熱重合油の毒性発生機構に関する病理 組織学的研究（急性毒性）（2）[†]

斎藤 衛 郎*, 福井 良 弘*,
星野 忠 彦**, 金田 尚 志*

* 東北大学農学部食糧化学科

** 東北大学農学部畜産学科

Histopathological Studies on the Mechanism of Toxicity of Heat-Polymerized Oils (Acute Toxicity) (2)[†]

Morio SAITO,* Yoshihiro FUKUI,* Tadahiko HOSHINO,** Takashi KANEDA*

* *Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan*

** *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan*

In a previous paper,¹⁾ we reported that linseed oil heated under the inert gas showed a definite toxicity to mice and the toxic substance was considered to be 9-(2'-*n*-propylcyclohexyl)nonanoic acid and/or 8-(2'-*n*-butylcyclohexyl)octanoic acid with two double bonds. Moreover, the authors noticed that these cyclic fatty acids (Cy. FA) are carried to the liver after the absorption through the small-intestinal mucosa because those acids were found as the component fatty acids of liver lipids.²⁾

To know the degree of toxicity of these Cy. FA, linseed oil was heated under nitrogen gas and non-urea adduct forming fraction (NAFD Fr.) was separated and the 50% lethal dose (LD₅₀) of this fraction was determined by oral administration. It was found to be 9.84 g/kg mouse and 33.35 mmol/kg mouse.

In order to clarify the mechanism of acute toxicity of Cy. FA, several organs including the liver, lung, kidney, cerebrum, cerebellum and heart muscle were separated from the animals used for the determination of LD₅₀ and histopathological examinations were carried out.

Pathological changes were noticed mainly in the liver, lung, kidney and cerebrum. Among these changes, it was recognized that the changes of liver cells such as diffuse fatty degeneration, atrophy and necrosis were regarded only as the direct injurious effect of the Cy. FA. All the other findings were mainly attributed to non-specific circulatory impediment due to the shock that occurred secondary by administration of Cy. FA. In them there were the congestion of the liver and lung, necrosis of nerve cells in the cerebral cortex and degenerative epithelial changes of the distal tubules of the kidney.

These pathological examinations suggested that the acute toxicity of Cy. FA is realized through hepatic insufficiency resulted from toxic hepatocellular injury. Ischemic lesions of several organs caused by concomitant shock was also thought to be responsible for the death of animals.

1) Saito, M. and Kaneda, T.: *Yukagaku*, 25, 79 (1976)

2) Saito, M. and Kaneda, T.: *ibid.*, 25, 842 (1976)

(Received May 4, 1977)

油脂を不活性ガス気流下で加熱すると有毒な熱重合油を生成するが、筆者ら¹⁾は、熱重合アミノ油の有毒成分

は 9-(2'-*n*-プロピル シクロ ヘキシル) ノナン酸および 8-(2'-*n*-ブチルシクロヘキシル) オクタン酸の骨格構造を有し、各分子内に 2 個の二重結合をもつ環状単量体脂肪酸 (Cy. FA) であると報告した。また、二重結合位置異性体の存在をみとめた。さらに、こうした Cy. FA は腸管粘膜から吸収され肝臓へ移行し、肝脂質構成脂肪酸となり、肝組織に種々の病理組織学的変化を与えること

[†] 重合油の構造と栄養価に関する研究（第 12 報）
Studies on the Relationship between the Nutritive Value and the Structure of Polymerized Oils (Part 12)

*,** 〒980 仙台市堤通雨宮町 1-1

も報告した²⁾。

従来, Cy. FA の毒性については, 肝臓の肥大や脂肪肝の発現³⁾⁴⁾, 組織の変性⁴⁾などが知られている。ことに戸谷ら⁴⁾は, イカ油脂脂肪酸エチルより調製した Cy. FA を 2.5~7.5%, 38 日間ラットに投与したところ, 肝臓での脂肪斑や細胞の壊死, 大脳での脳浮腫, 神経細胞の脱落および変性などを生ずるとしている。なお, Cy. FA を多量 (10~15%) に与えた場合には, 組織の変性をみとめず, 短期間に斃死したと述べている。しかし, Cy. FA 投与急性毒性時に組織の変性がみとめられないという点については疑問がもたれる。そこで, 本研究はこうした結果を再検討するとともに, 急性毒性時の毒性発生機構を究明するため, Cy. FA 投与時のマウスの臓器の病理組織学的変化について検索した。また, 従来明らかにされていない Cy. FA の急性毒性の程度を知るため, 50% 致死量 (LD₅₀) を求めた。

