

氏 名 ( 本 籍 )	あま 天	の 野	りう 立	じ 爾
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬	第	8 3	号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 4 8 年 2 月 2 8 日			
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当			
学 位 論 文 題 目	油 脂 の 変 敗 に 関 す る 研 究			

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員 教 授 内 山 充 教 授 南 原 利 夫  
教 授 小 澤 光

# 論文内容要旨

油脂の変敗は臭気の発生, 着色, 風味の劣化などの現象として観察され, それらに伴って栄養価の低下, 毒性の発現などが認められており, 油脂類の変敗劣化は食品衛生上の問題となることが多い。

常温における油脂の変敗は不飽和脂肪酸からヒドロペーオキシドが生成するラジカル反応を主体としている。このようにして生成, 蓄積したペーオキシドは2次酸化, 分解, 重合などの反応を行ない, カルボニル化合物, エポキシド, ヒドロキソ化合物, カルボン酸, 重合体など種々の物質に変化する。現在までに確認されたトリグリセライドあるいは不飽和脂肪酸の自動酸化生成物は非常に多種におよんでいる。油脂の酸化程度の化学的判定にはこのような複雑多岐にわたる酸化生成物のうちのある特定の物質の検出法または定量法が用いられることが多く, 現在協定法などとして広く使用されている方法を列記すると, ヒドロペーオキシドを主とする過酸化物を定量する過酸化物質価, 第2次生成物であるカルボニル化合物を測定するカルボニル価, カルボニル類中で特にmalonaldehyde (MA) に焦点を絞ったチオバルビツール酸法 (TBA法), アルデヒドの酸化等によって生ずる遊離酸を定量する酸価などがある。しかしながらこれらの方法における標的物質の酸化過程での生成量, 生成機序, 毒性との関連性などについては不明な点が多い。

2-thiobarbituric acid を試薬とする比色法 (TBA法) はこれらの中でも特に標的物質, 発色機構, 生成機序等につき問題点が多い方法と思われるので, 本研究においてはこれらの諸点について検討を加え, あわせて本試験法の油脂に対する酸化指標としての評価, 毒性との関連性についても検討した。

TBAはアルデヒド類と縮合物を作ることが知られているので, 変敗油脂に関係のあるアルデヒドを中心にいくつかの物質との縮合物を合成した。一方酸化させたダイズ油をTBAと加熱して赤色の沈澱を得た。これと先に合成した縮合物との可視吸収スペクトルを比べた結果, ダイズ油由来の着色物と同じスペクトル ( $\lambda_{\max} . 532 \text{ m}\mu$ ) を示すものは, 実験した11種のアルデヒド中では, MAとの縮合物だけであった。なお酸化油脂中から広く検出されている脂肪属アルデヒドとの縮合物は黄色 ( $\lambda_{\max} . 453 \text{ m}\mu$ ) を呈するものが多かった。

つぎにこの2種の赤色の化合物を同定する目的でそれらのイオン解離定数を測定し, MA-TBA縮合物について  $\text{p}k_1=9.40$ ,  $\text{p}k_2=10.37$ ,  $\text{p}k_3=13.35$ , ダイズ油よりのものについて  $\text{p}k_1=9.36$ ,  $\text{p}k_2=10.32$ ,  $\text{p}k_3=13.35$  という値を得た。この結果からこれら2物質は互いに同じものであることが明らかになった。またこの縮合物は, 窒素含量および連続変化法に

よる反応比の測定からは、MA 1 に対して TBA 2 の比率で縮合したものであるとして矛盾はない。

続いてこのような MA - TBA 縮合物が脂肪酸組成、自動酸化条件、酸化の進行程度等の差異に関係なく常に TBA 試験時に生成するか否かについて調べた。その結果ダイズ油、methyl linoleate, methyl linolenate の酸化物中には、酸化程度、酸化条件（温度、電磁波の種類）の違いに関係なく（もちろん量的な変動は認められたが）、常に見出された。

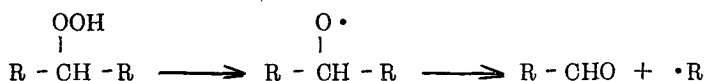
以上のような諸実験によって TBA 試験法の標的物質は MA であり、試験法で比色している物質は MA 1 分子と TBA 2 分子が縮合した物質であることが明らかとなった。

