ラット肝臓におけるリノール酸メチル

自動酸化産物の吸収と代謝

大荒田 素子*, 宮 沢 陽 夫*

藤 本 健四郎*, 金 田 尚 志**

*東北大学農学部食糧化学科

**郡山女子大学家政学部食物栄養学科

Absorption and Metabolism of Autoxidation Products of Methyl Linoleate in Rat Liver

Motoko OARADA,* Teruo MIYAZAWA,* Kenshiro FUJIMOTO*
and Takashi KANEDA**

*Department of Food Chemistry, Tohoku University, Sendai 980

**Department of Food and Nutrition, Kohriyama Women's College, Kohriyama 963

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 40, 117~121 (1987)

To study the toxicity of low molecular weight (LMW) compounds formed during the autoxidation of oils, ^{14}C -labeled primary monomeric compounds (methyl linoleate hydroperoxides) and secondary oxidation products, *i.e.*, polymer and LMW compounds prepared from autoxidized methyl[^{14}C]-linoleate hydroperoxides (MLHPO), were orally administered to rats (each 50 mg/200 g body wt.), and their radioactive distributions in the liver and in the hepatic lipids were compared.

When ^{14}C -labeled MLHPO, polymer and LMW compounds were intubated, the radioactivities found in the liver were 2.3%, 2.2% and 6.9% of total activity administered, respectively. Among the radioactivities found in liver, the ^{14}C detected in Folch's chloroform layer was 40.1% for MLHPO, 33.7% for polymer, and 9.4% for LMW compounds. Therefore, LMW compounds from MLHPO autoxidation seem to be more easily absorbed in rat liver than polymer and MLHPO, and most of them are suggested to exist as hydrophilic conjugates in the liver.

In the hepatic lipid fractions, the greater part of the radioactivities were distributed in triglycerides and phospholipids after administration of ^{14}C -labeled MLHPO, polymer and LMW compounds. In the constituent fatty acids of liver total lipids, ^{14}C was mainly incorporated into normal saturated and monoenoic acids with carbon chains of 16 and 18.

The re-utilization of autoxidation products as the component fatty acids in the liver may reflect the detoxicative metabolism in rats. The high toxicity of LMW compounds may relate to their easiness for absorption into the liver and preferential formation of hydrophilic conjugates owing to their chemical structures with polar functionals such as aldehydic groups.

(Received August 25, 1986)

油脂の酸化劣化で生じる過酸化脂質類の毒性や栄養上の問題点については、現在までにかなり詳細に調べられている¹⁾²⁾。白ら³⁾⁴⁾や吉岡⁵⁾⁶⁾は、自動酸化反応の一次生成物である脂質ヒドロペルオキシドより、ヒドロペルオキシドの分解で生じた低分子成分のほうが毒性が強いことをすでに明らかにしている。前報⁷⁾で著者らは、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLHPO) をさら

に自動酸化して生じた低分子成分がヒドロペルオキシド単量体や高分子重合体 (おもにリノール酸メチルヒドロペルオキシド二量体) より体内に吸収されやすく種々の臓器に速やかに移行すること、さらに低分子分解産物は代謝回転が速く尿中への排泄速度も早いことをラットを用いた実験で明らかにした。

本研究では、ラットの体内に吸収された脂質酸化生成物の代謝機構を明らかにするため、 ^{14}C ラベルした MLHPO とその分解生成物および重合物をそれぞれラッ

