過酸化油脂の毒性

松下 雪郎
(Setsuro MATSUSHITA)
京都大学食糧科学研究所

油脂の酸化は食品の風味と関連するので真剣に研究されている。しかし、大部分は酸化のごく初期の問題に関するものである。たしかに食品工業において問題となるのは初期の段階である。ところが、運悪く店頭に長期間さらされた加工食品では、酸化が極端に進んで中毒を起こすことがある。しばしば起こる問題であってはならないが、酸化油脂の毒性についての認識を持っておくことも必要であろう。

酸化油脂の毒性については、近年ようやく研究もふえ、毒性の本体もつかむことができるようになってきている。それは明らかに二つの問題より成るようである。すなわち、常温において酸化した自動酸化油の毒性と、調理や加工に使用した高温加熱油の毒性とである。

油脂の自動酸化において最初に生ずる中間生成物がヒドロペルオキシドであることは、すでに広く認められている⁽¹⁻⁵⁾。そのペルオキシドは熱に対して不安定であり、100°C 以上ではすみやかに分解されるが、室温に放置した食品ではヒドロペルオキシドが蓄積して毒性を示すことがある。一方、高温に加熱した油脂中に生ずる環状化合物の毒性も非常に恐るべきものであるが、その問題については、松尾^(6,7)、Kaunitz⁽⁸⁾、Kummerow⁽⁹⁾らの総説にくわしい。ここでは、主として自動酸化において問題となる、ヒドロペルオキシド（過酸化物）の毒性ならびに毒性機構に関する問題を整理してみたい。

1. 高温加熱油と自動酸化油の相違

油脂を空気中で加熱するときは、酸化も同時に起こるので、加熱と酸化は分けて考えにくい。空気存在下に油脂を加熱すると、次のような反応が起こる。まず、

(i) 不飽和脂肪酸のヒドロペルオキシド (LOOH)

が生ずる。

(ii) ヒドロペルオキシドは分解してカルボニルやヒドロキシン酸などを生ずる。

(iii) 一部は重合し、環状化合物も生ずる。

(i), (ii) の反応は低温での自動酸化油にも起こるが、(iii) の反応は主として加熱油に起こる。

加熱 (120, 160, 180°C) によっては、表 1 にみられ

表 1 コーン油の酸化と加熱温度 (Johnson)⁽¹⁰⁾

	酸 化 温 度			
	新鮮油	120°C	160°C	200°C
ヨウ素価	122	105	102	100
過酸化物価	1	81	6	2
酸 価	0.16	1.9	1.8	1.3
ケン化価	186	198	198	200
屈折率(25°C)	1.473	1.475	1.476	1.479
粘度(25°C)	0.65	1.00	1.65	2.50

24 時間通気, 150 ml/min/kg 油脂。

るような化学変化が起こる⁽¹⁰⁾。加熱温度によるヨウ素価の違いはあまりない。160°C と 200°C 加熱の過酸化物価 (POV) は、120°C 加熱に比べて低い。そのことは、過酸化物が熱に対して不安定であることを示している。屈折率の増加は油脂中に生ずる重合体の増加と比例するものであるが、変化の大きいのは 200°C 加熱の場合であって、高温では重合体形成が急速に起こることがわかる。加熱油では過酸化物はあまり問題とはならない。

低温での過酸化物の生成は図 1 にみられるごとくである。それは、イカ油から調製した高度不飽和脂肪酸エス

図1 脂肪酸エステルを空气中で酸化したときの過酸化値 (I) とヨウ素価 (II) の変化 (松尾, 1962)⁽⁶⁾

テルの混合物を酸化したものである⁽⁶⁾。2~18°Cの室温に放置したもので、2週間にわたって過酸化物の生成はほとんどみられないが、そのあと急にふえる。42日目まで最高で、過酸化物量は4,400 mg/100 g、ヨウ素価208となる。そのあと減少して過酸化物1,200、ヨウ素価120に下がる。その間、エステルは漸次粘度を増し、黄褐色に変わる。30°Cでは過酸化物の生成は早くなるが、最高値は室温酸化の場合に比べて低い。100°Cにおいては過酸化物が240に止まる。温度が高くなれば過酸化物の分解が速く進むからである。室温においては毒性を示すに十分な過酸化物の蓄積が容易に起こる。

2. ネズミの飼育試験

毒性に関する初期の研究では、自動酸化油が飼料中の微量栄養素を酸

化分解し、そのために毒性が現われるものと考えた⁽¹¹⁾。しかしながら、ビタミン類を別に投与しても毒性をなくすることができなかったことから、酸化油自体に毒性があると考えられるようになった。

Kaunitz⁽¹²⁻¹⁴⁾らは、脂肪以外の成分を十分に含む基本飼料にラウリン酸とミリスチン酸の過酸化物を添加して、離乳期のネズミを飼育した。ビタミンとリノール酸とは、過酸化物による分解を避けるために別に投与している。それによると、過酸化物を与えたものは低脂肪区(2% リノール酸添加)に比べても成長が悪く、酸化した綿実油を与えたものはさらに悪かった。しかし、食いの良否も影響するので、生育の悪さは必ずしも過酸化物によるとはいいきれず、また、一般に酸化油で飼育したネズミでは肝臓と腎臓が肥大するのに、上記脂肪酸過酸化物を投与した場合には肥大がみられなかったことから、彼らは毒性はむしろ酸化油の分解産物によるものではないから、彼らの主張は全面的には受け入れにくい。

