

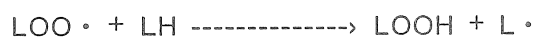
## 9448 脂質過酸化反応におけるNaClの阻害機構の解明

助成研究者：豊崎 俊幸(香蘭女子短期大学)

研究目的: 油脂加工食品中の油脂が過酸化を受けると風味が悪くなるばかりではなく摂取することにより生体に悪影響をおよぼす。したがって、油脂加工時あるいは油脂加工食品中の油脂はできるだけ過酸化を防止する必要がある。演者は油脂加工時あるいは油脂加工食品中の油脂の過酸化に対してNaClが関与している事実を確認した。すなわち、油脂加工時あるいは油脂加工食品中の過酸化反応に対して何らかのかたちでNaClが関与し結果としてNaClが脂質過酸化反応を抑制した。本研究の目的は、NaClの抗酸化効果の有無と、併せNaClが脂質過酸化反応に対してどのような機構で阻害を示しているものかを追跡した。

研究方法: 食品は多成分系であり、極めて複雑な形態をとることから、本研究では水系、エマルション系および酵素系のモデルを作成し、これらを用いてNaClの抗酸化効果について検討し、併せ脂質過酸化反応の阻害機構についても追跡した。水系およびエマルション系では自動酸化によって脂質過酸化を誘発させた。酵素系ではリポキシゲナーゼにより脂質過酸化を誘発させた。NaClの各系における抗酸化効果は共役ジエンおよび2', 7'-ジクロロフルオレセインを用いた蛍光法により測定した。

研究結果と考察: 水系、エマルション系および酵素系のいずれの系もNaClの抗酸化効果が確認された。NaClの抗酸化機構については次の反応式が考えられた。



酸素存在下において脂質(LH)から水素が引き抜かれアルコキシラジカル(LOO·)となる。同時にNaClは解離し、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>となり、Cl<sup>-</sup>は脂質から水素を引く抜きHClとなる。アルコキシラジカルは新たに脂質から水素を引く抜きヒドロペルオキシド(LOOH)となる。ヒドロペルオキシドとHClが反応してヒドロペルオキシド自身は分解する。このような機構によって脂質過酸化が抑制されているものと推察された。



## 9448 脂質過酸化反応におけるNaClの阻害機構の解明

助成研究者：豊崎 俊幸 (香蘭女子短期大学)

## 1. 研究目的

脂質の過酸化は食品の味覚、栄養、安全性に悪影響を及ぼすので食品学、栄養学あるいは生化学分野においてきわめて厄介な問題である。また、生体内にあっては膜の損傷をはじめ種々の疾患を引き起こすばかりでなく、がんや老化とも関連していることが知られ、最近特に注目されている。脂質の過酸化に関する研究は古くから多数の報告がある<sup>1-7)</sup>。脂質の過酸化反応は大気中の酸素分子によるいわゆる自動酸化反応だけではなく、他の酸素種、たとえば一重項酸素、スーパーオキシド、オゾン、二酸化窒素などとの反応によっても生成する。さらに、生体内においては酵素的な酸化反応によっても過酸化脂質は生成する。酸素分子による過酸化反応はラジカル連鎖反応により進行しその反応は連鎖開始反応、連鎖成長反応、連鎖停止反応の三つのステップから成り立っている。

脂質の過酸化を防止する手段として抗酸化剤を利用する方法がある。抗酸化剤の種類は非常に多い<sup>8)</sup>にもかかわらず、実際使用されているものは少ない。天然物ではトコフェロール、合成品ではブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)などが使用されている。BHA、BHTは生体に悪影響をおよぼす<sup>9-11)</sup>ことが知られてからはその使用量が制限されている。一方、トコフェロールにおいても、熱に不安定<sup>12-14)</sup>であることから、調理あるいは加工に利用することには難がある。このことから、今後用いられる抗酸化剤としては生理作用の明白なものが必要条件である。さらに、自動酸化を抑える抗酸化剤のみではなく活性酸素に対しても有効に作用する抗酸化剤を見つける必要がある。

ところで、筆者は油脂加工時あるいは油脂加工中の脂質過酸化反応に対してNaClが何らかのかたちで関与し、その結果としてNaClが脂質過酸化反応を抑制していることを偶然発見した。NaClは調味として重要であるばかりでなく、食品加工あるいは調理を行う場合、素材そのものを加工しやすくするための手段として利用されている。もしNaClが調味以外、すなわち脂質過酸化を抑制する詳しい結果が明らかとなればNaClの価値は上がることになる。本研究は著者が偶然発見した現象について詳しく追跡し、若干の知見が得られたのでそれらについて報告する。

