脂質の栄養価に関する研究—XI. 高度不飽和酸の栄養価及び毒性について (2)

金田尚志・櫻井寿恵・石井清之助
(東海区水産研究所)

Studies on the Nutritive Value of Lipids—X. Nutritive Value or Toxicity of Highly Unsaturated Fatty Acids (2) Takashi KANEDA, Hisae SAKURAI and Seinosuke ISHII

In the previous paper^{*} we have established that the nutritive value of highly unsaturated fatty acids is not much lower than that of oleic acid, and that long-believed toxicity of highly unsaturated acids is not produced by the acids themselves but actually by formation of autoxidized matters.

The observation led us to an assumption that natural unsaturated fatty acids around C_{18} , even if different in the autoxidation degree, would always become less nutritious by some autoxidation.

The assumption was confirmed by examining the toxic effect on rats of the autoxidized product which was prepared from the ethyl ester of liquid acids of linseed oil, as the rats were all died in a few days after the feeding.

On the basis of these findings our efforts have been extended to throwing light on the structure of the toxic product of the above description. The methods used for and the result obtained from the present test are as follows:

(1) The autoxidized products were prepared by leaving the original ethyl ester of liquid acids of linseed oil, about 3mm. deep in basin, open to atmospheric oxygen under 30°C , 50 hours.

(2) As shown in Table 1, the autoxidized products are fractionated by urea adduct formation, and the nutritive or retarding effects of each fractions are examined.

(3) Fraction 1 separated from the autoxidized products (consist mainly of un-autoxidized esters) does not give any retarding actions to the rats, however, fraction 2 and 3 which do not form urea adducts show the toxic effects on the animals (Table 5). From these results it is apparent that aldehydes have no harmful effect upon the rats.

(4) On the other hand, polymerized highly unsaturated fatty acids which contain small proportion of peroxide show the nutritive effects to the rats (Table 6) and no retarding effects are noticed.

(5) Judging from these results, the toxic effects which yield from the autoxidized acids should certainly be attributable mainly to production of peroxide-structure.

In order to prove this assumption, we liberated the peroxide of autoxidized products by Lea's peroxide-determination method.¹¹⁾ In consequence, peroxide liberated products became "not-toxic" (Table 7).

On the basis of this result we have come to conclusion that the most toxic structure in autoxidized unsaturated fatty acids is peroxide which has been produced at the beginning of autoxidation.

* Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries Vol. 19, 171(1953)

I 緒 言

筆者等は本研究の第8報¹⁾において、従来有毒とされていた高度不飽和酸は精製を十分に行えばいさゝかも毒性を示さぬことを認め、さらに従来信じられていた高度不飽和酸の毒性は高度不飽和酸そのものではなく、実は高度不飽和酸の自酸化生成物であることも明らかとした。この結果は高度不飽和酸ばかりとはかぎらず、不飽和脂肪酸全部についていえるのではないかと考え、アマニ油液体酸エチル・エステルを用い第8報に報じた方法と同様にして動物試験を行つたところ、果して全く同一の結果を得た。これ等の結果をもとにして考えると、不飽和酸は二重結合数を増すにつれ、酸化をうけ易くなることは当然だが、酸化されにくい不飽和酸でも一たん自酸化をうけたものはみな毒性を有するようになる。そこで不飽和酸の自酸化により生ずる酸化生成物のうち、毒性を示すものを分離し、その構造を究明しようと試みた。

この際筆者等は不飽和酸の自酸化により生ずるとされる過酸化物、共軛酸、重合物、アルデヒド、ケトン等の全部が同程度の毒性を示すのではなく、これ等のうちの特定のものが特に強い毒性を示し、その他のものは無毒か、ないしは弱い毒性しか示さぬだろうと予想した。

この考え方を証明するため、上記自酸化生成物を夫々分離し、そのおのおのについて動物試験を行うことにした。不飽和酸を自酸化させる場合、軽度の自酸化においては、もとの不飽和酸があまり変化することなくかなり残存する。また筆者等の第8報においても、こうした状態の時の毒性が最も強いことを認めている。