これに対して金田⁽¹⁵⁻¹⁷⁾や松尾⁽⁶⁾は、高度不飽和油である魚油が、新鮮なときは毒性を持たないが、空气中にさらすと急速に毒性を持つようになることを示した。さらに、毒性の強さは過酸化物濃度に比例するという。図2は、酸化前のイカ油ではネズミはよく成長するが、自動酸化油を投与するとネズミはやせ細り、ついには死に至ることを示している。その結果、松尾は魚油の毒作用は自動酸化により生ずる過酸化物によると結論した。ただし、過酸化物100 mg/油脂100 g程度のものでは毒性が現われず⁽¹⁸⁾、この点はCrampton⁽¹⁹⁾やAndrews⁽²⁰⁾らの得た結果とも一致している。後者の実験によると、酸

図2 イカ油によるネズミの飼育 (松尾, 1962)⁽⁶⁾

A) 20% 生イカ油添加。

B) 20% 自動酸化油添加, カーブの終りは死を意味する。

図 3 脂質の過酸化作用により *in vivo* において起こる反応の仮説⁽²⁶⁾

破線より上の部分は初期の脂質の過酸化反応と抗酸化反応、破線の下は二次的な脂質の酸化。
AH は抗酸化剤。

- (a) 脂質膜の切断面, (b) フリーラジカルが生成, (c) 酸素の結合,
(d) ヒドロペルオキシドの生成と新たなラジカルの生成, (e) 抗酸化剤による連鎖反応の中断,
(f) フリーラジカル相互の反応によって連鎖がとまる, (g) 膜に孔があく, (h) セロイド色素の生成。

化した植物油を 15% 加えた飼料でネズミを飼育するとき、過酸化価 (POV) 100 の油では成長の速さや外観に影響は現れないが、POV 400 の油では成長は止まり、さらに POV 1,200 となるとネズミは短時間で死に至る。

これらの実験では、影響をはっきりと出すために極端な処理をした油を用いている。そのような極端な油脂の酸化は、よほど悪い条件が重ならないかぎり日常生活においては起こりにくい⁽²¹⁾。しかし、時には酸化油によると思われる中毒事件の報告もあり、また、たとえ少量でも長期にわたる酸化油の摂取が生活に影響を及ぼさないとはいえない。

3. 過酸化物の阻害する生理作用

酸化油はネズミの成長を阻害し、さらには死に至らしめるものであるが、どのような生理作用がおこえられるのだろうか。

a) ミトコンドリアに対する作用

ミトコンドリアに UV を照射するか、ミトコンドリアをアスコルビン酸とともにインキュベートすると、コハ

ク酸オキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ活性などが阻害される⁽²²⁾が、グルタチオンの添加によってコハク酸オキシダーゼの 1/3 は回復した。UV 照射は明らかに油脂の酸化を促進し、アスコルビン酸もまたその効果を示すことから、酵素活性の阻害は油脂の酸化に原因があると考えられた。

O'Brien⁽²³⁾は酸素吸収に対する過酸化物の影響をしらべたが、4 mg のミトコンドリアに対して $10^{-5}M$ の過酸化物が存在するとコハク酸酸化が阻害された。また、チトクロームの Soret ピークが急速に消失すると報告した。Soret ピークの消失はミクロソームにおいてはより明瞭に観察され、油脂酸化物のかわりに過酸化水素を加えても、それら顆粒中のチトクロームの Soret ピークに影響はない。共存するカタラーゼによって分解されてしまうからであろう。

McKnight⁽²⁴⁾はネズミ肝臓ミトコンドリアのけん濁液に Fe^{2+} の触媒で油脂過酸化物を生ぜしめたところ、濁度は減少し、ミトコンドリアではタンパク質の 65%、脂質の 35% が失われた。ゴーストができたためである。補酵素類や酵素タンパク質は浸出して減少する。

b) 膜組織に対する作用

不飽和脂肪酸の存在するのは中性油中だけではない。ホスホリピドの構成脂肪酸のうち、50% は高度不飽和脂肪酸よりなる⁽²⁵⁾。ホスホリピドとタンパク質は層状をなし、いわゆるユニットメンブランを形成している。その膜組織に自動酸化が起これば、図3の模型に示されるように、膜は破壊されると考えられる⁽²⁶⁾。その結果、膜における物質の移入や流出の調節は、まったくきかなくなるだろう。ミトコンドリアのゴーストができるのも、そのためである。

c) その他

ネズミの飼料中にリノール酸メチルの過酸化物を加えると、4時間後にリンパ液中に現われるべき脂肪酸が見あたらぬことから、過酸化物は油脂の吸収を阻害すると考えられた⁽²⁷⁾。また、 α -トコフェロール欠乏のネズミの肝臓ミクロソームでは、L-グルコノラクトンからL-アスコルビン酸を生成する系の活性が低下し、同時に油脂過酸化物も生じていることが見いだされた。すなわち、アスコルビン酸合成系が過酸化物によって阻害されると解釈される⁽²⁸⁾。リノール酸とリノレン酸からの水溶性産物は *Ehrlich ascites tumor* 細胞の呼吸と解糖を阻害し⁽²⁹⁾、酵母では細胞分裂が阻害される⁽³⁰⁾。植物^(31,32)に対しても、油脂の酸化による発芽の阻害、酸素圧を高めると膜が損傷してタンパク質が浸出すること、過酸化物 10^{-5} ~ 10^{-3} M 濃度では生育が阻害される現象などが観察されている。なお、これら害作用はインドールや α -トコフェロールの添加で軽減される。

