12 hrs.	As a diet component	8	2.7	9.7	71
Heated 12 hrs.	by dropper	8	3.4	12.4	71

It appears logical at this time, therefore, to conclude that the toxic material is some product of polymerization and that its development is related to the unsaturation of the oil. Linseed is the most highly unsaturated of all the oils tested and was the most rapidly susceptible to nutritive damage by heating.

A series of nutritional studies of various fractions of polymerized oils designed to identify the toxic substance or substances will be reported in a subsequent paper.

CONCLUSIONS

From the data reported herein, the following conclusions are warranted:

1. Ingestion of certain oils heat-polymerized at 275°C. has been shown to depress rat growth and the efficiency of feed utilization. This reflects a lowered nutritive value of those oils which varies in severity with the degree of unsaturation of the oil, the length of time of heating each oil, and the level at which the heated oil is incorporated in the diet.
2. The factor or factors responsible for these adverse nutritional effects appear to be present in the oil itself, and act in a manner directly toxic to the animal.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to a number of persons not connected with this Department, whose collaboration facilitated the performance of this series of experiments.

Financial assistance was received from the Committee on Food Preservation of the National Research Council, Ottawa, Canada, through their Sub-Committee on Edible Fats and Oils. Thanks are due to Dr. N. H. Grace and Dr. H. J. Lips of this latter Committee and to Mr. H. W. Lemon of the Ontario Research Foundation for providing and processing certain of the oils used.

The soybean oil was prepared and contributed through the courtesy of Dr. W. D. McFarlane, Canadian Breweries, whose personal interest in these studies has been of much help.

Special chemical facilities were made available by Dr. R. H. Common, Department of Chemistry, Macdonald College, who also assisted in the planning and interpretation of these studies.

LITERATURE CITED

CRAMPTON, E. W., AND J. MILLAR 1946 Studies on the utilization of different types of shortening—linseed oil, rapeseed oil, lard, and a commercially prepared peanut oil. Unpublished data.

HARRIS, P. 1947 Unpublished information by letter from the author.

LASSEN, S., E. K. BACON AND H. J. DUNN 1949 The digestibility of polymerized oils. Arch. Biochem., *23:* 1-7.

MACKENZIE, C. G., J. B. MACKENZIE AND E. V. MCCOLLUM 1940 Occurrence of tremors and incoordination in vitamin E-deficient adult rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *44:* 95.

MOLOTKOW, G. W. 1932 Experimental morphology with single and repeated doses of linseed oil. Frankfurter Zschr. Path., *44:* 292. Cited in: Nutrition Abstr. and Rev., *2:* 797.

MORRIS, H. P., C. D. LARSEN AND J. W. LIPPINCOTT 1943 Effects of feeding heated lard to rats. Histological description of lesions produced. J. Natl. Cancer Inst., *4:* 285. Cited in: Nutr. Abstr. and Rev., *15:* 718.

PRIVETT, A. S., R. B. PRINGLE AND W. D. MCFARLANE 1945 Elimination of flavor in linseed shortening by heat polymerization and solvent segregation of the oil. Oil and Soap, *22:* 287.

ROFFO, A. H. 1944 The carcinogenic action of oxidized vegetable oils. Bol. Inst. med. exp. (Buenos Aires) *21:* (64): 1-134. Cited in: Biol. Abstr., *19:* 922.

SCHWITZER, M. K. 1948 Oleagineux, *3:* 243. Information received by letter from H. J. Lips, Div. App. Biology, National Research Council, Ottawa.

THE NUTRITION OF THE MOUSE

X. STUDIES ON THE UTILIZATION OF HIGH AND MODERATELY LOW PROTEIN DIETS FOR GROWTH IN FOUR STRAINS OF MICE[1].

PAUL F. FENTON AND CLAIRE J. CARR
WITH THE TECHNICAL ASSISTANCE OF LOUISE REILLY
Department of Biology, Brown University, Providence, Rhode Island

FOUR FIGURES

(Received for publication October 20, 1950)

Tumor growth, whatever its cause, involves the deposition of new tissue and the synthesis of new protein. It may be expected to give rise to measurable alterations in the pattern of nitrogen metabolism of the host. This immediately raises the question of whether the nitrogen metabolism of a tumor-susceptible animal during the period before tumors appear differs from that of a non-susceptible one.

Mice of the highly inbred strains C_{57}, I, A and C_3H maintained in our colony seemed to be particularly suited to the investigation of this question since the first two strains show a low incidence and the last two a high incidence of spontaneous tumors. Previous observations (Fenton and Cowgill, '47; Fenton, Cowgill, Stone and Justice, '50) have shown significant strain differences to exist with respect to the requirements of certain vitamins for growth. It seemed possible that there might also be differences with respect to

[1] This investigation was supported by research grants from the American Cancer Society on the recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council; the National Cancer Institute, U. S. Public Health Service; and the Anna Fuller Fund.

Vitamins of the B complex were obtained through the courtesy of Hoffmann-LaRoche, Inc. Folic acid was furnished by the Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company.