* 〒980 仙台市堤通兩宮町 1-1

** 〒963 郡山市開成 3-25

トに経口投与したときの肝臓中の脂溶性画分への ^{14}C の分布状態を調べた。なお、本実験ではラットが下痢をしない程度の比較的少量の脂質酸化物を投与した。

実験方法

1. ^{14}C 標識酸化物の調製

前報⁷⁾と同様の方法で、 $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ リノール酸のメチルエステル (New England Nuclear) から、 ^{14}C ラベルした高分子重合物 (polymer)、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLHPO) および低分子分解物 (LMW) の各画分を得た。すなわち、サフラワー油から尿素付加法で得たリノール酸メチル (純度 99% 以上) 7 g で $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ リノール酸メチル (50 μCi) を希釈したのち、乾燥空気を通じて自動酸化し、ドライカラムクロマトグラフィーによりほぼ純粋な MLHPO (過酸化物質価 6,075 meq/kg) を分離した。この MLHPO を暗所、40°C で 60 時間さらに自動酸化したものをベンゼンを溶出剤とした充填剤 Bio-Beads S-X 3 (BioRad Laboratories) によるゲルカラムクロマトグラフィーに供し、3 画分を分離した。得られた三つの画分は、日立 115 型分子量測定装置による平均分子量の測定およびケイ酸薄層クロマトグラムより、それぞれ主として MLHPO の二量体から成る polymer 画分、MLHPO 画分および LMW 画分であることを確認した。なおここで得られた LMW 画分は、ヒドロキシあるいはヒドロペルオキシアルケナルを主成分とし、他に多数の低分子化合物から成る (4-ヒドロキシ-2-ノネナール 40%, 8-ヒドロキシメチルオクタノエート 16.1%, 10-フォルミルメチル-9-デセノエート 4.1%, その他 39.8%) ことをガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリーで確認した⁷⁾。

2. ラットへの脂質過酸化物の投与

前報⁷⁾に従い、市販固型飼料 (船橋農場 F-2) で予備飼育した体重約 200 g の Wistar 系雄ラットを 12 時間絶食させたのち、 ^{14}C ラベルした MLHPO、LMW および polymer の 3 画分をそれぞれ 5 匹のラットに胃ゾンデを用いて 50 mg/200 g 体重ずつ経口投与した。前報⁷⁾の実験から、LMW 画分は投与 6 時間後に肝臓をはじめとする各臓器への ^{14}C の取込みが最大になることがわかったので、本実験においても酸化物の投与 6 時間後にエーテル麻醉下心臓採血をした後、肝臓を摘出し、分析に供した。

3. 肝脂質の抽出と脂質クラスへの放射能分布の分析

酸化生成物を経口投与したラットから得た肝臓の一部を前報⁷⁾と同様に 1 N NaOH で溶解し、0.98 N HCl で中和したのち、トルエンシンチレーションカクテルを加え、肝臓に取り込まれた全放射能を測定した。また、肝臓の総脂質を Folch 法⁸⁾で抽出した。得られた総脂質

を、ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸 (80:20:1 または 50:50:1, v/v/v) を展開溶媒とするケイ酸 (Kiesel gel 60, Merck) 薄層クロマトグラフィー (TLC) に供し、各脂質クラスを分離した。TLC 上の各脂質クラスの検出にはヨウ素蒸気を用いた。TLC 上の各脂質クラスのパンドをかき取り、クロロホルム:メタノール (2:1, v/v) でケイ酸から脂質を抽出し、トルエンシンチレーションカクテルを加えて Aloka 液体シンチレーションシステム LSC-903 により放射能を測定した。

4. 脂肪酸への放射能分布の分析

酸化物を投与したラットの肝総脂質に、5%-メタノール性塩酸を加え、4 時間還流加熱したのちヘキサン抽出して脂肪酸メチルエステルを得た。この脂肪酸メチルエステルをヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸 (70:30:1, v/v/v) を展開溶媒とする Kiesel gel 60 TLC に供し、脂肪酸メチルエステルを極性に依りて、ノルマル脂肪酸、ヒドロキシ酸およびその他の成分に分離した。ヨウ素蒸気で TLC 上の各スポットを検出し、ケイ酸をかき取り、ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを抽出し、これにトルエンシンチレーションカクテルを加え、放射能を測定した。