不飽和酸自酸化生成物の濃縮法としては従来幾つかの報告があるが最近のものを分類してみると、まづ Privett²⁾等は Skellysolve F とアルコールを用いて酸化生成物の分離を行い、Chang³⁾等は Skellysolve F とエーテルの混合比を変えて分別している。また Zilch⁴⁾、Fugger⁵⁾、Cannon⁶⁾、Privett²⁾等は向流分配法による分離を試み、Atherton、Hilditch⁷⁾等はシリカゲルを用いるクロマトグラフにより分離を行つた。更に数年来、尿素附加物による分離が Catravas⁸⁾、Coleman⁹⁾、Daniel Swern¹⁰⁾等により報告されている。

そこで筆者等もこれらの方法を用いて、自酸化生成物の分離を試みた。即ちまづ Privett 等の行つた方法に従い、石油エーテルと 85 % 酒精を用いて分離を計つた。ところが酸化生成物の大部分はアルコールに可溶となるが多少は石油エーテル可溶部にも残る。また動物試験により毒性の程度を調べると両者とも白鼠に対し有毒であつた。つまりこの方法は不飽和酸自酸化生成物を濃縮し、その性質を調べるためには有効だが、筆者等の望む完全に無毒な部分の分離には役立たぬことになる。そこで Atherton、Hilditch 等の行つたシリカゲルによるクロマトグラフを応用してみたところ、本法もシリカゲルに吸着されぬ部分に有毒成分が入りこむため目的を達し得なかつた。但しこれを更にアルミナを用いてクロマトを行うと、アルミナに吸着されぬ部分は全く無毒となる。しかしアルミナ層より吸着物を完全に溶出せしめることはかなり困難で各種溶剤を用いても完全には回収し得ず、しかも処理の途中において、試料は更に酸化をうける恐れが多分にあつた。

そこで尿素附加物による分離を試みたところ、自酸化せしめたアマニ油液体酸エチルのうち 75 % は尿素附加物を作り、動物試験の結果は全く無毒であつたが、尿素附加物を作らぬ部分は極めて強い毒性を示した。尿素附加物を作つた部分は未変化アマニ油液体酸及び比較的低分子の重合体及びアルデヒド等を含むが、過酸化物含量は僅かである。一方尿素附加物を作らぬ部分はアルデヒドは僅かしか存在せぬが、過酸化物質は高く、また共軛酸量も多い。更に分子量も前者に比しやゝ大きい。

これ等の結果よりしてアルデヒドはたいして毒性を有せず、毒性の本態は、側鎖を有する脂肪酸、ラクト

ン、重合物、共軛酸、過酸化物ということになる。ところで不飽和酸が重合する場合、低温と高温とでは重合物の性質が異なり、低温の場合には過酸化物価は高くなるが、高温の場合、過酸化物価は上らぬことを Atherton, Hilditch⁷⁾ 等はすでに認めているし、筆者等の実験においても同様の結果が得られている。

高度不飽和酸を高温で重合せしめ、沃素価を下げたものを用い、動物試験を行つてみると毒性は全く現れず、白鼠はよく成長する。この結果からして過酸化物を含め高度不飽和酸の重合物は無毒であることがわかる。また共軛二重結合を有する化合物には毒性を呈するものがあることが古くから知られている。筆者等の扱った不飽和酸低温酸化生成物は6%程度の共軛酸を含み、これは白鼠1日投与量としては0.03gに当る。試みに桐油を用いて共軛酸をこの5倍程度白鼠に与えてみるとほとんど毒性は現れぬ。このことから共軛構造は不飽和酸自酸化生成物の示す毒性の主因とは考えられぬ。

以上の結果よりして、不飽和酸酸化生成物中に含まれるもつとも毒性の強い部分は側鎖を有する脂肪酸ラクトンあるいは過酸化物に帰せざるを得ない。

即ち自酸化生成物中尿素附加物を作らぬ部分の分子量をラスト法により測定すると、原脂肪酸より多少分子量を増すにもかかわらず、その酸価は大きくなり、アルコール性苛性カリにより切断されやすいような形の側鎖、あるいはラクトンを分子中に含むことを認める。そこでこうした化合物の毒性の有無はひとまゝおき、酸化生成物の毒の本態を過酸化物として実験を進めてみた。