## 2. 研究方法

## 2.1 水系、エマルション系および酵素系での実験試料の調整

水系の場合、一定量のリノール酸を0.1%エタノールを含む25mMリン酸緩衝液(pH7.2)

に溶解したものを実験試料とした。リノール酸-NaCl水溶液系エマルジョンの作成は、リノール酸を主成分として一定量のNaCl水溶液とともにエマルジョンを作成した。乳化剤としては、コンドロイチン硫酸ナトリウム塩を40mMリン酸緩衝液（pH7.4）で1%濃度としたものを用いた。NaClを含むリノール酸と1%コンドロイチン硫酸ナトリウム塩溶液を65:35（v/v）の割合で混合した後、超音波発生装置（UR200P型、Tomy seiko（株））を用いて、出力90Wで3分間超音波処理をした。なお、作成したエマルジョンはO/W型であった。水系およびエマルジョン系での脂質過酸化の誘発は35℃下で自動酸化により検討した。

酵素系の場合、一定量のリノール酸を0.1%エタノールを含む0.1Mホウ酸緩衝液（pH9.0）に溶解したものを基質として、リポキシゲナーゼによる脂質過酸化を誘発させることで検討した。

## 2.2 過酸化脂質測定試料の調製

エマルジョン50mlを共栓付き三角フラスコにとり、恒温槽中（30℃、暗所）で試料をマグネチックスターラーで攪拌しながら、経時的に一定量採取し測定試料とした。一方、50mlのエマルジョンを共栓付き三角フラスコに取り、恒温槽（30℃）で一定照度（3000 lux）一定波長（450nm）下で試料をマグネチックスターラーで攪拌しながら光照射し経時的に一定量採取し測定試料とした。

## 2.3 リノール酸ヒドロペルオキシドの調製

リノール酸ヒドロペルオキシドの調製は、Matsudaらの方法<sup>15)</sup>に準じて調製した。すなわち、リノール酸32mM、0.1%ツイン80、50mMリン酸緩衝液（pH9.0）を含む反応液20mlに、50unitsのリポキシゲナーゼを添加し、酸素を吹き込みながら40分反応させた。反応終了後、エチルエーテルでリノール酸ヒドロペルオキシドを抽出した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。得られたリノール酸ヒドロペルオキシドは、234nmの共役ジエンの吸収および薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いて純度を決定した。TLCの展開は、n-ヘキサン / エチルエーテル / 酢酸（60:40:0.1, v/v/v）で行なった。TLC上の各成分の確認は、50%硫酸を噴霧後、110℃で20分加熱あるいはUV下で確認した。

## 2.4 抗酸化力の測定

各系における抗酸化力は満田ら<sup>16)</sup>およびCathcartら<sup>17)</sup>の方法を利用して測定した。反応総量5.0ml中に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）、12μM FeCl<sub>3</sub>、10mM2',7'-ジクロロフルオレセインジアセテートを含む反応液を37℃一時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、あらかじめ調製していたヘマチン-ジクロロフルオレセインと反応終了した試料とを混合した。ヘマチン-ジクロロフルオレセインの調製は次のように行なった。すなわち、1mM濃度の2',7'-ジクロロフルオレセインジアセテートエタノール溶液と0.01N NaOH、2.0mlを混合し、30分攪拌後、25mMのリン酸緩衝液（pH7.2）10mlで中和する。さらに、25mMのリン酸緩衝液で作成したヘマチン溶液（0.01mg/ml）の中に中和した2',7'-ジクロロフルオレセインを加える。このように調製したヘマチン-2',7'-ジクロロフルオレセイン溶液2.9ml試料10μlとを混合し、50℃、50分放置後、蛍光強度（励起波長400nm、蛍光波長470nm）を測定しジクロロフルオレセイン（DCF）量として過酸化