また、肝総脂質の脂肪酸メチルエステルを、ヘキサン:エーテル:酢酸 (80:20:1, v/v/v) を展開溶媒とする硝酸銀含浸 Kiesel gel 60 TLC (12.5% 硝酸銀溶液を十分に噴霧したのち、110°C で 1 時間活性化したもの⁹⁾) に供し、不飽和度に応じて脂肪酸メチルエステルを分離した¹⁰⁾。TLC 上の脂肪酸メチルエステルのスポットは、0.03% ロードミン 6 G エタノール溶液を噴霧後、UV 照射下で検出した。TLC 上の脂肪酸メチルエステルの各バンドをかき取り、ヘキサンで抽出し、これにトルエンシンチレーションカクテルを加え放射能を測定した。

一方、肝総脂質から得た脂肪酸メチルエステルを、酸化白金を触媒に用いて水素添加し、飽和化した。この飽和化脂肪酸メチルエステルはアセトニトリル:テトラヒドロフラン (85:15, v/v) を展開溶媒とした KC 18 (Whatman) 逆相 TLC に供し、飽和化脂肪酸メチルエステルを炭素数の差により分離した。TLC 上の各スポットの検出は、炭素数 8~14 のものは 0.03% ロードミン 6 G エタノール溶液を噴霧し、UV 照射下で行なった。炭素数 16, 18 および 20 のスポットは、1% β -シクロデキストリン (30% エタノール溶液) を噴霧して検出した。炭素数に応じて分離された飽和化脂肪酸メチルエステルの各スポットをかき取り、ヘキサン抽出部にトルエンシンチレーションカクテルを加え放射能を測定した。

Table 1. Radioactivity in liver of rats 6 hr after intubation of ^{14}C -labeled oxidation products of methyl linoleate.

Distribution	Fractions administered					
	MLHPO (dpm $\times 10^{-2}$ %)		Polymer (dpm $\times 10^{-2}$ %)		LMW (dpm $\times 10^{-2}$ %)	
Total liver	307	2.3	181	2.2	233	6.9
Folch's chloroform layer	123	0.9(40.1)*	61	0.7(33.7)*	22	0.7(9.4)*
Total activity of labeled compounds administered (dpm $\times 10^{-2}$)	13,634		8,344		3,382	

MLHPO, ^{14}C -labeled methyl linoleate hydroperoxides; polymer, ^{14}C -labeled polymer fraction; and LMW, ^{14}C -labeled low molecular weight compounds.

* Percentage of ^{14}C to total liver.

Table 2. Distribution of radioactivity in liver lipids of rat 6 hr after intubation of ^{14}C -labeled compounds.

Distribution	Fractions administered		
	MLHPO (%)	Polymer (%)	LMW (%)
Cholesterol esters	3.0	2.7	3.9
Triglycerides	33.3	36.9	44.7
Free fatty acids	11.4	13.1	5.0
Cholesterol+ diglycerides	9.0	7.7	13.3
Monoglycerides	9.0	4.1	5.0
Phospholipids	34.3	35.5	28.1

Table 3. Radioactivity in fatty acid methylesters derived from liver total lipids of rats 6 hr after intubation of ^{14}C -labeled compounds.

Distribution	Fractions administered		
	MLHPO (%)	Polymer (%)	LMW (%)
Normal fatty acid methylesters	85	100	100
Unidentified	2	0	0
Hydroxy fatty acid methylesters	5	0	0
Unidentified	4	0	0
Unidentified	4	0	0

実験結果

1. 肝臓への ^{14}C の分布

Table 1 に、肝臓に取り込まれた全 ^{14}C 量に対する脂溶性成分中の ^{14}C の割合を示した。MLHPO や polymer を投与したときに比べ LMW を投与した場合、肝臓の脂溶性画分への放射能の取込みは 9.4% と低かった。一方、MLHPO 投与では肝 ^{14}C 量の 40.1% が、polymer 投与では 33.7% が脂溶性画分中に認められた。なお、投与した ^{14}C 酸化物の肝臓に取り込まれた割合は、 ^{14}C -MLHPO 投与では 2.3%, polymer では 2.2%, LMW では 6.9% であった。すなわち、MLHPO や polymer に比べ、LMW 由来の ^{14}C は、肝臓中に多く分布していたが、肝脂質画分への分布率は低いといえた。