実験方法

1. 試料油の調製および化学特徴

精製アミノ油を前報¹⁾同様, 窒素気流下, 275°C, 12 hr 加熱し熱重合アミノ油を調製後, ナトリウムメトキシドを触媒としてメチル化し, 減圧蒸留, 尿素付加を行ない減圧蒸留により留出し, 尿素と付加物を作らぬ区分 (尿素非付加物区 (NAFD Fr.)) を得た。なお, 本区分の調製時, 直鎖脂肪酸の混入を避けるため, 減圧蒸留後, 尿素付加を3回行なった。本区分は前述の Cy. FA を主成分とし, 収率は熱重合アミノ油メチルエステルに対し 5.0% (w/w %) であった。化学特徴は平均分子量 (M.M.W.) 295, I.V. 145.7, P.O.V. 3.7 (meq/kg), CO.V. 83.6 (meq/kg) であり, M.M.W. と I.V. から, 平均の二重結合数は 1.7 であった。また, M.M.W. 295 は, 炭素数が 18 で二重結合を分子内に 2 個もつ Cy. FA

メチルの分子量 292 にほぼ相当する。なお, M.M.W. は日立 115 型分子量測定装置, I.V. は Wijs 法, P.O.V. は基準油脂分析試験法 (日本油化学協会編), CO.V. は熊沢ら⁵⁾の方法により測定した。

2. Cy. FA の LD₅₀

Behren's 法⁶⁾により経口投与で LD₅₀ 値を求めた。すなわち, 体重 18 g 前後の dd 系雄マウスを 1 群 7 匹ずつ 5 群設け, 24 hr 絶食後, NAFD Fr. を希釈せずに progression rate に合わせて 1 回経口投与した。試料投与後, 供試マウスには水と市販の固型飼料を自由に摂取させ, 48 hr 以内に死亡したマウスを致死マウスとした。

3. 組織標本の作製

Cy. FA 投与急性毒性時の病理組織学的変化を観察するため, LD₅₀ の実験に使用したマウスの臓器を摘出し, 組織標本を作製した。すなわち, 試料投与後, 死亡したマウスは死亡直後, 生存したものは 48 hr 後に断頭屠殺し, ただちに肝臓, 肺臓, 心臓, 腎臓, 大脳, 小脳の各臓器を摘出し, 10% ホルマリン・リン酸緩衝液 (Lillie 液) で固定した⁷⁾。なお, 対照には大豆油を Cy. FA の LD₅₀ 相当量 (wt.) 経口投与したマウスの臓器を用いた。固定終了後, 常法によりパラフィンに包埋し, 5 μ の切片とした後, 普通染色としてヘマトキシリン・エオジン二重染色を行なった⁷⁾。グリコーゲンの検出は Mc-Manus の PAS 染色によった⁷⁾。また, 肝臓は凍結切片を作り, スダンⅢ染色により脂質を検索した⁷⁾。

実験結果

1. Cy. FA の LD₅₀

Cy. FA の LD₅₀ 値を求めたところ (Table 1), 196.76 mg/20 g mouse, 9.84 g/kg mouse となり, NAFD Fr. の M.M.W. 295 から, その値は 33.35 mmol/kg mouse となった。

Table 1. LD₅₀ of NAFD Fr. (Behren's method).

Progression rate	mg/20 g mouse	Observed mortality	Mortality in lower doses	Survival in higher doses	Mortality (%)
1.3 ⁻⁴ (0.35)	104.88	0/7	0	20	0
1.3 ⁻³ (0.46)	139.86	1/7	1	13	7.14
1.3 ⁻² (0.59)	174.84	3/7	4	7	36.36
1.3 ⁻¹ (0.77)	233.16	5/7	9	3	75.00
1.3 ⁰ (1.00)	303.12	6/7	15	1	93.75

$$\frac{75.00-50.00}{75.00-36.36}=0.6470, 1.3^{-1-0.6470}=1.3^{-1.6470}=0.6491$$

$$303.12 \times 0.6491 = 196.76$$

$$LD_{50} = 196.76 \text{ mg/20 g mouse, } 9.84 \text{ g/kg mouse}$$

$$M.M.W. = 295$$

$$LD_{50} = 33.35 \text{ mmol/kg mouse}$$

Table 2. Histopathological finding of the liver after oral administration of NAFD Fr.¹⁾ on mice.

