

氏 名 (本 籍) さ とり まさ お
佐 藤 政 男

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 博 第 4 6 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 7 年 7 月 1 2 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科
(博 士 課 程) 薬 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 変 性 脂 質 の 毒 性 に 関 す る 基 礎 的 研 究
— 1 2 - ケ ト オ レ イ ン 酸 を 中 心 と し て —

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 内 山 充 教 授 岡 野 定 輔

教 授 南 原 利 夫

論 文 内 容 要 旨

1955年金田らが不飽和脂質から誘導された過酸化脂質が変性脂質の毒性発現の原因である事を報告して以来過酸化脂質及びその他の有害二次産物の毒性と毒性発現機構の研究がなされている。現在までのところ変性脂質はその生成過程から構造的に三つのグループに分けられる。①自動酸化による脂質過酸化物、②分解二次産物（カルボニル化合物、エポキシ、ハイドロキシ化合物等を含む）、③高温加熱時に得られる環状単量体、二量体及び多量体である。これらのうちで毒性を示すと考えられるのは脂質過酸化物、環状単量体、二量体及び一部の分解二次産物である。これらの急性毒性は下痢、体重減少を来し、脱毛、浮腫、出血などを伴い遂に死亡に至る。その作用機構として呼吸系、解糖系の阻害、細胞分裂阻害などの研究がなされている。ミトコンドリアでは各種の酸化酵素の阻害がおこり、また多くの膜系破壊もおこる。またビタミンE欠乏や放射線障害でおこる溶血、脳軟化症、筋ジストロフィーなどの筋組織破壊、ライソゾームの破壊等も酸化脂質の毒性と考えられる。また最近になつて過酸化脂質と老化現象との関係、動脈硬化症、発癌促進との関係等、疾病との関係が議論されるようになり、単に狭い意味での急性ないし亜急性の毒性にとどまらず、経口的に吸収されるような、また生体内で生成するような微量に存在する過酸化脂質の長期的毒性も問題とされるに至つた。

自動酸化脂質の経口投与で示される毒性は従来脂質過酸化物に依ると考えられていたが、脂質過酸化物そのものは腸管吸収されないと考えられている。また脂質過酸化物の生成を示す指標は過酸化物(POV)であるが酸化脂質のPOVとその経口毒性は必ずしも相関しない事が示され、脂質過酸化物以外の腸管吸収をうける毒性発現物質の検討が必要とされるようになった。

脂質変性の際、カルボニル化合物が多量に生成しカルボニル価は上昇するが、変性油脂を白鼠に経口投与するとカルボニル価はリンパ液中で増大し、肝臓の中性脂質画分にはケト酸などの酸化分解物が存在する事からカルボニル化合物の吸収は容易である事が示された。このようなカルボニル化合物の中でケト脂肪酸についての検討は少ないが、Kokotnurらによつて長鎖ケト脂肪酸は食餌に少量添加するとビタミンE欠乏でおこるニワトリの雛の脳軟化症の発症を著しく促進する事実が示されて以来、特に興味をもたれるようになった。このような長鎖ケト脂肪酸の生成については多くの報告がある。

本論文では変性脂質の全体の毒性発現上では脂質過酸化物のみならず、二次分解産物のカルボニル化合物が関与する事を明らかにすると共に、長鎖ケト脂肪酸として12-ケトオレイン酸(以下12-KOAと略)を用いて過酸化反応促進効果、蛋白質との反応性等を中心として検討を加え、12-KOAの脳軟化症発症促進作用の機構及び変性脂質の経口毒性が過酸化物価と並行しない部分の毒性

発現機構を解明しようとした。

脂質の酸化が一定程度進行し過酸化物質価が下降を始めた時点では、過酸化物質価と酵素阻害度は相関しない事を珪酸カラム分画法によつて示した。又、化学的処理法によつてカルボニル化合物が α -tocopherolでは保護しえないような酵素阻害をひきおこす事を明らかにした。