2. 肝脂質中の ^{14}C の分布

TLC で分離された肝臓の各脂質クラスへの ^{14}C 分布を Table 2 に示した。いずれの酸化生成物を投与した場合でも、トリグリセリドとリン脂質に最も多く ^{14}C が分布していた。ほかに、TLC 上でコレステロールエステル、遊離脂肪酸、コレステロール+ジグリセリド、モノ

グリセリドの各画分に相当するバンドにも量は少ないが ^{14}C が分布していた。

3. 構成脂肪酸への ^{14}C の分布

^{14}C ラベルした酸化物を経口投与したラットの 6 時間後の肝臓の総脂質から得た脂肪酸メチルエステル中の ^{14}C 量を Table 3 に示した。polymer および LMW 画分を投与した場合、極性官能基をもたない普通の直鎖脂肪酸のみに ^{14}C が検出された。MLHPO 投与の場合には、直鎖ノルマル脂肪酸には 85% の ^{14}C が分布し、ほかにヒドロキシ脂肪酸などの極性成分にも ^{14}C が検出された。なお、いずれの酸化物を投与した場合でも、ヒドロペルオキシル基に特有な *N,N*-dimethyl paraphenylenediamine 陽性のスポットは TLC 上に認められなかった。

肝総脂質から得た脂肪酸メチルエステルの不飽和度の違いによる ^{14}C 分布を、Table 4 に示した。MLHPO, polymer および LMW 投与の場合とも、飽和酸に最も多く ^{14}C が取り込まれていた。polymer 投与の場合、MLHPO や LMW 投与のときよりモノエン酸に比較的

Table 4. Distribution of radioactivity in fatty acid methylesters derived from liver total lipid of rats 6 hr after intubation of ^{14}C -labeled compounds.

Distribution	Fractions administered		
	MLHPO (%)	Polymer (%)	LMW (%)
0*	89.2	52.4	81.0
1	10.8	47.6	19.0
2	0.0	0.0	0.0
3, 4	0.0	0.0	0.0

* Number of double bond of fatty acids.

多くの ^{14}C が検出された。ジエン、トリエン、テトラエンなどのポリエン酸への ^{14}C 分布は、いずれの場合も認められなかった。

肝総脂質から得た構成脂肪酸メチルエステルを水素添加し、逆相 TLC で脂肪酸を炭素数の差により分離した時の ^{14}C 分布を Table 5 に示した。各酸化物を投与した場合とも、ラット肝総脂質の構成脂肪酸のうち炭素数 16 に最も多く、ついで炭素数 18 の脂肪酸に多く ^{14}C が取り込まれていた。この場合、投与した各酸化物による差は認められなかった。MLHPO 投与の場合、炭素数 20 の脂肪酸への ^{14}C 分布も認められた。

考 察

本実験では油脂劣化で生じる低分子の二次酸化生成物の強い毒性の原因を探るため、U- ^{14}C ラベルリノール酸から調製した MLHPO と、おもに MLHPO 二量体から成る polymer および低分子化合物の 3 画分を、それぞれラットに経口投与したときの、肝臓脂質への ^{14}C 分布の比較を行なった。前報⁷⁾ですでに明らかにしたように、この場合の低分子化合物 (LMW) のなかには 4-ヒドロキシ (ヒドロペルオキシ)-2-ノネナール、8-ヒドロキシ (ヒドロペルオキシ) メチルオクタノエートおよび 10-フォルミルメチル-9-デセノエートがその主成分として含まれていた。

^{14}C ラベル酸化物をラットに経口投与すると、LMW 投与の場合、呼気 $^{14}\text{CO}_2$ 排泄量は投与後 2~4 時間で MLHPO や polymer 投与の場合の約 5.5 倍、4~6 時間後で約 3.5 倍に達する⁷⁾。Table 1 に示されたように、投与 6 時間後の肝臓中の ^{14}C 量は、LMW の場合全投与量の 6.9% であり、MLHPO や polymer の取込まれ率 (それぞれ 2.3, 2.2%) より高く、この結果は前報⁷⁾と一致した。すなわち、LMW はラット体内に吸収移行されやすいことを示した。しかし、肝の脂溶性画分中への ^{14}C 分布は、MLHPO (全肝臓中 ^{14}C の 40.1%) や

Table 5. Distribution of radioactivity in fatty acids derived from liver total lipid of rats 6 hr after intubation of ^{14}C -labeled compounds.

