自動酸化リノール酸メチルの投与における 溶血とビタミンEとの関係

柴田 宣和・衣巻 豊輔・荒井 君枝

農林省水産庁東海区水産研究所（東京都中央区勝どき5の5の1）

Relationship between Vitamin E and Erythrocyte Hemolysis in Rat Fed on Autoxidized Methyl Linoleate

Nobukazu SHIBATA, Toyosuke KINUMAKI, and Kimie ARAI

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

Autoxidized oils including peroxide have been generally known to cause certain diseases in animals. It has been also known that the erythrocytes of vitamin E deficient animals easily hemolyze in the presence of hydrogen peroxide or dilauric acid *in vitro* due to the peroxidation of lipids in thier membranes. However, very few observations have been reported whether the erythrocytes of rats hemolyze or not when autoxidized oil is given orally.

In the present paper, the authors examined the relation between the H_2O_2 -induced hemolysis of the erythrocytes and the vitamin E contents of the sera of the rats fed on autoxidized methyl linoleate (AOML) or a mixture of AOML and vitamin E. The diet shown in **Table-2** was given to rats in each experimental group for 7 days, respectively.

The following results were obtained;

1. The hemolysis of the erythrocytes in the rats fed on methyl linoleate appeared more frequently than in the rats fed on the basal diet.
2. Higher hemolysis was observed in the erythrocytes of the rats fed on AOML than in those of the rats fed on methyl linoleate.
3. Any hemolysis of the erythrocytes was hardly observed in the rats fed on the additional vitamin E with the basal diet containing methyl linoleate (fresh or autoxidized).
4. The serum vitamin E content of the rat in the AOML group was the lowest of all the groups tested.

From these results, the authors presumed that the hemolysis of the erythrocytes of the rats fed on AOML might be caused by the following process; Some digestible and absorbable components from AOML decreased *in vivo* serum vitamin E content below a level susceptible of vitamin E deficiency.

1 緒 言

高度不飽和脂肪酸は赤血球膜のリン脂質構成成分の一つであるが、このものは抗酸化性物質の欠乏時に容易に過酸化され、ヒドロペルオキシドに変化する。この変化によって、過酸化水素あるいはジアルル酸などの酸化剤の存在下で、赤血球の膜はぜい弱になり、破壊されて溶血現象をおこす。したがって、このような溶血は天然の抗酸化剤であるビタミンEの欠乏した動物に多く出現す

ることが認められている¹⁾。一方、外部から与えられたヒドロペルオキシドを含有する自動酸化油脂は種々の動物において、いろいろな異常代謝をひきおこすことも知られている²⁾。しかし、外部から与えた自動酸化油脂と溶血などの原因となる体内過酸化との関係はいまだに不明な点が多い。しかも、自動酸化油脂を投与した動物の赤血球を用いて、溶血現象を検討した例もきわめて少ない。

本報では、リノール酸メチルまたはその自動酸化物を与えたラットの赤血球について H_2O_2 -溶血率とビタミン

* 東海区水産研究所業績 B第648号

E の溶血防止効果の検討を行い、さらにその際の血清中のビタミン E の含量についても調べた。

2 実 験

2.1 試験区と飼育条件

試験動物として、呑竜系ラッテ(体重 ♂ 120 g, ♀ 110 g 前後)を用いた。ラッテの飼料は乳離れから試験飼育開始時まで、日本クレア化学株式会社の固型飼料を使用した。試験飼育期間は 7 d で、この間の投与飼料は **Table-1** に示した基本飼料を 1 匹当たり 10 g ずつ、毎日定時(午前 10~11 時)に与えた。各試験区に投与した油脂とビタミンの種類及び添加量を **Table-2** に示した。添加油脂及びビタミン類は上記の基本飼料と混合

Table-1 Composition of basal diet (%).

α-Starch	51.7
Sugar	25.8
McCormick's mixture	4.0
Vitamin-free casein	15.0
Vitamin mixture*	0.5
Soybean oil	3.0

*The diet (1 kg) contained the following vitamins; retinol 2,000 IU, thiamine 5 mg, riboflavin 8 mg, pyridoxine 5 mg, cyanocobalamin 0.03 mg, ascorbic acid 100 mg, cholecalciferol 200 IU, *dl*-α-tocopheryl acetate 50 mg, nicotinic acid 40 mg, Ca-pantothenate 40 mg, *p*-aminobenzoic acid 100 mg, folic acid 2 mg, biotin 0.4 mg, menadione 5 mg, inositol 100 mg.