	う Congestion 血	細 胞 Atrophy of liver cells 萎縮	核 皺 Nuclear shrinkage 縮	核 濃 Pyknosis 縮	壊 死 Necrosis	脂 肪 変性 Fatty degeneration	グリ コー ゲン 沈着 Glycogen deposition	Remarks
Refined soybean oil	—	—	—	—	—	—	++	Survival
	—	—	—	—	—	—	++	"
	—	—	—	—	—	—	+++	"
	—	—	—	—	—	—	++	"
1.3 ⁻⁴	—	—	—	±	—	—(±)	++	"
	—	±	—	—	—	—	+++	"
1.3 ⁻³	—	—	—	—	—	+	+	"
	—	—	—	—	—	—	+++	"
1.3 ⁻²	—	—	—	—	—	+	±	"
	±	—	—	+	—	+++	—	Death
	±	—	—	+	±	+++	—	"
1.3 ⁻¹	—	+	+	+	—	++	—	"
	+	—	—	+	—	++	—	"
1.3 ⁰	+	—	—	+	—	+++	—	"
	+	—	+++	+	+	+++	—	"
	+++	+	—	+	+	++	—	"
	+++	+	—	+	+	++	—	"

¹⁾ NAFD Fr.: Non-urea adduct forming fraction.

The degree of changes is roughly indicated by the number of + signs: — negative, ± can't identify, + slight, + moderate, ++ severe, +++ extremely severe.

Table 3. Histopathological finding of the lung after oral administration of NAFD Fr. on mice.

	Alveolus 肺 胞	Atelectasis 無 気 肺	Congestion う っ 血	Hemorrhage 出 血	Remarks
Refined soybean oil	—	—	—	—	Survival
	—	—	—	—	"
1.3 ⁻⁴	—	—	—	—	"
	—	—	++	++	"
1.3 ⁻³	—	—	++	+	"
	—	—	+	—	"
1.3 ⁻²	—	—	++	+	"
	—	+	++	+	Death
1.3 ⁻¹	—	—	++	+	"
1.3 ⁰	—	+	+	+	"
	—	±	+	+	"
	—	±	+	+	"
	—	—	±	—	"

Table 4. Histopathological finding of the kidney after oral administration of NAFFD Fr. on mice.

	Glomerulus 糸球体	Renal tubule 尿管										Inter- stitium 間質		Remarks
		Proximal tubule 近位尿管					Distal tubule 遠位尿管					出	脂	
		上 皮 細胞核 消失	上 皮 細胞壞 死	離 解	管 腔 擴張	管 腔 たん 白 蓄 積	上 皮 細胞核 消失	上 皮 細胞 脱落	管 腔 擴張	管 腔 崩 壊				
Refined soybean oil	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Survival	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
1.3 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
1.3 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	"	
1.3 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	"	
	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	Death	
1.3 ⁻¹	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	"	
	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	"	
1.3 ⁰	-	+	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	"	
	-	+	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	"	
	-	+	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	"	
	-	+	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	"	

2. 病理組織学的所見

1) 肝臓 Table 2 に示すように、Cy. FA の投与により死亡したマウスでは、うっ血と肝臓のび慢性脂肪化 (Fig. 1) がみられ、にくづく肝となっていた (Fig. 2)。さらに、肝細胞のグリコーゲンは消失し (Fig. 3)、壊死 (Fig. 4) や萎縮の観察されたマウスもみとめられた。また、肝細胞の核の異状、すなわち、核皺縮 (Fig. 4) や核濃縮などをみとめたが、こうした肝臓の病理組織学的変化は生存マウスにくらべ死亡マウスで著しかった。さらに、死亡マウスでも Cy. FA の投与量の増加につれて変性は増大していた。なお、病理組織学的所見は、前記の LD₅₀ の実験に用いたマウスから得られたものである。

2) 肺臓 Table 3 に示すように、Cy. FA の投与量

やマウスの生死に関係なくうっ血と出血が観察された (Fig. 5)。うっ血は肺全体にみられ、出血は動脈を中心とした巣状出血であった。また、死亡した例では無気肺の観察されたマウスもみとめられた (Fig. 6)。その他、実質の肺胞上皮、気管系には異常なく、細胞浸潤などの炎症像もみられなかった。