Distribution	Fractions administered		
	MLHPO (%)	Polymer (%)	LMW (%)
14*≤	0.0	0.0	0.0
16	73.0	89.2	77.8
18	19.7	10.8	22.2
20	7.3	0.0	0.0
22≥	0.0	0.0	0.0

* Carbon number of fatty acids.

polymer (33.7%) に比べ、LMW では 9.4% であり、LMW が脂溶性画分中にあまり多くは取り込まれていないことがわかった (Table 1)。これは、LMW が MLHPO や polymer より肝脂質として再利用されにくいことを示すと思われた。よって、肝臓では、脂溶性区分より水溶性区分に LMW 由来の ^{14}C が取り込まれやすいと考えられ、LMW の分子量やヒドロキシル基やアルデヒド基などの極性官能基の存在がこの結果に大きく影響していると考えられた。

Esterbauer ら¹³⁾¹²⁾ は、種々の飽和および不飽和アルデヒド化合物が還元型グルタチオンやシステインの SH 基に反応してアダクトを形成することを明らかにしている。また、アルデヒドはアミノ酸とジップ塩基様物質を形成する。よって、アルデヒド基を含む化合物からおもに成っている LMW が肝臓中で、タンパク質やアミノ酸のアミノ基とアダクトを形成して水溶性区分に多く存在することが示唆された。ヒドロキシ (ヒドロペルオキシ) アルケナールがチトクロム c などを変性させたり、リパーゼやグルコース 6-ホスファターゼを失活させることが知られている¹³⁾¹⁴⁾。水溶性区分中に LMW- ^{14}C が多く分布しやすいことを考え合わせると、LMW の強い毒性の原因の一つとして、このような酵素失活作用による肝機能低下も考えられた。

肝臓の脂溶性成分に取り込まれた MLHPO, polymer, LMW 由来の ^{14}C は、ほとんどがヒドロキシル基やヒドロペルオキシ基をもたない普通の脂肪酸として存在し、その大部分は炭素数 16 や 18 の飽和脂肪酸で、おもにトリグリセリドやリン脂質の構成脂肪酸になっていることがわかった (Table 2~5)。これらの結果は、肝臓の脂溶性画分に取り込まれる LMW の大部分は、一度分解反応を受けたのち脂肪酸に再合成され、他の脂肪酸と同様に肝脂質として再利用されていることを示唆している。 ^{14}C -MLHPO のラットにおける代謝実験において

は、肝臓の脂溶性画分に取り込まれた MLHPO の一部が、グルタチオンペルオキシダーゼなどによる還元や脱水反応を受け、ジエン酸やトリエン酸になりトリグリセリドやリン脂質の構成脂肪酸になるという Bergan ら¹⁵⁾の説もある。しかし、今回の実験では、肝臓中の構成脂肪酸のうち、ジエン酸やトリエン酸からは ^{14}C はまったく検出されず、この説とは明らかに異なった結果が得られた。中津川、金田¹⁶⁾は、ラットに MLHPO を経口投与した場合、腸間リン液に投与量の 0.23% ではあるが未変化の MLHPO が存在していることを高速液体クロマトグラフィーを用いた実験で確認している。polymer や LMW 区分中のヒドロペルオキシド基などの官能基をもつ化合物についてもごく微量ながら未変化で肝臓中に取り込まれて、毒性発現の一因となる可能性も考えられた。