ビタミンE欠乏でおこる種々の症状は、抗酸化剤であるE量の減少によつて生体膜の主成分である不飽和脂質が酸化をうけ膜が不安定化する事に依るといふ考え方は現在も強く、生体内の過酸化脂質による毒性は無視できない。長鎖ケト脂肪酸が少量で脳軟化症発症を促進する事から、12-KOAがoil-in-water系でおこる脂質過酸化反応を著しく促進する事をいくつかの測定法を用いて示した。基質及び12-KOAはfree型、グリセリド型のいずれにおいても効果がみられる事、albumin共存下でも促進効果を示した事などからin vivoでも促進効果を示す可能性が示唆された。12-KOAの過酸化促進は、効果を有しない他の脂肪酸に比べてそれ自身のfree radical生成が容易である事実によつて説明できる。二次分解産物自身の中に酸化反応促進物質が存在する事は、過酸化脂質全体の毒性を考える上で意義あるものと思われる。

過酸化脂質は一般に腸管吸収をうけないとされていたが、その分解産物の長鎖ケト脂肪酸は通常の脂肪酸と同様な機構によつて腸管吸収をうける事及び血液や他の組織内貯留がパルミチン酸に比較しより長い傾向にある事を観察した。また過酸化脂質は腸壁で分解をうけてケト酸等の分解産物の形で体内吸収をうける事や、組織中で一たん生成した過酸化脂質が水溶液中で、また肝や血液で分解をうける際にはケト酸を生成する事が報告されており、外因性及び内因性の両方の長鎖ケト脂肪酸の生理的作用の検討の必要性が示された。

生体成分特に蛋白質との化学的相互作用の面から過酸化脂質の毒性を究明しようという試みは多くなされている。老化やビタミンE欠乏の際多く出現するceroid型色素が過酸化脂質-蛋白質複合体である事実はよく知られ、in vitroでも過酸化脂質-蛋白質の相互作用によつて褐色重合体様物質が生ずる事が示された。このような不溶性重合体ばかりでなく温和な条件下での可溶性重合体、酵素の重合体の生成、リポ蛋白質やチトクロームCの傷害等もよく知られている。更にSH-酵素を中心に活性阻害の報告は多い。蛋白質と過酸化脂質の強固な結合にはケト基の関与も示されている事等から12-KOAと蛋白質との反応性について検討を加えた。12-KOAは他の脂肪酸に比較しグルタチオンやalbuminのSH-基と著しい反応性を有したが、この反応はfree radicalを介していない事が判明した。更に脂質過酸化物質の場合と異なりSH-化合物と12-KOAの付加反応生成物を一部含む事が示された。またalbuminとの強い結合性、ヘモグロビンの破壊作用も観察された。後者ではその反応性とTBA価とは必ずしも平行性がない事が示された。以上のように12-KOAはSH基のみならず蛋白質の他の官能部位とも反応してその機能を抑制する事が予想された。

次に12-KOAと関連脂肪酸の酵素活性に対する影響を観察した。コリンエステラーゼやコハク酸

脱水素酵素では12-KOAはリノール酸に比べより大きな阻害度を示した。他方トリブシンでは12-KOAの酵素阻害はリノール酸に比べ小であり、12-KOAの阻害作用が単にdetergent作用ではない事が判明した。コリンエステラーゼではリノール酸による阻害は α -tocopherolにより完全に防止されたのに反し、12-KOAによる阻害は防止されなかつた。この事は12-KOAが酵素蛋白に対し直接的に作用する事を示している。12-KOAとリノール酸を共存させると相乗的な阻害効果を示した。この場合には α -tocopherolの共存で一部分回復した。これは12-KOAによつてリノール酸過酸化脂質の生成がおこり酵素阻害を起す面もある事を示している。これらの事実は12-KOAの脳軟化症発症促進効果が単に過酸化反応促進効果に依るばかりでなく、酵素などの蛋白質への直接作用の関与も予想させる。又、リノール酸酸化が一定程度進行し過酸化脂質が低下しはじめた酸化脂質の場合でも観察されたが、その酵素阻害が α -tocopherolの共存でも軽減されない事は過酸化脂質の毒性発現に対する防禦の面から留意しなければならない点と思われる。更にこれらの蛋白質に対する作用はコハク酸脱水素酵素のようにSH-基修飾によるものだけでなく、コリンエステラーゼのようにSH-基以外のアミノ酸残基に対しても作用する事が推測された。