3) 腎臓 Table 4 に示すように、Cy. FA の投与により死亡したマウスには、近位尿管では上皮細胞の核消失、管腔の軽度な拡張 (Fig. 7)、腔内のエオジン陽性顆粒 (たん白粒) が観察され、遠位尿管では上皮細胞の核消失と脱落、管腔の拡張 (Fig. 8) と崩壊がみとめられた (Fig. 9)。糸球体および間質には変性像はみられなかった。

- Fig. 1. Diffuse fatty metamorphosis of the liver of dead mouse.
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (Sudan III stain, $\times 50$).
- Fig. 2. Nutmeg liver observed in dead mouse.
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (H-E stain, $\times 50$).
- Fig. 3. Glycogen depletion from the liver cells of dead mouse.
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (PAS stain, $\times 100$).
- Fig. 4. Necrosis of liver cells manifested by prominent shrinkage of nuclei. (Dead mouse)
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (H-E stain, $\times 100$).
- Fig. 5. Congestion and focal hemorrhage of the lung. (Sacrificed mouse)
139.86 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (H-E stain, $\times 50$).
- Fig. 6. Marked atelectasis of the lung of dead mouse.
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (H-E stain, $\times 100$).
- Fig. 7. Luminal dilatation of proximal tubules. (Dead mouse)
233.16 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (PAS stain, $\times 100$).
- Fig. 8. Disappearance of nuclei and desquamation in the epithelial cells of distal tubules. Luminal dilatation is also observed. (Dead mouse)
233.16 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (PAS stain, $\times 100$).
- Fig. 9. Epithelial necrosis with structural disintegration of distal tubules. (Dead mouse)
303.12 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (PAS stain, $\times 100$).
- Fig. 10. Cerebral cortex from molecular to internal granular layers of a mouse administered orally
196.76 mg/20 g mouse of soybean oil. (Control group) (PAS stain, $\times 100$).
- Fig. 11. Necrosis of nerve cells in cerebral cortex from molecular to internal granular layers. (Sacrificed mouse)
104.88 mg/20 g mouse of NAFD Fr. was orally administered. (PAS stain, $\times 100$).

Table 5. Histopathological finding of the cerebral cortex after oral administration of NAFA Fr. on mice.

	Necrosis of nerve cells 神 経 細 胞 壊 死	Remarks
	—	Survival
Refined soybean oil	—	"
	—	"
	—	"
	—	"
1.3 ⁻⁴	++	"
	+	"
1.3 ⁻³	+	"
	+	"
1.3 ⁻²	+	"
	++	Death
	+	"
	+	"
1.3 ⁰	++	"
	++	"
	+	"
	+	"

4) 大脳 Table 5 に示すように、対照 (Fig. 10) と比較し、Cy. FA を投与したマウスではその投与量やマウスの生死に関係なく、神経細胞の核濃縮や細胞質の濃染がみられ、さらに、大脳皮質のうちとくに内顆粒層に少数の神経細胞の壊死像がみられた (Fig. 11)。

5) その他の臓器 小脳には病理組織学的変化はみられなかった。また、心筋障害の有無を検討するため、心筋を検索したが、変性像はみとめられなかった。

考 察

以上の結果から考察すると、従来 Cy. FA の急性毒性の程度はまったく不明であったが、本結果から、経口投与方法では Cy. FA はリノール酸メチルの初期自動酸化の主要有毒成分であるリノール酸メチルヒドロペルオキシド (本化合物の LD₅₀ 値は吉岡ら⁹⁾ によれば 39.1 mg/kg mouse である) と同程度の毒性を示すことが明らかとなった。また、こうした Cy. FA がマウスの臓器に与える変化を病理組織学的に検討した結果、戸谷ら⁴⁾ のいう慢性毒性時に限らず、急性毒性時にも肝臓、肺臓、腎臓、大脳に明らかな病理学的変化がみとめられた。こうした変化のうち、肝臓のび慢性脂肪化、肝細胞の萎縮、壊死像等は Cy. FA の投与量の増加に伴って増大することから、Cy. FA による中毒性の肝細胞の直接的な障害像と考えられ、この結果、肝不全におちいると推察された。一方、腎臓では近位および遠位尿細管に種々の変性所見をみとめたが、これら変性所見を比較した場合、近