4. 低分子物質との反応

上記のような生理作用の阻害は、分子レベルではどのような反応に基づくのだろうか。それを低分子物質あるいは酵素タンパク質との化学的反応としてとらえようとした研究が進められている。Tappel や O'Brien の仕事それがそれである。

a) SH-化合物

O'Brien⁽³³⁾によると、リノール酸過酸化物 (LAHPO, リノール酸を自動酸化させ、これを石油エーテルに溶解し、85% メタノールを加えると、過酸化物はアルコール層へ移る) は、ヘマチンあるいはチトクローム c の触媒でグルタチオン (GSH) を酸化する。pH 8.5 では、1モル LAHPO 当り 0.7 モル SH が酸化される。そこへ NADPH₂ あるいはグルタチオンレダクターゼを加えると、酸化物の 60% までは元にもどるから、GSH の酸化生成物の 60% は GSSG の形であるが、残りの 40

% はさらに酸化の進んだスルホン酸の形にまでなっていると推定される。

Roubal⁽³⁴⁾によると、システインにアラキドン酸エチルと緩衝液を加えて 37°C でインキュベートすると、酸素の吸収に比例して H₂S が発生する。不気発部分にはシスチンと微量のアラニンが見いだされ、酸化の中間体は見られなかった。コムギ粉をねるとき H₂S の発生が見られる現象も⁽³⁵⁾、過酸化物と関連があるようである。

SH 基の酸化は、水素の引抜きにより、フリーラジカルである中間体 RS[•] が生じ、続いてジスルフィドが形成されると考えられている (後出)。RSH 結合のフリーラジカルによる分解は、最終的には H₂S の発生となる。イオン化照射による含硫アミノ酸の分解^(36,37) についてはよく研究が進んでいるが、それと同じに考えてよいようである。

b) L-アスコルビン酸

アスコルビン酸が過酸化物により酸化されるのは当然のこととして、その反応の詳細を記載した文献は少ない。

c) ビタミンA

ビタミンA欠乏食中に酸化油を加えると欠乏症状が強くなる⁽³⁸⁾ことや、不飽和脂肪酸中に存在するカロチンが脂肪酸の酸化とともに急速に分解されることが知られている^(39,40)。また、ビタミンAの 50% エタノール溶液に LAHPO または過酸化水素を加えても変化はないが、触媒としてヘマチン化合物を添加すると 326m μ の吸収帯が減少する⁽⁴¹⁾。それは、過酸化物の分解⁽⁴²⁾ 過程に生ずるラジカルによって酸化が進むためと説明される。吸光度の減少するのは、共役二重結合への影響によるものである。この点は、過酸化物がポルフィリン環に作用したときに起こる効果と類似している⁽⁴³⁾。 β -カロチンはビタミンAより抵抗性が強いが、酸化によっては 450 m μ の吸光度が減少し、339 m μ の吸収が現われる。それは、トランス-シスの異性化が起こったためと考えられている。

ビタミンAの酸化速度は pH が低いほど大となる。なお、他の過酸化物によるビタミンAの酸化速度はおそく、LAHPO に比べ過酸化水素 ($\times 50$)、ブチルヒドロペルオキシド ($\times 200$)、ベンゾイルペルオキシド ($\times 1,000$) である。また、溶媒の極性が増大すると酸化速度は速くなる。アスコルビン酸、尿酸、システイン、 α -トコフェロールなどはビタミンAの酸化を防止することができるが、LAHPO がこれら水素供与体を酸化してしまうとビタミンAも酸化を受けるようになる。次いでヘマチン化合物が酸化される。

d) α -トコフェロール

α -トコフェロールの生物学的機能の1つは、油脂に対する抗酸化剤としての働きにあると考えられている⁽⁴⁴⁾。 α -トコフェロールをヘマチンを触媒とするリノール酸の空気酸化に対して抗酸化剤として用いると、35%は α -トコフェリルキノンとなり⁽⁴⁵⁾、同時に二量体も生ずるといわれる⁽⁴⁶⁾。また、含水エタノール中でヘマチンを触媒とする LAHPO と α -トコフェロールとの反応では二量体、三量体も生ずるが、主に生ずるのは α -トコフェロンであったといわれる⁽⁴⁷⁾。このものは、分解すると α -トコフェリルキノンになるものである。pH 7 におけるトコフェロールの酸化は、アスコルビン酸、尿酸、システイン、 NADH_2 、ビタミンAによって阻止される。