即ち過酸化物が主なる毒性を示すとすれば、自酸化生成物から過酸化物を除いたものの毒性は全くないか、あるいはごく微弱となるはずである。そこで過酸化物価定量の際と同一方法¹¹⁾を用い、沃度カリを酸化生成物に加え、過酸化物を除き、その毒性を調べたところ、予想の如く毒性は問題とならぬほど弱まり白鼠は斃死しない。(但し白鼠は多少下痢をおこした)。

以上の結果から、不飽和酸酸化生成物中最も毒性の強いものは過酸化物であることを認めたが、残された問題は過酸化物が体内でいかなる働きをするために毒性を生ずるかということである。自酸化生成物を径口投与する場合まづ過酸化物は白鼠の胃中において、胃液のため H_2O_2 を生じ、それが毒性を呈することが考えられる。そこで自酸化生成物に胃液の酸濃度に略々等しい0.7% HClを加え、40°Cの恒温器に時々振盪しつつ、2.5時間保ち生ずる H_2O_2 の量を人工的に定量したところ、生ずる H_2O_2 量はせいぜい0.4mg程度であつた。またオキシドールをこの10倍量白鼠に投与してみたが全く毒性は認められなかつた。一方0.7% HCl酸性に保つた酸化生成物の過酸化物量はあまり減少せず、これが体内に吸収される可能性が考えられる。

事実 Dubouloz¹²⁾ 等によれば白鼠に径口投与した過酸化物は1.5時間後、消化管中に略々その半量が見出されている。なお東京医大松尾氏¹³⁾はウサギに不飽和酸自酸化物を与えると、腸管の弾力がなくなつてしまうことを認めているが、これらの結果から考えると、腸管に達した酸化生成物が直接あるいは過酸化物から二次的に生じたものが腸壁をおかすために毒性が生ずるとも考えられる。

II 実験の部

A 供試アマニ油液体酸エテル： 常法により製したアマニ油混合脂肪酸に5倍量のアセトンを加え-15°Cに一夜放置し、析出する固体酸を濾別し、アセトンを減圧で除いた後エチル・エステルとし、更に真空蒸溜に附したものを石油エーテルに溶かし、アルミナを用いてクロマトグラフを行い出発物とした。本エステルを3mm程度の厚さにシャーレに流し30°C恒温器中に放置し自酸化せしめた。

本自酸化物100gをとり、これを尿素700gを溶かした無水メタノール1lに投入し、50°Cでよく均質化せしめた後一夜放置し、尿素附加物を濾別した。(Fr. 1)濾液は水を加えてメタノールを85%まで稀釈し石油エーテルを用いて抽出をくりかえし石油エーテル可溶物を分別した。(Fr. 2)

石油エーテル可溶物を除いたメタノール溶液は更にエーテルを用いて抽出を行つた。(Fr. 3)

なお尿素附加物は尿素を飽和した冷メタノールで十分洗滌した。(洗滌液は Fr. 4 とす)
 これら各区分の一般特徴は Table 2 の通りである。(過酸化物の定量は Lea の方法¹¹⁾, 共軛酸は Am. Oil
 Chem. Soc. Official and tentative method: Cd 7-48) によつて算出した。

Table 1. 尿素附加物によるアマニ油液体酸自酸化物の分離

Diagram showing scope of fractionation of autoxidized liquid acids
 of linseed oil by urea adduct formation

本結果を見るに尿素附加物を作る区分 (Fr. 1) は過酸化物, 共軛酸の含量少く, 原アマニ油液体酸及びそれが多少重合したものより成るように思われる。また尿素附加物を作らぬ Fr. 2, 3 は多量の過酸化物を含み二重結合の移動が起り共軛酸を含む。なお Fr. 3 はアルデヒドを含んでいない。

高度不飽和酸エチルの重合物: 第8報において報じたと同様の方法により製した高度不飽和酸エチル・エステルを石油エーテルに溶し, アルミナを用いてクロマトグラフを行い精製した。本エステルに触媒として酸性白土2%を加え, 120°Cに6時間真空重合せしめた。得たる重合物の性状は次表の如くである。

Table 3. 高度不飽和酸エチル重合物の性状

Properties of the polymerized ethyl ester of highly unsaturated acids

	N _D ⁴⁰	沃素価 Indine Value	鹼化価 Sap. Value	過酸化物価 Peroxide Value(M. E./Kg)
オレイン酸エチル (対照) Ethyl ester of oleic acid (control)	1.4440	82.70	184.25	—
原高度不飽和酸エチル Original ethyl ester of highly unsaturated acids	1.4846	348.79	158.14	11
同 重合物 Polymerized ester of above acids (120°, 6 hrs. in CO ₂)	1.4854	310.62	156.23	62