を算出した。なお、抗酸化力の計算は次に示した方法に準じた。

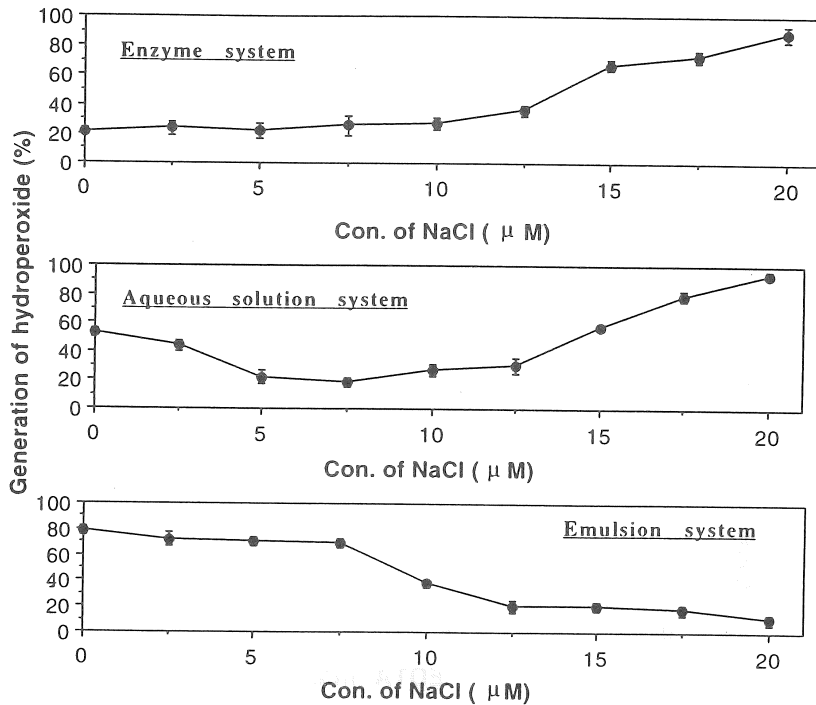
$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 100 - \frac{\text{Amt of DCF (pmol) in } a - \text{Amt of DCF (pmol) in } c}{\text{Amt of DCF (pmol) in } b - \text{Amt of DCF (pmol) in } c'} \times 100$$

なお、*a* はゲル濾過あるいは乳清画分でのDCF量、*b* は標準試料(リノール酸のみ)でのDCF量、*c* は*a* の試料をインキュベーションする前のDCF量、*c'* は*b* の試料をインキュベーションする前のDCF量である。

### 3 結果および考察

#### 3.1 水系、エマルション系および酵素系における脂質過酸化に対するNaCl濃度の影響

水系、エマルション系および酵素系それぞれの条件下で脂質過酸化を誘発させたとき、NaClが脂質過酸化反応を抑制するものかを検討し、その結果をFigs.1に示した。



Figs. 1 Effects of the concentration of NaCl on the lipid peroxidation in various model systems. Each point represents the mean of four trials; the standard deviation is given.

水系の場合、NaCl濃度12.5  $\mu$ Mまでヒドロペルオキシドの生成は抑制された。しかし、NaCl濃度12.5  $\mu$ M以上になるとヒドロペルオキシドの生成はNaCl濃度上昇とともに増加した。エマルジョン系においては、NaCl濃度上昇とともにヒドロペルオキシドの生成はほぼ直線的減少した。一方、酵素系においては、NaCl濃度約10  $\mu$ Mあたりまではヒドロペルオキシドの生成はほぼフラットな状態であったが、その後NaCl濃度の上昇とともにヒドロペルオキシドの生成も増加した。NaClの脂質過酸化反応の抑制は、各系によってそれぞれNaCl濃度に差が認められたものの、水系、エマルジョン系あるいは酵素系いずれの系においても明らかに脂質過酸化反応を抑制した。水系、エマルジョン系あるいは酵素系いずれの系においてもNaCl濃度がある一定濃度域に達したときに脂質過酸化を抑制するものと考えられたが、実際、各系によってNaClの濃度域はまちまちであった。このことについては推察の域にとどまるが、おそらく各系の脂質の形態の違いが大きく左右しているものと推察される。NaCl溶液ではNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>に解離する。このことからNaCl自信よりも、Na<sup>+</sup>かあるいはCl<sup>-</sup>いずれかが脂質過酸化反応に関与しているものと推察される。この現象については著者がしるかぎりにおいては初めての発見である。どのような機構によってNaClが脂質過酸化を抑制しているものか、さらにどのような機構によって脂質過酸化反応に関与しているものかを詳しく追跡した。

### 3.2 脂質過酸化に及ぼすEDTAの影響

NaClが脂質過酸化を抑制する事実から、この点を詳しく説明するためにまずEDTAを用いてNa<sup>+</sup>あるいはCl<sup>-</sup>をキレートした場合に、脂質過酸化が進行するものかを検討した。