Table-2 Experimental groups and compositions of diets.

Expt. No.	Group No.	Number of rat	Added oils & vitamins (per 10 g of basal diet*)			
			ML**	AOML**	Vit. E	Riboflavin
I	1	♂ 9, ♀ 10				
	2	" 10, " 10			50 mg**4	240 µg
	3	" 10, " 10			50 mg**5	240 µg
II	4	" 5, " 5				
	5	" 10, " 8	0.5 ml			
	6	" 9, " 9	0.5 ml		50 mg**5	240 µg
III	7	" 6, " 4	0.5 ml			
	8	" 6, " 4		0.5 ml**6		
	9	" 6, " 4		0.5 ml**6	50 mg**5	240 µg
IV	10	" 6, " 6				
	11	" 6, " 6	0.5 ml			
	12	" 6, " 6		0.5 ml**7		
	13	" 6, " 6	0.5 ml		50 mg**5	240 µg
	14	" 6, " 6		0.5 ml**7	50 mg**5	240 µg

*1 The daily dose of basal diet per rat is 10 g.

*2 Methyl linoleate.

*3 Autoxidized ML.

*4 *dl*-α-Tocopherol.

*5 *dl*-α-Tocopheryl acetate.

*6 POV=3,778 meq/kg.

*7 POV=3,600 meq/kg.

し、ラッテに飽食させた。**Table-2** に示したビタミン類の添加量は **Table-1** に示した基本飼料に比べて、ビタミン E として与えた *dl*-α-トコフェロールの濃度は 100 倍、またビタミン B₂ (リボフラビン) 濃度は 3 倍であった。このビタミン類の増量分は基本飼料の大豆油で調整した。添加したビタミン E は 2 区の場合だけ遊離型 *dl*-α-トコフェロールとし、他の区ではすべて *dl*-α-トコフェリルアセテートとした。投与油脂の添加量は 1 匹当たり 0.5 ml とした。実験は 4 回 (**Table-2** 中の Expt. I~IV) に分け、各回の目的を次のように設定した。すなわち、Expt. I では基本飼料区の溶血に対するビタミン E の防止効果、及びビタミン E の遊離型とアセテート型の効力の違いについて検討した。また、Expt. II 及び III では、基本飼料にリノール酸メチルまたはその自動酸化物を加えて投与した場合の溶血率の変化とビタミン E の防止効果について調べた。最後に、Expt. IV ではリノール酸メチルまたはその自動酸化物を含む飼料を与えた場合の溶血率と、血清中のビタミン E 含量との関連性について調べた。

2.2 投与油脂の調製

リノール酸メチル及びその自動酸化物の調製は既報¹⁾に従った。調製したリノール酸メチルの純度は 90% で、その自動酸化物の過酸化価は Expt. I~III において 3,778 meq/kg^{注1)}、Expt. IV で 3,600 meq/kg^{注1)}であった。なお、Expt. I~III で用いたリノール酸メチルとその自動酸化物のヨウ素価、けん化価、酸価、平均分子量(凝固点降下法による)及び共役ジエン酸含量について **Table-3** に示した。

Table-3 Properties of fresh and autoxidized methyl linoleate (ML) used in the Expt. I~III

	POV (meq/kg)	IV (Wijs)	SV	AV	Average molecular weight*	Conjugated double bond (%)
Fresh ML	0	146	168	0	290	0
Autoxidized ML	3,778	49	245	4.7	336	14

* Determined by the use of the Hitachi Molecular Weight Measuring Apparatus (Model 115)

2.3 溶血試験

試験飼育期間の終了後、1 日絶食させたラッテをエーテル麻酔下で開腹した。開腹後直ちに、ヘパリン液で処理した注射器を用いて下大静脈より採血した。採血した血液をクエン酸ナトリウム-塩化ナトリウム水溶液 (5 g, 4.5 g/l) に適当量滴下し、溶血試験用の試料にした。溶血試験法は池畑らの H₂O₂ 法¹⁾に準じて行った。なお、この方法により測定された溶血率は H₂O₂ 濃度、外気温度

注¹⁾ この方法では、以後過酸化価が約 5,000 meq/kg に達し、その後ヒドロペルオキシドの分解が強まり、値は低下する。

をはじめ種々の条件によって変動しやすく、同時に測定したグループ以外の試験グループ間の絶対値の比較はできにくいとされている⁹⁾。そこで本報告では、同一実験条件下で実施した各回の試験区間の比較だけを行った。