B 動物試験法: 白鼠を用い大略第8報と同一方法により試験を行つた。即ち体重 70g 程度の白鼠に下記組成の基本飼料 1日 9.5g を投与し, これに試料エステルを自偽酸化物は 0.5g, 各区分は自偽酸化物中に含まれる量に応じ 0.2—0.4g 添加し, 体重を測るとともに白鼠の状態を観察した。なお吉田¹⁴⁾は高度不飽和酸の毒性は多量の酵母を与えることにより消失すると述べているところから, 試験の確実を期するため, 酵母を与えることは止め, 各種ビタミン類の結晶を混合投与したが, とくにフラビンについては白鼠の最低必要量程度を投与することに留意した。

Table 4. 基本飼料組成

Composition of diets

Ingredients	Amount %	Ingredients	Amount (mg/100gm diets)
Polished rice powder	83	Vitamin A	80 U.S.P.U
		Tocopherol	3
		Thiamine	0.125
Casein(Ether extracted)	10	Riboflavin	0.1
		Pyridoxine	0.1
		Pantothenic acid	1
McCullum Salts mixture	3	Niacin	1.5
		Choline	100
		Inositol	200
Sample lipids	2~5	p-Aminobenzoic acid	0.5
		Vitamin B ₁₂	0.0015

C 動物試験結果:

Exp 7. アマニ油液体酸自偽酸化物及び各区分を投与した結果は Table 5 の如くである。なお試料は少量なため Tween 85 の 5%溶液に溶解せしめたものを用いた。

Table 5. アマニ油液体酸自酸化物投与試験結果

Feeding records of autoxidized esters of linseed oil

(Period: From March 16 to April 5, 1954)

Type of fat fed	系 統 Brood series	性 別 Sex	体 重 Body weight (g)		生 存 日 数 State of mortality
			試験開始時 Initial	死亡又は終了 時 Last day	
アマニ油液体酸自酸化物 Autoxidized esters of linseed oil 6.5g	C	♀	49	40	死亡 died on 4th day
	C	♀	41	30	死亡 died on 3rd day
	A	♀	39	44	死亡 died on 3rd day
	A	♂	38	37	死亡 died on 7th day
第 1 区 分 Fraction 1 0.4g	C	♀	46	56	生存 survived over 20 days
	C	♀	48	64	生存 survived over 20 days
	A	♂	51	79	生存 survived over 20 days
第 2 区 分 Fraction 2 0.2g	C	♀	46	45	死亡 died on 2nd day
	C	♀	39	39	死亡 died on 2nd day
	A	♂	53	53	死亡 died on 2nd day
第 3 区 分 Fraction 1 0.2g	C	♀	48	48	死亡 died on 2nd day
	C	♀	46	46	死亡 died on 2nd day
	A	♀	48	43	死亡 died on 6th day
	A	♂	52	52	死亡 died on 2nd day

本結果を見るにアマニ油液体酸自酸化物は高度不飽和酸の時と同様の毒性を示し、白鼠は何れも斃死した。一方酸化物中 75 %を占める未変化液体酸(Fr.2)は全く毒性を示さなかった。また尿素附加物を作らぬ Fr 2,3 は1日1匹当たり 0.2g の投与により何れも烈しい下痢症状を呈し、白鼠は6日以内に死亡した。

Exp.2. 高度不飽和酸エチル重合物投与試験：不飽和酸自酸化生成物中の重合体の毒性の有無を調べるため前記重合エチル・エステルを用いて試験を行い、Table 6 の如き結果を得た。

Table 6. 高度不飽和酸重合エステルの動物試験結果

Feeding record of polymerized ester of highly unsaturated acids

(Period: April 16 to May 1, 1954)