p-Chloromercuri benzoateや HgCl_2 のような水銀剤はミクロゾームの脂質過酸化反応を促進する。同様にSH-基と反応性を有する12-KOAの組織ホモジネートにおける過酸化反応に対する効果を検討した。類似脂肪酸に比し、12-KOAのみが著しい促進効果を示したが、その機構はoil-in-water系でのfree radical生成性に依るものとは異なる事が示唆された。即ち膜可溶化剤Tween 80の添加で過酸化反応は著しく進行するが、この二者の効果は相加的ではなく、12-KOAの作用はTween 80の膜可溶化剤としての性質に類似した膜変性に依るものと考えられた。一方12-KOAと Fe^{++} + アスコルビン酸、Tween 80と Fe^{++} + アスコルビン酸の共存は夫々著しい相乗的反応促進を示した。更にUtleyらがミクロゾームを用いて示したように、肝ホモジネートでも HgCl_2 等の水銀剤により過酸化反応は進行した。煮沸ホモジネートを用いると Fe^{++} + アスコルビン酸添加による非酵素的過酸化反応の進行は著しいが、12-KOAや水銀剤では全く促進効果を示さなかつた。従つて新鮮ホモジネートで12-KOAは水銀剤と同様にミクロゾームの膜構造を変える事によつて基質不飽和脂質を露出させ、過酸化反応の進行を著しくする事を示唆している。福沢はビタミンE欠乏では膜構造の変化の結果、二次的に脂質過酸化反応がおこる事を示唆した。また1971年Willsは過酸化脂質がミクロゾームの膜を不安定化させる事がミクロゾームの酵素の活性を低下させる事を報告したが、上記の結果と考えあわせ二次分解産物も含めて過酸化脂質による膜構造変性は毒性発現の上で重要な点と考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

食品の変質の中で微生物の関与しないいわゆる化学的変質は、油脂性食品特に不飽和脂肪酸の多い食品に多く起り、中毒の事例も報告されている。

その原因としては、不飽和脂肪酸の自動酸化により生成した過酸化物が、蛋白質を非特異的に変性したり、SH-酵素の活性を低下させたりすることによると考えられていた。しかし、外因性の過酸化脂質は消化管からほとんど吸収されないことは事実であり、さらに脂質の変敗過程で過酸化物価の変動と、動物に対する毒性とが平行しないことも事実である。したがって過酸化物以外のものの変敗油脂中にある何物かが、同時にある程度の生理活性を表わしていることになる。

12-ケトオレイン酸は上記変敗油脂中にも出現する。一般に過酸化物の二次生成物としてカルボニル化合物は多い。12-ケトオレイン酸を飼料中に混入して投与するとビタミンE欠乏症が起り易いことが知られている。しかも、ケト酸は腸管からかなり容易に吸収されることが判明した。そしてさらに、12-ケトオレイン酸を不飽和脂肪酸と共存させておくと、自動酸化が著るしく促進されるという事実もある。

本論文は以上の点を基礎として、12-ケトオレイン酸の有する生体影響を検討したものである。先ず自動酸化促進効果が生理的条件下でも起ることを確かめ、12-ケトオレイン酸と安定フリーラジカルDPPHとの反応性から、12-ケトオレイン酸は自身がラジカルを作りやすく、そのため自動酸化のひきがね的役割を果たすことを明らかにした。

次に12-ケトオレイン酸が類縁の酸に比して蛋白質との結合性に富むこと、SH基と特異的に結合することを見出し、コリンエステラーゼやコハク酸脱水素酵素などを強く抑制することを知った。特にこれらの酵素は過酸化物によつても阻害されるが、ケト酸は過酸化物による阻害とは異なる作用機構すなわち、過酸化物による阻害は抗酸化剤で防御できるが、ケト酸による阻害は防げないことなどが判明した。

酵素蛋白に対する直接作用は同時に生体膜に対する作用のあることを示すものである。ミクロソームにおける脂質過酸化は、フリーラジカルを介しての非酵素的自動酸化と、もう一つ酵素的過酸化がある。Tweenなど界面活性剤は膜をこわし後者の酵素的過酸化を著るしく亢進させる。アスコルビン酸-鉄は前者の自動酸化を亢進する。ここで12-ケトオレイン酸を、ミクロソームの新鮮状態、加熱処理の状態の両方について用い、前記2つの過酸化経路との関係をしらべたところ、12-ケトオレイン酸は界面活性剤や水銀化合物と同様の類別すなわちミクロソームの膜構造を変えることによつて、膜表面に基質不飽和酸を露出させ、過酸化反応を促進させることが結論づけられた。

以上の如く本論文は生化学的には脂質と生体成分との相互反応、食品衛生化学的には油脂性食品の変敗と毒性の因子解明という意味で、多くの知見を得たものであり、学位論文としての価値あるものと認める。