e) ATP

Tappel ら⁽⁴⁸⁾は、油脂過酸化物とヌクレオチドとの反応モデルとして ATP をとりあげた。アラキドン酸と ATP とをリン酸緩衝液 pH 7 中に乳化し、37°C にインキュベートすると、アデノシン、AMP、ADP が生成し、その他の分解物は見られなかった。したがって、そこに起こる反応はリン酸基の切断のみであると考えられる。ADP をイオン化照射するとき⁽⁴⁹⁾は、イオン対当たり 0.3 モルの ADP が分解されることが示されているが、油脂過酸化物のヌクレオチドに対する効率は低く、フリーラジカル当たり 2×10^{-5} モル ATP が分解されるにすぎない。定性的にはイオン照射と過酸化反応による損傷とは類似するが、強さの違いから、イオン化照射では中間体が見つからず、アデニンだけが見いだされる。

5. SH-酵素の失活

ウサギ筋肉中のグリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPD) は SH-酵素であって、過酸化水素によって不活性化する⁽⁵⁰⁾ことが知られている。これに LAHPO を作用させると過酸化水素に比べて失活の速度が遅いが、それは分子の大きさによる立体障害と考えられる⁽⁵¹⁾。LAHPO で失活した酵素活性は、pH 7.6, 5 mM のシステインの添加で回復する。しかし、時間がたつともはや回復がみられなくなるので、酵素の不活性化にはまず急速な可逆的な SH-基の酸化に続いて、不可逆的な変化が起こるものと考えられる。

LAHPO はカタラーゼに対して抵抗性があるので、種類の細胞に対して働くことができる。*Ehrlich ascites tumor* 細胞に対する作用を例にとる⁽⁵²⁾と、LAHPO 溶液はこれら細胞の嫌氣的ならびに好氣的解糖系を阻害し、酸素の消費は減少する。腫瘍細胞から単離した GAPD

とラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH) に、LAHPO を 2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で加えると完全に失活した。もし LAHPO を ZnCl_2 で化学的に還元しておく、失活はほとんど起こらない。それで、呼吸の阻害されたのは、SH-酵素である GAPD と LDH の SH-基が過酸化物によって酸化されたことによると考えられる。ところが、過酸化物を ZnCl_2 で完全に還元して用いても阻害作用がどうしても少し残ることから、Schauenstein⁽⁵²⁾ は過酸化物以外の化合物にも注目した。 ZnCl_2 処理によってはカルボニル化合物は変化しないから、その非過酸化物はカルボニル化合物の可能性が高いと思われたが、結局、有効成分の1つは 4-ヒドロキシオクタ-2-エン-1-アル (HOE) と同定された。この物質も SH-基を持つ酵素に対して反応性が高い。HOE の水に対する溶解度は 8 mM であるが、それに対し 100 倍量のシステインを加えると阻害効果を防ぐことができる。HOE をウサギの GAPD に加えると分子当たり 4 モルのアルデヒドが結合するが、それは酵素の活性 SH-基の数に相当する。

6. タンパク質に対する化学作用

a) 不溶性重合体の形成

タンパク質と自動酸化した不飽和脂肪酸との間の相互作用を、酵素活性よりはむしろ化学的作用の面から究明しようとの研究がある。Andrews⁽⁵³⁾ は、精製タンパク質としてインシュリンとゼラチンを用い、リノール酸とインキュベートすると化学的修飾が起きた。分析の結果、インシュリンの末端アミノ酸であるフェニルアラニンとグリシンとがリジンの ϵ -アミノ基と反応していた。また、フッ化水素による溶解度テストや加水分解物の検討から、タンパク質分子間に交差があり、新しい化学結合が生じていることが明らかになった。そのような反応により重合が起こることは、*in vivo* において生ずる Ceroid 型色素が過酸化油-タンパク質複合体であること⁽⁵⁴⁾や、過酸化油-タンパク質の相互作用によって褐色の重合体様の物質が生ずること⁽⁵⁵⁾からもわかっていた。

また、Desai ら⁽⁵⁶⁾の実験は次のようである。1 g のリ

表 2 リノレン酸過酸化物のチトクローム c に与える損傷と付加 (Desai)⁽⁵⁶⁾

酸化 (モル O_2 /モル リノレン酸)	リノレン酸の付加 (モルリノレン酸/モ ルチトクローム c)	溶解度 (元に対す る%)	損傷チトクロ ーム c モル/過酸 化物ラジカル
0.01	0.03	62	0.400
0.10	0.04	34	0.070
0.50	0.22	21	0.017
1.00	0.99	3	0.010