Type of fat fed	性 別 Sex	15 日間の増加体重 Body weight gained in 15 days(g)	同 平 均 Mean weight gained(g)
無 添 加 (対照) None(Fat-free basal)	♀ ♀	8 8	8
オレイレ酸エチル (対照) Ethyl ester of oleic acid(control)0.5g	♀ ♀	16 10	13
原高度不飽和酸エチル Original ethyl ester of highly unsaturated acid 0.5g	♀ ♀ ♀ ♀	19 17 16 18	17.5
同 重 合 エ ス テ ル Polymerized ester of above acids 0.5 g	♀ ♀ ♀	20 17 19	18.7

本結果を見るに従来の試験で毒性を示した自酸化物と同程度まで沃素価を下げた高度不飽和酸エチル重合体はいささかも毒性を示さぬことを認めた。即ち本結果により多少分子量が増しても、過酸化物含量の少ない不飽和酸は毒性を示さぬことを知った。

さらに桐油を用い共軛酸の呈する毒性の程度を調べたが、アマニ油不飽和酸自酸化物中に含まれる程度では問題とするに足らぬことを知った。

Exp 3. 以上の結果からして、不飽和酸自酸化生成物中最も毒性の強い構造は過酸化物構造であろうと推定した。この推定を確認するためアマニ油液体酸自酸化物を過酸化物価定量と同一方法により処理し、果して毒性が消失するか否かを調べた。

即ち、アマニ油液体酸自酸化物にクロロフォルム・氷醋酸(1:2)混液 20 倍量を加え、供試エステルと同重量の沃度カリを投入し、CO₂ ガス中で加温し、遊離沃度を除き、残存する沃度をチオ硫酸ソーダ液で除去した後十分水洗し、減圧のもとにクロロフォルムを除去した。得たる試料の性状及び動物試験の結果は Table 7, 8 の如くである。

Table 7. 過酸化物を除いたアマニ油液体酸自動酸化物の性状
Properties of peroxide liberated esters of linseed oil

	沃 素 価 Iodine Value	鹼 化 価 Sap. Value	過 酸 化 物 価 Peroxide Value (m. e. / kg)
原アマニ油液体酸自酸化物 Original autoxidized liquid ester of linseed oil	137.45	184.85	830
同過酸化物を除いたもの Peroxide liberated products of above acids	136.28	—	90

Table 8. 動物試験結果
Feeding records of peroxide liberated ester
(Period: March 26 to April 15, 1954)

Type of fat fed	性別 Sex	体 重 Body weight		生 存 日 数 State of mortality
		試験開始時 Initial	死亡又は終了 時 Last day	
原アマニ油液体酸自酸化物 Autoxidized liquid ester of linseed oil 0.5g	♀	50	50	死亡 died on 2nd day
	♀	61	61	死亡 died on 3rd day
	♀	89	94	死亡 died on 11th day
同過酸化物を除いたもの Peroxide liberated products of above acids 0.5g	♂	53	55	生存 survived over 3 weeks
	♀	50	50	生存 survived over 3 weeks
	♀	91	100	生存 survived over 3 weeks

本結果を見るに過酸化物を除いたものの毒性は全く薄れ白鼠は死亡しない。即ち不飽和酸自酸化生成物中過酸化物が最も強い毒性を示すことが判る。但し白鼠はいくぶん下痢をおこしやすく、過酸化物以外に多少有毒なものが生成されるらしいことを示している。

次に過酸化物が如何なる作用機構により白鼠に毒性を与えるかを知るため、まず予備的手段として、白鼠の胃中における H₂O₂ 生成量の測定を人工的に行ってみた。即ち過酸化物は酸の存在においては H₂O₂ を生ずることが知られているが、白鼠の胃中に達した過酸化物が胃液と混じて H₂O₂ を生成し、これが胃壁や腸管を直接犯すのではないかと思つたためである。そこでアマニ油自酸化物に 0.72% HCl を 10 倍量加え時々振盪しつつ 40°C の恒温器に 2.5 時間保ち、生成する H₂O₂ 量を測定し Table 9 の如き結果を得た。

Table 9. 0.72% HCl を添加した自酸化物よりの H₂O₂ 生成量
Amount of H₂O₂ produced from autoxidized ester of linseed oil when 0.72% HCl was added