ついで MA の生成量が自動酸化の条件の違い、脂肪酸の種類、酸化の程度などによりどのような影響を受けるか、すなわち TBA 試験法の衛生化学的評価について調べた。酸化条件の影響に関しては methyl linolenate を 3 つの条件（散光下、紫外線照射、 $\gamma$ 線照射）で自動酸化させて調べ、脂肪酸の種類による影響を見るために methyl linoleate, methyl linolenate, alkali isomerized methyl linoleate（共役ジエン酸）の 3 種の不飽和酸を同一条件で酸化させた。これらの実験中経時的に TBA 価を測定し、さらに平行して過酸化物価、共役ジエン量、カルボニル価等の変化も測定した結果、これら全ての酸化指標は酸化条件や脂肪酸の種類の影響を受け、同一酸化程度においてもそれらの数値は大きく変わっていた。このことはこれらの酸化指標の数値の大小によるのみで油脂の変敗程度を知ることはできないことを示している。

methyl 8-formyloctanoate (MFO) は methyl linoleate のカルボキシル基に最も近い二重結合を酸化的に切断することにより生成するアルデヒド酸エステルである。これはガスクロマトグラフィーで容易に測定できるため、カルボニル価の代りに一部の試験で採用したが、この消光パターンは methyl linoleate の酸化過程において TBA 価と大変よく似ていた。そして共役ジエン量および過酸化物価の酸化過程における変化から推測すると、この 2 種のアルデヒドはヒドロペーオキサイドがさらに酸化した状態で生成するものと思われる。さらに MFO に関しては遊離の形以外に何か熱分解性の前駆体様の形態の存在が疑われた。これらの事実は MA や MFO については他のアルデヒドの生成機序に関係する重要な点であろうと考えられるので、以下において検討を加えた。

自動酸化した methyl linoleate から未酸化物や第 2 次酸化生成物をほとんど含まない純 methyl linoleate hydroperoxide (ML-HPO) を分離した。これは 9 および 13-hydroperoxyoctadeca-(conjugated)-dienoate の等量混合物であった。この ML-HPO を空気中あるいは窒素中に放置して分解させたと、窒素中で分解したものからはわずかの MA, MFO が検出されたに過ぎなかったのに反し、空気中での分解物中からはこれらが多量に確認できた。このような結果が得られたので、この酸素の必要性をより詳しく

く知るために、ML-HPO の酸素吸収量と MA および MFO の生成量との関係を調べたところ、これらの間にはほぼ比例する関係が認められた。すなわちこれらのアルデヒドは ML-HPO から直接生成することではなく（あったとしても少量である）、これがさらに酸化した場合に生ずることが明らかとなった。さらにこの 2 種の化合物は ML-HPO を還元して得られる hydroxyoctadeca-(conjugated)-dienoate を同様に酸化させたものからも検出された。この結果は ML-HPO の 9 位あるいは 13 位の炭素についている HOO 基の存在はこれらカルボニル類の生成にとって必要条件でないことを示している。これらの事実は広く知られているヒドロパーオキシドからアルデヒドの生成する機構、すなわち

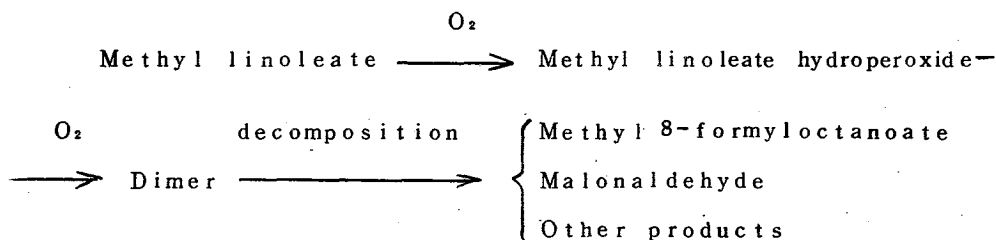


以外の機構、おそらくは HOO 基あるいは水酸基の結合している炭素の隣の不飽和炭素の酸化と、それに引続く炭素間の結合の解裂という機構があることを示すものと考えられる。

つぎに前述した MFO の熱分解性前駆体について、カルボニル生成の機序に関連があると考えられるので、若干の検討を試みた。

単離した純 ML-HPO を短時間に自動酸化させ、酸化物をカラムクロマトグラフィーによって分画した。得られた区分のうちの主要区分は 50% 以上を占め、ガスクロマトグラフィーにより多量 (11%) の MFO を含むことが認められたが、薄層クロマトグラフィーで分析したところほとんど検出できなかったので、遊離の MFO はほとんど含まれていないことが明らかとなった。それ故にこの区分は熱分解性の MFO 前駆体であることがわかる。この前駆体の平均分子量は約 620 であり、2 個の methyl linoleate の骨格がパーオキシ基、 $-\text{O}\cdot\text{O}-$ 、で結合したダイマーで、水酸基、HOO 基、孤立 Trans 二重結合等の官能基を有していた。赤外吸収スペクトルから上記以外に  $\alpha$ -不飽和 2 級アルコール、ケト基、エポキシ基等の存在する可能性も示された。さらにこのダイマーは MFO と同じように MA についても熱分解性の前駆体であることがわかった。