2.4 血清中のビタミンEの定量

阿部・勝井らの方法⁹⁾に従った。

3 実験結果

Expt. I～III の結果を Fig.-1 にまとめて示し、Expt. IV の結果を Fig.-2 に示す。なお、本実験において、雌、雄のほぼ同数のラッテを各グループで用いた。しかし、性別間にはとくに一定の傾向がみられなかったため、この報告では性別に関してふれないことにした。

3.1 Expt. I

Fig.-1 にみられるように、基本飼料区(1区)ではラッテの過半数が10～40%の高い溶血率を示したが、ビタミンEを添加した他の2区(2,3区)では10%以上の溶血率を示すラッテの出現はほとんど認められなかった。このように多量のビタミンEを飼料に添加することによって、基本飼料で飼育したラッテの溶血現象はほとんど完全におさえることができた。この結果は従来の報告⁹⁾と同様であった。

ビタミンEの遊離型とアセタート型による溶血に対する防止効果の差は今回の実験条件下では認められなかった。

Fig.-1 H_2O_2 -induced hemolysis of erythrocytes in rats fed on different diets (Expt. I～III)

3.2 Expt. II

リノール酸メチルを添加した区(5区)は基本飼料(4区)に比べると、30%以上の非常に高い溶血率を示す個体が多かった。しかし、リノール酸メチルに多量のビタミンEを添加した区(6区)では、従来の研究結果⁹⁾

で認められているようにすべてのラッテの溶血がほとんどおさえられた。今回の実験条件下ではその値は10%以下であった。

3.3 Expt. III

自動酸化したリノール酸メチルを与えた8区はリノール酸メチルを添加した7区よりも、30%以上の非常に高い溶血率を示す個体が多かった。すなわち、ラッテ赤血球の溶血率はリノール酸メチルの投与により高まり、さらにその自動酸化物を投与した場合は一段と溶血率が高まることが認められた。また、多量のビタミンE添加は自動酸化したリノール酸メチルの投与によって高められた溶血の防止にも極めて有効であった。

3.4 Expt. IV

本実験では、ビタミンEの血清中の含量と溶血率との関連について検討した。

Fig.-2 H_2O_2 -induced hemolysis of erythrocytes and serum vitamin E contents in rats given different diets (Expt. IV)

Fig.-2 に示したこの実験結果において、基本飼料区(10区)のラッテはほとんど溶血しない点、リノール酸メチルを与えても溶血率はわずかに上昇しなかった点が Expt. I 及び II と異なっていた。しかし、自動酸化したリノール酸メチルを投与した場合の溶血率の上昇及びビタミンE添加による溶血防止の点では前の Expt. I～III と一致した。このことは後で考察するとおり、試験飼育までのビタミンEの摂取量が関係していると考えられる。

血清中のビタミンE含量について、基本飼料区(10区)と他の4つの区(11, 12, 13, 14区)との結果を Fig.-2 で比較した。これより明らかなように、リノール酸メチルの自動酸化物を投与した区(12区)の血清中のビタミンE含量は他の4つの区よりも全般的に低いレベルにあ

った。一方、多量のビタミンEを添加した区(13, 14区)ではほとんどのラッテが10または11区の最高値以上のビタミンEレベルを示した。

以上の結果は次のように要約できる。すなわち、自動酸化したリノール酸メチル投与区では、大部分のラッテに溶血が認められたが、この試験区は同時に血清中のビタミンE含量が最も低かった。また、完全に溶血を抑制したビタミンE添加区では、同時にビタミンE含量が非常に高くなっていた。