表 3 リノレン酸過酸化物によるチトクローム c 構成
アミノ酸の損傷 (Desai)⁽⁵⁶⁾

アミノ酸	アミノ酸分析		
	純粋なチト クローム c	リノレン酸 過酸化物- チトクローム c 複合体	欠 損
フェニルアラニン	19.8 mmol/100g	14.9 mmol/100g	24.8%
ロ イ シ ン	30.1	21.9	27.2
イソロイシン	29.5	22.5	23.7
メチオニン	21.6	13.3	38.3
バ リ ン	21.2	10.8	49.3
チ ロ シ ン	11.7	8.1	31.0
トレオニン	54.5	38.0	30.3
アラニン	23.7	16.5	30.3
セ リ ン	12.6	5.7	54.6
グ リ シ ン	22.7	16.8	26.0
ヒスチジン	19.8	8.2	58.8
グルタミン酸	37.4	28.6	23.5
アスパラギン酸	25.0	18.2	27.2
アルギニン	16.5	9.6	41.9
リ ジ ン	23.9	19.8	17.2
シスチン	22.5	14.7	34.7
プロリン	31.4	14.7	53.2

ノレン酸と 0.5 g のチトクローム c を溶解した 2.5 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7 を混ぜ、さらに 25 μ g のリノレン酸-1-¹⁴C を加えて 37°C にインキュベートした。表 2 にみられるように、リノレン酸の酸化が進むにつれて、チトクローム c の溶解度が落ち、同時にリノレン酸のチトクローム c へのとり込みが増大することがわかる。しかし、酸化の程度が低いあたりでのチトクロームの損傷は、大部分がラジカル酸化によると考えられる。すなわち、低い酸化の状態 (0.01 モル O₂/リノレン酸) では 2.5 過酸化物ラジカル当り 1 分子のチトクローム c を不活性化させるが、83 過酸化物ラジカル当り 1 つだけが付加反応 (¹⁴C のとり込み) をするにすぎない。なお、不溶化したものについてアミノ酸の変化をみたのが表 3 である。すべてのアミノ酸にわたって 17% 以上の損失がみられる。これは驚くべき数値である。そのうち過酸化物による損傷を受けやすいアミノ酸は、ヒスチジン、セリン、プロリン、アルギニンなどに次いで含硫アミノ酸である。これらアミノ酸の損傷の機構は、おそらく個々のアミノ酸からの水素の引抜きと、過酸化物ラジカルのアミノ酸への結合によると考えられる。

リノレン酸過酸化物-チトクローム c 複合体と純粋なチトクローム c との赤外吸収スペクトルの比較からも、酸基の CO の伸び、直鎖エーテル (-C-O-C-)、共役二重結合、アルキルヒドロペルオキシドの存在を示す特異なバンドの出現から、リノレン酸のタンパク質への結合

表 4 リノレン酸過酸化物-チトクローム c 複合体 (Desai)⁽⁵⁶⁾

	加水分解前 加水分解後			
	過酸化の程度 (モル O ₂ /モル リノレン酸)			
	0.5	1.0	0.5	1.0
TBA (mg マロンアルデヒド/1,000 g)	0	0	0.072	0.165
過酸化物 (ミリ当量過酸化物/100 g) 抽出可能脂質 (重量パーセント/全重合体) (重量パーセント/重合体中脂質)	143.8	268.8	0	12.5
	0	0	9.8	13.4
			70	70

が示される。
リノレン酸過酸化物-チトクローム c 複合体は TBA 反応を示さないが、高い過酸化物値を示す (表 4)。加水分解後、10% 前後の結合脂質は油脂溶媒で再抽出される。酸加水分解 (2.5 N HCl) では特異的に油脂重合体中の過酸化結合を切るので⁽⁵⁷⁾、チトクローム c に結合している 70% は過酸化結合で、30% はより安定なエーテルあるいは -C-C- 結合であろうと推定される。加水分解物は高い TBA 値を示すが、もはや過酸化物は含まれないはずであるから、アルデヒド化合物の存在によるのであろう。他のタンパク質についても同様の結果が得られている⁽³⁴⁾。

これらの結果から、リノレン酸過酸化物とタンパク質との反応機構は次のように一般化される。その詳しい機構はわかっていないが、イオン化照射のタンパク質に対する損傷は HO $\cdot$ と HOO $\cdot$ による酸化的反応にあるといわれるので、おそらく類似の反応が LO $\cdot$ と LOO $\cdot$ によって起こると推定される。まず、反応の始まりはタンパク質からの水素の引抜きである。

また、付加反応の起こることも明らかである。

さらに酸化が進むと、

ついには水に不溶となり、褐色を呈し、加水分解しにくくなる。

b) 可溶性重合体

比較的温和な条件では、可溶性の重合体が生ずる。Roubal⁽³⁴⁾ はその問題をとりあげた。0.05 g のチトクローム c を 0.5 ml の 0.05 M リン酸緩衝液、pH 7 に溶かし、50 μ g の 1-¹⁴C-リノール酸エチルを含む 0.1 g

図 4 水溶性のチトクローム c-エチルリノレン酸- ^{14}C 反応産物のセファデックスクロマトグラム (Roubal, 1966)⁽³⁴⁾

ピーク A: 分子量域 150,000
 ◇ B: ◇ 95,000
 ◇ C: ◇ 70,000
 ◇ D: ◇ 51,000 (四量体)
 ◇ E: ◇ 26,000 (二量体)
 ◇ F: ◇ 13,000 (単量体)
 ◇ G: イオン化照射したチトクローム c