位尿細管に比し遠位の変性が著しく、とくに、近位尿細管にみられなかった遠位尿細管上皮細胞の脱落や管腔の壊崩が観察された。こうした下部ネフロン部の特徴的な変化は非特異的なショックに伴う急性の腎症像と解され、その結果急性腎不全におちいるものと思われた。また、肝臓にうっ血像がみられ、肺臓にうっ血と出血が観察されたことから、心筋障害が疑われたが、心筋には変性所見が得られず、肝臓のうっ血、肺臓のうっ血と出血は心筋障害に基づくものではないと考えられた。さらに、心筋障害で起こる肺の出血はび慢性出血であり、本実験では動脈を中心とした巣状出血であることから、心筋障害によるものではないと考えられる。そこで、こうした肝臓での変性像および肺臓での変化像はむしろ、二次的なショックに伴う循環障害の現われと解され、肺臓での組織障害像が Cy. FA の投与量やマウスの生死に関係なく観察されたことから、こうした考えが裏づけられるといえる。大脳の場合は、大脳皮質のうちとくに内顆粒層に神経細胞の壊死像がみとめられたが、こうした変性像は Cy. FA の投与量やマウスの生死に関係なく観察されたことから、Cy. FA による神経細胞の直接的な障害像とは考えにくく、肝細胞障害に伴う代謝障害やショックに伴う循環障害などに起因した二次的な組織障害像と思われた。

以上のことから、Cy. FA による急性毒性は、Cy. FA の投与に起因した直接的な中毒性の肝障害と二次的なショックに伴う臓器障害によると推察されるが、急性毒性では毒物すなわち Cy. FA をストレスラーとするショック反応を誘発するため、それによる主として阻血性の臓器障害が加わり、末期の病像を複雑化していると思われた。

要 約

1) 熱重合油の有毒成分である Cy. FA の急性毒性の程度を知るため、熱重合アマニ油から Cy. FA を調製し、経口投与による LD₅₀ 値を求めたところ、9.84 g/kg mouse, 33.35 mmol/kg mouse で、リノール酸メチルヒドロペルオキシドと同程度の毒性を示した。

2) Cy. FA による急性毒性を病理組織学的に検討し、肝臓、肺臓、腎臓、大脳に病理学的変化をみとめた。こうした変化のうち、肝臓のび慢性脂肪化、肝細胞の萎縮、壊死像等は Cy. FA による中毒性の肝細胞の直接的な障害像と考えられた。同時にうっ血像がみとめられたが、これは二次的なショックに伴う循環障害の現われと解された。一方、肝臓以外の臓器にみられた変化は、肺臓のうっ血と出血、大脳皮質の神経細胞の壊死、腎臓の遠位尿細管管腔や上皮細胞の変性などから成るが、おもに二次的なショックに起因する非特異的な循環障害の結

果と考えられ、Cy. FA の投与に特異的な組織障害像とはいえない。

3) 以上のことから、Cy. FA による急性毒性は、Cy. FA の投与に起因した直接的な中毒性の肝障害と Cy. FA をストレスラーとする二次的なショックに伴う主として阻血性の臓器障害によると推察された。

本研究の結果を考察するに際して、適切なお助言をいただいた 本学医学部 第一病理学研究室助教授 高橋徹博士に深謝いたします。

本研究は昭和51年4月、第30回日本栄養・食糧学会総会で発表した。

文 献

- 1) 斎藤衛郎, 金田尚志: 油化学, 25, 79 (1976)
- 2) 斎藤衛郎, 金田尚志: 油化学, 25, 842 (1976)
- 3) Iwaoka, W.T. and Perkins, E.G.: *Lipids*, 11, 349 (1976)
- 4) 戸谷洋一郎, 戸谷永生, 松尾 登: 栄養と食糧, 28, 61 (1975)
- 5) 熊沢 恒, 大山 保: 油化学, 14, 167 (1965)
- 6) Anam, K.K.: *Bangladesh Pharm. J.*, 2, 19 (1973)
- 7) 佐野 豊: 組織学研究法, p. 61, 191, 455, 476 (1974), 南山堂 (東京)
- 8) 吉岡倭子, 金田尚志: 油化学, 23, 321 (1974)

(昭和52年5月4日受理)