以上の結果を総合すると methyl linoleate について次式に示すような酸化経路が考えられる。



TBA試験はこのようにして生成したMA量を測定して油脂の変敗を判定する方法であることが判明した。また変敗油脂中に検出されている多種のアルデヒド中にはこのような経路によって生成しているものがかなりあるものと考えられる。

変敗油脂の毒性の一因として第2次酸化生成物があげられているので、ここで得た酸化ダイマーについても毒性を調べた。

まず生体内で過酸化物の解毒に重要な役割をはたしている glutathione に対する作用を調べた結果、このダイマーは glutathione SH基を非酵素的に破壊することを認めた。特に比較のために用いたML-HPO よりも活性酸素量が少ないにもかかわらず、その作用は強かった。このことはダイマーのSH基破壊作用が単に活性酸素による酸化のためではなく、何か他のファクターが働いていることを示しているものと考えられる。

in vitro における酵素活性に対するダイマーの作用は、trypsin に対して非特異的タン白変性によるものと考えられる弱い阻害作用を示し、SH酵素として知られている肝ミトコンドリア由来の succinate dehydrogenase に対してはタン白変性作用をSH破壊作用との複合したものと考えられる強い阻害力を示した。これらの酵素に対する作用の強さはダイマーとML-HPO とはほぼ等しかった。

マウスに対する経口急性毒性を調べたところ、体重増加抑制作用で比較すると酸化ダイマーとML-HPO とは同じ程度の毒性を示した。投与後の症状は運動量の減少、立毛、摂餌量の減少等が見られたが、これらの症状は一過性で投与後24～48時間でほとんど回復した。死亡個体の解剖処見では消化器官、特に胃、十二指腸、回腸上部に充血、粘膜はく離などの病変が認められた。

以上で明らかのように、methyl linoleate の第2次酸化生成物である酸化ダイマーは第1次酸化物であるML-HPO と同じような毒性を示すことから、過酸化物の蓄積がピークを過ぎたような古い変敗油脂の毒性には本物質のような化合物の関与が大きいものと思われる。

## 審査結果の要旨

食用油脂の変敗度の指標として、これまでチオバルビツール酸価(TBA価)、過酸化物価、共役ジエン量、カルボニル価などが用いられている。本論文は先ず変敗度の正確な把握とその定量的表示法の検討について述べている。即ちTBA価を現わす呈色物質が、油脂材料の如何にかかわらずマロンアルデヒドであることを確認し、ついで上記諸指標が油脂の変敗程度、酸化条件によつて一定の相互関係を示すかを調べたところ、その変動は各指標毎にまちまちで、いずれも一つを以て正しく変敗度を示し得ないことを知った。

各指標のうちカルボニル価は、変敗の進行と共に増大し、しかもいわゆる変敗油脂の毒性とも平行するように見える。筆者はこのカルボニル価を示す物質は、主として8-ホルミルオクタン酸(およびマロンアルデヒド)であることを見出した。

8-ホルミルオクタン酸は、ガスクロマトグラフィーによつて、感度、精度良く定量分析され、しかもカルボニル価の変化と平行して増減するので、酸化変敗油脂の試験として適当な対象といえよう。

次に筆者は、8-ホルミルオクタン酸の生成機序を検討した。既存の知識からすれば、過酸化物質が直接分解してアルデヒドを作るのが当然と考えられるところであるが、実験の結果過酸化物からの、8-ホルミルオクタン酸の生成には分子状酸素が必要であり、もう一段階の酸化過程が含まれていることが明らかとなった。さらに過酸化物の還元体すなわち飽和水酸化体からも、酸素の存在下で8-ホルミルオクタン酸が生成する。

リノール酸の過酸化物が、更に酸化されたものは、いろいろな検討の結果2モルのリノール酸が過酸化結合(-O-O-)で結合した2量体であり、これをガスクロマトグラフによつて分析すると、熱分解で定量的に8-ホルミルオクタン酸を生じて検出されるのであることが証明された。

上記2量体はグルタチオンなどの-SHを破壊する。したがつてSH酵素に対しては阻害作用を示した。これまで変敗油脂の毒性の本体は過酸化物とされていたが、その他にこの2量体の影響も見逃せないところである。

以上本論文は、変敗油脂の変敗度試験につき新しい考え方を導入し、さらに過酸化脂質の変化過程について新知見をもたらす、油脂性食品の衛生化学的取扱について貴重な貢献をなしたもので、学位論文としての価値あるものと認める。