のリノール酸エチルを混ぜ、 37°C でインキュベートした。可溶性重合体をセファデックスカラムを通して分画した結果が図 4 である。酸化の程度は、リノール酸エチル 1 モル当り 0.54 モルの O_2 を吸収した試料である。それぞれのピークに結合したリノール酸の量は、A から E へ、それぞれ 1 モルのチトクローム c 当り 0.063, 0.96, 0.33, 0.45, 0.18 モルとなっている。比較のために、イオン化照射したチトクローム (0.1% 溶液, pH 7, 10^7 rads) のクロマトグラムを示す (G)。そこには特定の分子量のものは見当たらず、分子量 13,000~15,000 の間にわたって広く分布している。このことは、重合体の形成と部分的な分解とが同時に起こっていることを意味する。

重合の機構には二つの道が考えられる。(i) 過酸化ラジカルの付加反応によるタンパク質の結合、(ii) 油脂をとり込まないタンパク質の交差結合。(i) の反応は、不溶性重合体の形成について上述した反応である。その反応によるとすれば、二量体 POOLLOOP では L と P の比が 0.5 となり、三量体ではさらに大きくなるはずである。しかし、実際にみられる値は 0.18 (チトクローム c 二量体) であった。POOLLOOPPOOLLOOP に対応する値は 0.75 であるが、チトクローム四量体について得られた値は 0.45 であって、いずれも低すぎる。このように、可溶性重合体への油脂のとり込みが低いのは、重合が主としてタンパク質に基づく (ii) の型であることを示している。すなわち、水素の引抜きにより生

じた P' によって重合が始まる。

このような重合化は、生化学系においては重要な意味を持つ。生細胞内でタンパク質間に交差が生ずることは、生化学的機能の損失を意味するからである。

c) イオン化照射の効果との類似性

過酸化油脂-タンパク質反応系においてはラジカルが生ずる。タンパク質に対するラジカルの反応は、イオン化照射によるタンパク質の損傷、すなわちタンパク質や酵素の失活とアミノ酸の分解にみられるところである。ただし、強さはかなり違うが、その間の比較はラジカル当り不溶化したタンパク質のモル数として表わせれば可能である。そうした結果から、油脂過酸化物による損傷はイオン化照射による損傷に比べてかなり低く、約 1/10 であった。そのように低いのは油脂反応系が 2 相よりなるためで、多くの過酸化ラジカルがタンパク質との反応で失われ、油相における連鎖反応が中断されるためであろう。イオン化照射によって失われやすいアミノ酸は、ヒスチジン、メチオニン、シスチン、フェニルアラニン、セリンなど^(58,59) であるが、これも過酸化物による損傷の多くのデータと類似している⁽³⁴⁾。

d) SH-基との反応

SH-基の酸化はまず $-\text{S}'$ ラジカルの生成にはじまり、続いて相競合する二つの反応に進む。

ジスルフィドの形成は、タンパク質においては立体因子のために妨げられるが、変性によっては起こりやすくなる。

LAHPO と H_2O_2 の種々の SH-基の酸化速度を比較し

表 5 種々の SH-基の酸化の速度 (Little)⁽⁶⁰⁾

SH-化合物	二次反応速度定数 ($\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$)	
	H_2O_2	LAHPO
生血清アルブミン	14	140
変性血清アルブミン	20	500
GSH	68	1,000
GSH+変性物	100	1,700
システイン	—	3,280

反応液は 100 μM SH-化合物, 100 μM 過酸化物, 触媒として 6 μM チトクローム c, 200 mM トリス-HCl, pH 8.5, 20°C .

たデータ (表 5) によると⁽⁶⁰⁾, 血清アルブミンよりも GSH やシステインの酸化のほうが速く, タンパク質の SH-基は変性によって速くなる. すべての SH-化合物について酸化力は LAHPO のほうが強い. LAHPO 当り酸化される SH-基の数を測定したデータによると, 1 を越えるものはなかった. もし, $2\text{RSH} + \text{LOOH} \rightarrow \text{RSSR} + \text{LOH} + \text{H}_2\text{O}$ の反応が起こるとすれば 2 となるはずであるから, 一部は酸化度の高いスルフェン酸, スルフィン酸, スルホン酸の生成へと反応は進んでいると考えられる. スルフェン酸でちょうど 1:1 となるはずである.

7. 油脂過酸化分解系

ヘムタンパク質が油脂ペルオキシ種の分解を触媒することはよく知られているが, LAHPO を肝臓細胞分画とともにインキュベートすると, 過酸化物がすみやかに分解される⁽²³⁾. Little ら⁽⁶¹⁾は, 肝臓上澄液中に LAHPO による GSH の酸化を触媒する酵素を見いだした. その酵素は, SH ことに GSH を特異的な H-供与体として過酸化物を基質とする過酸化酵素である (表 6). 最適

表 6 GSH ペルオキシダーゼの基質特異性 (Little)⁽⁶¹⁾

LAHPO と反応する SH-化合物		GSH と反応する過酸化物	
SH-化合物	反応速度 (1 分間に酸化される SH μM)	過酸化物	反応速度 ($E_{340}/\text{分}$)
GSH	13	LAHPO	0.04
システアミン	5.6	H_2O_2	0.028
システイン	2.7	クメン-OOH	0.052
チオグリコル酸	1.3	t-ブチル-OOH	0.036
		エチルリノレン酸-OOH	0.024