	試料 0.5g よりの H ₂ O ₂ 生成量 H ₂ O ₂ mg, yielded from autoxidized esters 0.5g	過 酸 化 物 価 Peroxide Value(m. e. / kg) after treating
原アマニ油液体酸自酸化物 Original autoxidized esters of linseed oil	—	1310
I 同0.72% HClを加えたもの(添加直後) The mixture of above esters and 0.72% HCl(0 hr.)	0.48	—
II 同 40°C 2.5 時間放置後 The mixture of above esters and 0.72% HCl (after 40°, 2.5hrs)	0.427	1180

本結果がこのまゝ白鼠の胃中の反応に当てはめられるものとすれば、 H_2O_2 の生成量はごく僅かで、大部分の過酸化物はそのまゝの形で残存するといえる。また白鼠にこの 10 倍量のオキシドールを連続投与してもなら毒性は現れなかった。

Ⅲ 考 察

以上の結果より考察するに、白鼠を死亡せしめる不飽和酸自酸化生成物の毒性は主として酸化生成物のうち過酸化物によると確認された。但し過酸化物が白鼠に対し如何なる作用を及ぼして毒性が現れるのかは今のところ全く不明なのだが、恐らくは次のどれかが毒性を示すのではないかと考える。即ち

- (1) 過酸化物がそのまゝの形で直接胃又は腸壁に作用し組織をおかす。
- (2) 消化管を通じ体組織内に入った過酸化物が直接害作用を与えるか、あるいは過酸化物がさらに分解し、この分解生成物が毒性を示す。

以上の点については今後試験をつけ、はっきりした結果を得たいと考えている。

Ⅳ 摘 要

本研究の第 8 報において従来信じられていた高度不飽和酸の毒性は、実は高度不飽和酸自酸化生成物であることを見出したが、不飽和酸酸化生成物中如何なる構造を有するものが最も強い毒性を示すかを知るためアマニ油液体酸を用いて検討し、次の結果を得た。

(1) アマニ油液体酸エチルを自酸化せしめたものは高度不飽和酸自酸化物と全く同様の毒性を白鼠に対して示す。即ち不飽和酸は何れも自酸化が進めば、酸化のある段階においては有毒物を生ずるように思われる。

(2) アマニ油液体酸自酸化物に含まれる有毒成分の本態を突きとめるため尿素法を用いて酸化生成物の分離を行ったところ、尿素附加物を作らぬ部分に有毒成分は濃縮された。

(3) 高度不飽和酸を加熱重合させたものは過酸化物価低く、動物試験の結果、毒性を有さぬことを認めた。

(4) 以上の結果を検討し、結局不飽和酸自酸化生成物中最も有毒な構造は過酸化物構造であろうと推定した。この予想を証明するため自酸化物をクロロホルム・氷醋酸に溶し、沃度カリを加えて過酸化物構造の大部分を消失せしめた後動物試験を行ったところ果して毒性はほとんどなくなった。この結果により不飽和自酸化物中最も有毒な構造は過酸化物構造であることを確認した。

本研究を行うにあたり有益な御助言を賜った食糧研究所所長尾崎準一博士、終始御指導を賜った東秀雄博士、動物試験に尽力された荒井君枝の諸氏に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) 金田, 石井, 日水誌 **19**, 171 (1953).
- 2) O.S. Privett et al., J. Am. Oil Chem. Soc. **30**, 17 (1953).
- 3) S.S. Chang and F.A. Kummerow, J. Am. Oil Chem. Soc. **30**, 403 (1953).
- 4) K. T. Zilch, Anal. Chem. **23**, 775 (1951).
- 5) J. Fugger et al., J. Am. Oil Chem. Soc. **28**, 235 (1951).
- 6) J.A. Cannon, J. Am. Oil Chem. Soc. **29**, 452 (1952).
- 7) D. Atherton and T. P. Hilditch, J. Chem. Soc. p105 (1944).
- 8) G.N. Catravas et al., Bull. mens. inform. ITERG **6**, 384 (1952) Oleagineux **8**, 79 (1953).
- 9) J.E. Coleman et al., J. Am. Chem. Soc. **74**, 4886 (1952).
- 10) Daniel Swern et al., J. Am. Chem. Soc. **75**, 3135 (1953).
- 11) C.H. Lea, Rancidity in Edible Fats (1939).
- 12) P. Dubouloz, J. Fondarai and C. Lagarde, Biochem. et Biophys. **3**, 371 (1949).
- 13) 松尾, 未発表
- 14) 吉田; 農化, **13**, 120 (昭 12).