4 考 察

基本飼料にリノール酸メチルを添加して与えたラッテの溶血率は基本飼料のそれよりも幾分高くなることを認めた。このリノール酸のような不飽和脂肪酸を動物に与えた場合、飼料中のビタミンEの必要量が高まることが知られている¹⁾。Harris ら⁸⁾はビタミンEの必要量を求める目安として、ビタミンEのmg量と高度不飽和脂肪酸のg量の比(E/PUFA)を用いることを提唱した。Fukuba ら⁹⁾はE/PUFA値0.8の場合、ほとんど溶血しないが、0.6まで低下すると溶血率は高くなることを認めている。このE/PUFA値を今回の試験に用いたリノール酸メチルを添加した飼料についておおまかに算出してみると、0.8以上の値を示した。すなわち、Fukubaらの報告した溶血防止に充分なビタミンEの濃度範囲にあったが、溶血する個体が存在した。しかも、基本飼料のE/PUFA値は当然、リノール酸メチルを添加した飼料より高いにもかかわらず、Expt. Iの1区とExpt. IIの4区との基本飼料区では、一部に高い溶血率を示す個体が認められた。この原因の一つとして、試験以前に与えた市販飼料のE/PUFA値が低く、ラッテはビタミンEの欠乏あるいはそれに近い状態にあったとも考えられる。すなわち、予備飼育に用いた市販飼料中のビタミンE含量が溶血率に大きく影響しているものと考えられる。

自動酸化したリノール酸メチルを投与したラッテは基本飼料及びリノール酸メチルを投与したラッテよりも、明らかに高い溶血現象を示した。吉岡ら¹⁰⁾は低分子のヒドロペルオキシアルケナールが油脂の自動酸化生成物の中でも、特に強い溶血作用を示すと報告している。しかし、このヒドロペルオキシアルケナールは油脂の自動酸化が極度に進行した時点で生成される低分子の二次酸化物である。ところが、今回の試験に用いた自動酸化リノ

ール酸メチルはむしろ酸化の初期に近く、また分子量もリノール酸メチルとほぼ類似しているので (Table-3)、ヒドロペルオキシアルケナールとは異なるものによると考えられる。このことは、組織中で脂質の過酸化物質がヒドロペルオキシアルケナール投与により上昇する¹⁰⁾のに比し、今回用いたとほぼ同様な自動酸化リノール酸メチルでは上昇しない¹¹⁾ことよりも推測できる。一方、自動酸化物を投与したラッテの血清ビタミンE含量は0.5mg/ml以下もしくはそれに近い値を示した。藤井ら¹²⁾はこの血清ビタミンE含量が0.5mg/ml以下になると、溶血率は急激に増加することを報告している。このように、自動酸化物を投与したラッテの血清中のビタミンE含量は溶血しやすい濃度までに低下したと考えられる。この点については、ヒドロペルオキシ基を持たない自動酸化生成物でも強い毒性を示すとの従来の報告¹³⁾から次のことが推測される。すなわち、消化吸收されにくいとされているヒドロペルオキシド^{14), 15)}が、直接的に赤血球膜中の脂質を過酸化したのではなく、むしろヒドロペルオキシド以外の体内に吸収された自動酸化生成物が血液中のビタミンE濃度を低下させた結果、過酸化がおりやすくなったのではないかと考えられる。

(昭和53年1月30日受理)

文 献

- 1) 藤井高明, “ビタミンE”, 朝倉書店 (1973) p. 251
- 2) 太田静行, “油脂食品の劣化とその防止”, 幸書房 (1977) p. 323
- 3) 衣巻豊輔, 柴田宣和, 荒井君枝, ビタミン, **35**, 188 (1967)
- 4) 池畑秀夫, 小柳清子, 若泉美智子, ビタミン, **37**, 37 (1968)
- 5) 阿部皓一, 勝井五一郎, 栄養と食糧, **28**, 277 (1975)
- 6) P. György, G. Cogan, C.S. Rose, *Am. J. Dis. Child.*, **82**, 237 (1951)
- 7) J.G. Bieri, K.H. Poukka, *J. Nutr.*, **100**, 557 (1970)
- 8) P.L. Harris, N.D. Embree, *Am. J. Clin. Nutr.*, **13**, 385 (1963)
- 9) H. Fukuba, Abs. Intern. Symposium Vitamin E, p. 9 (1970)
- 10) 吉岡倭子, 金田尚志, 油化学, **23**, 321 (1974)
- 11) 山川健重, 衣巻豊輔, 柴田宣和, 荒井君枝, 杉井麒三郎, ビタミン, **49**, 62 (1975)
- 12) 藤井高明 “ビタミンE”, 朝倉書店 (1973) p. 254
- 13) 土田雅子, 三浦利之, 武藤 健, 高木高明, 油化学, **22**, 259 (1973)
- 14) J.S. Andrews, W.H. Griffith, J.F. Mead, R.A. Stein, *J. Nutr.*, **70**, 199 (1960)
- 15) J.G. Bergan, H.H. Draper, *Lipids*, **5**, 976 (1970)