反応後 3 ml 中 0.25 mM SH-化合物, 0.15 mM 過酸化物, 5 μg 上澄タンパク質/ml, 0.1 M トリス, pH 8.5, 23°C.

pH は 9 で, それ以上では活性が落ちる. ヘムタンパク質による触媒作用ではやはり最適 pH は 9.2 であるが, それ以上になっても活性は変わらない. 生成物も酵素による場合は全部が GSSG に酸化されるので NADPH_2 で完全に元に戻るが, ヘムタンパク質の場合は GSSG の形は 60% にすぎない. 酵素のないときは 1 モル LAHPO で 0.7 モル GSH を酸化するが, 酵素の存在する場合には定量的に 1 モル LAHPO で 2 モルの GSH を酸化する. その酵素活性は pCMB と N-エチルマレイミドで阻害される. その酵素は血液, 肝臓に多く, 肝臓細胞内ではミトコンドリアと上澄部に分布する. この酵素は, すでに GSH-ペルオキシダーゼとして知られているものと⁽⁶²⁻⁶⁵⁾同じもののようである.

8. 抗酸化剤と過酸化物

抗酸化剤は不飽和脂肪酸の酸化の初期において生ずるラジカルをとらえて, 酸化の連鎖反応を止めるものであると考えられている. しかし, いったん蓄積した過酸化物に抗酸化剤を加えるとどうなるだろうか. 酵素に過酸化物を加えると失活が起こることはすでに述べたが, 酵素にあらかじめ抗酸化剤を加えてから過酸化物を加えると失活を防げることでテストすることができる (表 7).

表 7 LAHPO のリボヌクレアーゼ阻害に対する抗酸化剤の添加効果⁽⁶⁶⁾

添 加 物	濃 度			
	20	10	5	1 $\times 10^{-3}\text{M}$
システイン	72	37	14	6
GSH	86	72	24	11
BHA	90	28	13	8
BHT	86	58	25	9
プロピルガレート	46	26	11	9
α -トコフェロール	82	60	26	7
カゼイン*	99	74	60	8

* 0.2% より 0.01% まで.
リボヌクレアーゼ 0.01 mg, LAHPO 10^{-2}M , 10 分間プレインキュベーション, 値は LAHPO も添加物も含まない場合を 100 としてパーセントで示す.

過酸化物は酵素と反応するまえに, 抗酸化剤によって不活性化または消去されてしまう. 実験の結果からは, 過酸化物を除くためには抗酸化剤, あるいは可溶性のタンパク質を加えるのがよいようである.

9. おわりに

過酸化物の毒性に関する研究には, 極端に酸化させた油脂や脂肪酸が用いられている. そのような極端な酸化は日常生活においてはよほど悪い条件の重ならないかぎりには遭遇することはないであろう. しかし, 微量であっても過酸化物が毒物であることにはまちがいない. 生体中にはそれを防ぐような系があって, それを防ぐことができるにすぎない. ある量を越えるとき, 生体中の水素供与体が消費されつくし, SH-酵素は失活して膜組織などが損傷を受けることになる. 食品中の過酸化物が体内に吸収されるかどうか疑問はあるが, 生体中に不飽和脂肪酸は多量に存在し, また酸素も十分にあるので, 自動酸化が体内で起こることもまちがいはない. そのとき生じるラジカルが生体の老化の元になるとする説もあり, 実際にネズミでは抗酸化剤の投与によって生命を延長させることができたというニュースもある. 食品中の過酸化物とともに, 生体中の過酸化物の生成, およびそれら