今回の実験では、下痢をしない程度の少量の酸化物をラットに投与してその吸収と肝脂質への代謝を調べた。酸化物をより大量に投与したり連続的に与えた場合、あるいは投与前の絶食処理の仕方によっては、 ^{14}C の吸収移行のされ方が本実験と異なる場合もあると思われる。

本実験で示された肝脂質への酸化物の取込みは、ラット体内での酸化油脂の無毒化ないし再利用を反映したものであろう。LMW の強い毒性発現のメカニズムを知るためには、肝臓の水溶性成分中の存在形態について、また糞中への排泄形態についても究明していく必要があると思われる。

要 約

^{14}C -ラベルしたリノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLHPO)、polymer 画分 (おもに MLHPO 二量体から成る) およびヒドロキシ (ヒドロペルオキシ) アルケナールを多く含む低分子分解産物 (LMW) をそれぞれ 50 mg ずつ体重 200 g のラットに経口投与し、投与 6 時間後の肝臓中の脂溶性成分への ^{14}C の分布を調べ、これら脂質酸化産物の代謝系を比較した。

本実験では下痢をおこさない程度の比較的少量の酸化物を投与した。MLHPO 投与の場合、全投与量の 2.3%、polymer では 2.2%、LMW では 6.9% の ^{14}C が肝臓に取り込まれた。肝臓の全 ^{14}C のうち脂溶性区分に存在した ^{14}C 量は、MLHPO 投与の場合 40.1%、polymer

の場合 33.7%、LMW では 9.4% であった。よって、LMW は MLHPO や polymer より肝臓に取り込まれやすいが、脂溶性成分としては多くは存在しないことがわかった。MLHPO、polymer および LMW 投与の場合とも、 ^{14}C は肝臓のトリグリセリドとリン脂質に多く分布し、これら肝脂質の構成脂肪酸のうちとくにノルマルの炭素数が 16 と 18 で飽和酸ないしモノエン酸として存在することがわかった。これら肝脂質への再利用は油脂酸化物の無毒化を反映したと思われる。LMW の強い毒性は、肝臓への吸収のされやすさ、LMW に含まれるアルデヒド基などの極性官能基の存在、および水溶性区分への取り込まれやすさが、大きく関係していると思われる。

文 献

- 1) 金田尚志：過酸化脂質と栄養（五十嵐脩，金田尚志，福岡博保，美濃 真編），51（1986），光生館（東京）
- 2) 五十嵐脩，宮沢陽夫：過酸化脂質と生体（内山 充，松尾光芳，嵯峨井勝編），79（1985），学会出版センター（東京）
- 3) 白 台鴻，金田尚志：栄養と食糧，29，85（1976）
- 4) 白 台鴻，金田尚志：油化学，27，851（1978）
- 5) 吉岡倭子，金田尚志：油化学，21，316（1972）
- 6) 吉岡倭子，金田尚志：油化学，23，321（1974）
- 7) Oarada, M., Miyazawa, T. and Kaneda, T.: *Lipids*, 21, 150（1986）
- 8) Folch, J., Lees, M. and Sloanestanley, G.H.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497（1957）
- 9) Privett, O.S., Blank, M.L., Cooding, D.W. and Nickell, E.C.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 42, 381（1965）
- 10) Malins, D.C. and Mangold, H.K.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 37, 576（1960）
- 11) Esterbauer, H., Ertl, A. and Scholz, N.: *Tetrahedron*, 32, 285（1976）
- 12) Esterbauer, H., Zollner, H. and Scholz, N.: *Z. Naturforsch.*, 30 c, 466（1975）
- 13) 吉岡倭子，鈴木勝久，金田尚志：油化学，21，881（1972）
- 14) Benedetti, A., Comporti, M. and Esterbauer, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 620, 281（1980）
- 15) Bergan, J.G. and Draper, H.H.: *Lipids*, 5, 976（1970）
- 16) 中津川研一，金田尚志：油化学，32，361（1983）

（昭和 61 年 8 月 25 日受理）