の解毒に関する研究は、さらに進められなければならない問題であろう。

文 献

- 1) "Autoxidation and Antioxidants", Vol. I, ed. by W.O. Lundberg, Interscience Publish., New York, 1961.
- 2) "Lipids and Their Oxidation", eds. by H.W. Schultz et al., AVI Publish., Westport, 1962.
- 3) E. H. Farmer, G. F. Bloomfield, A. Sundralingam and D. A. Sutton : *Trans. Faraday Soc.*, **38**, 348 (1964).
- 4) D. Swern : 文献 1), p. 1.
- 5) E. N. Frankel : 文献 2), p. 51.
- 6) N. Matsuo : 文献 2), p. 321.
- 7) 松尾 登 : 日本油化学協会誌, **11**, 13 (1963).
- 8) H. Kaunitz : 文献 2), p. 269.
- 9) F. A. Kummerow : 文献 2), p. 294.
- 10) O. C. Johnson and F. A. Kummerow : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **34**, 407 (1957).
- 11) R. H. Barnes, W. O. Lundberg, H. T. Hanson and G. O. Burr : *J. Biol. Chem.*, **149**, 313 (1943).
- 12) H. Kaunitz : 文献 2), p. 269.
- 13) H. Kaunitz, C. A. Slanetz, R. E. Johnson and S. F. Hers : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 301 (1961).
- 14) H. Kaunitz, C. A. Slanetz, R. E. Johnson, H. B. Knight, D. H. Saunders and D. Swern : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **33**, 630 (1956).
- 15) 金田尚志, 石井清之助 : 日水産, **19**, 171 (1953).
- 16) 金田尚志, 桜井寿恵, 石井清之助 : 日水産, **20**, 50 (1954).
- 17) 金田尚志, 酒井寿恵, 石井清之助 : 日水産, **20**, 658 (1954).
- 18) N. Matsuo : *J. Biochem. (Tokyo)*, **41**, 481, 647 (1954).
- 19) E. W. Crampton, R. H. Common, F. A. Farmer, A. F. Wells and D. Crawford : *J. Nutrition*, **49**, 333 (1953).
- 20) J. S. Andrews, W. F. Griffith, J. F. Mead and R. A. Stein : *J. Nutrition*, **70**, 199 (1960).
- 21) J. B. Brown : *Nutrition Rev.*, **18**, 351 (1960).
- 22) A. Ottolenghi, F. Bernheim and K. M. Wilbur : *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 157 (1955).
- 23) P. J. O'Brien and A. C. Frazer : *Proc. Nutr. Soc.*, **25**, 9 (1966).
- 24) R. C. McKnight and F. E. Hunter, Jr. : *J. Biol. Chem.*, **241**, 2757 (1966).
- 25) F. D. Collins : *Nature*, **186**, 366 (1960).
- 26) L. A. Witting : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 908 (1965).
- 27) T. Nishida and F. A. Kummerow : *J. Lipid Res.*, **1**, 450 (1960).
- 28) A. E. Kitabachi, P. B. McCay, M. P. Carpenter, R. E. Trucco and R. Caputto : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1591 (1960).
- 29) C. W. Schuster : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **90**, 423 (1955).
- 30) J. Fränz and T. B. Cole : *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 382 (1962).
- 31) S. M. Siegel, L. Rosen and C. Giunarro : *Nature*, **198**, 1288 (1963).
- 32) S. M. Siegel and L. A. Halpern : *Plant Physiol.*, **40**, 792 (1965).
- 33) C. Little and P. J. O'Brien : *Biochem. J.*, **102**, 11p (1967).
- 34) W. T. Roubal and A. L. Tappel : *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 5 (1966).
- 35) D. Mecham : *Baker's Digest*, **42**, 26 (1968).
- 36) P. Markakis and A. L. Tappel : *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1613 (1960).
- 37) F. Shimazu and A. L. Tappel : *Radiation Res.*, **23**, 203 (1964).
- 38) C. Reporter and R. S. Harris : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 47 (1961).
- 39) R. T. Holman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **26**, 85 (1950).
- 40) A. L. Tappel : *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 473 (1954).
- 41) P. J. O'Brien : *Biochem. J.*, **103**, 32p (1967).
- 42) V. P. Maier and A. L. Tappel : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 8 (1959).
- 43) P. J. O'Brien : *Biochem. J.*, **101**, 12p (1966).
- 44) A. L. Tappel : 文献 2), p. 367.
- 45) F. W. Knapp and A. L. Tappel : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 151 (1961).
- 46) A. S. Csallany and H. H. Draper : *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 335 (1963).
- 47) P. J. O'Brien and G. Titmus : *Biochem. J.*, **103**, 33p (1967).
- 48) W. T. Roubal and A. L. Tappel : *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 402 (1967).
- 49) G. Hems and M. L. Eidinoff : *Radiation Res.*, **9**, 305 (1958).
- 50) A. Pihl and R. Lange : *J. Biol. Chem.*, **237**, 1356 (1962).
- 51) C. Little and P. J. O'Brien : *Biochem. J.*, **101**, 13p (1966).
- 52) E. Schauenstein : *J. Lipid Research*, **8**, 417 (1967).
- 53) F. Andrews, J. Bjorksten and F. B. Trenk : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 779 (1965).
- 54) D. D. Hendley, B. L. Strehler, M. C. Reporter and M. V. Gee : *Federation Proc.*, **20**, 298 (1961).
- 55) A. W. Venolia and A. L. Tappel : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **35**, 135 (1958).
- 56) I. D. Desai and A. L. Tappel : *J. Lipid Res.*, **4**, 204 (1963).
- 57) S. S. Chang and F. A. Kummerow : *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **30**, 403 (1953).
- 58) K. S. Ambe, U. S. Kumata and A. L. Tappel : *Radiation Res.*, **15**, 709 (1961).
- 59) U. S. Kumata, F. Shimazu and A. L. Tappel : *Radiation Res.*, **16**, 679 (1962).
- 60) C. Little and P. J. O'Brien : *Biochem. J.*, **106**, 419 (1968).
- 61) C. Little and P. J. O'Brien : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **31**, 145 (1968).
- 62) G. C. Mills : *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 1 (1960).
- 63) D. A. Neubert, T. H. Rose and A. L. Lehninger : *J. Biol. Chem.*, **237**, 2025 (1962).
- 64) D. A. Neubert, A. B. Wojtczak and A. L. Lehninger : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1651 (1962).
- 65) B. O. Christophersen : *Biochem. J.*, **100**, 95 (1966).
- 66) 松下雪郎, 小林雅代, 新田ゆき : 未発表.