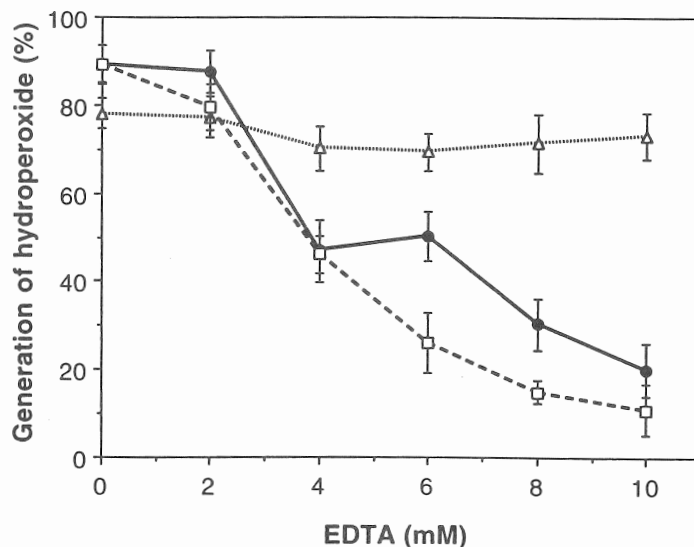


Fig. 2 Effect of the concentration of EDTA on the lipid peroxidation in various model systems. Each point represents the mean of four trials; the standard deviation is given. Symbols: ●, aqueous solution system; □, emulsion system; △, enzyme system.

Fig. 2に示したように水系あるいはエマルション系においてはEDTA添加濃度が増加するとともにヒドロペルオキシドの生成も減少した。一方、酵素系においてはEDTAの影響は確認されなかった。水系あるいはエマルション系においては、 $\text{Na}^+$ あるいは $\text{Cl}^-$ いずれかが脂質過酸化反応に関与していることが推察された。酵素系においてはEDTA存在の有無に関係なくヒドロペルオキシドが生成されたが、EDTA自身がキレート役目をはたさなかったのか、あるいは他に原因があるものかは検討しなかった。

### 3.3 脂質過酸化に及ぼすpHの影響

脂質過酸化の誘発を左右する条件としてpHが考えられた。そこでpHをそれぞれ変化させた場合、脂質過酸化が進行するものかを検討し、その結果をFig. 3に示した。

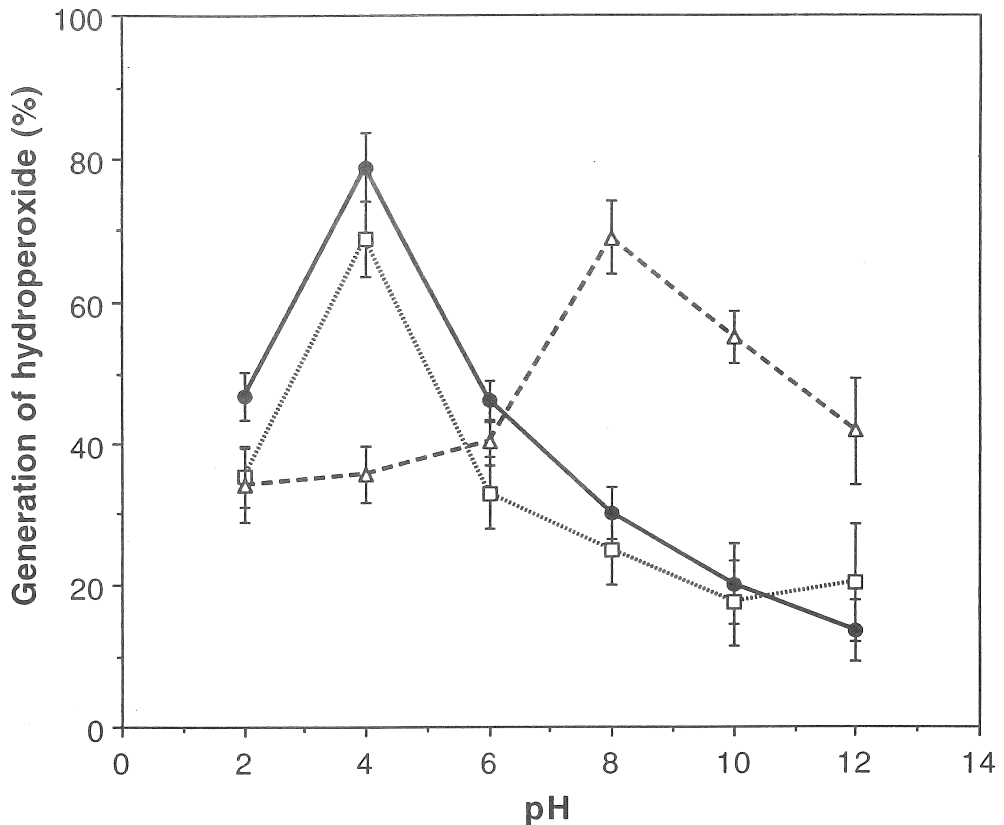


Fig. 3 Effect of the pH on the lipid peroxidation in various model systems. Each point represents the mean of four trials; the standard deviation is given. Symbols same as in the legend of Fig. 2.

水系およびエマルション系においてはpH4.0付近でヒドロペルオキシドの生成は最大となった。一方、酵素系においてはpHが約8.0付近でヒドロペルオキシドの生成が最大となった。酵素系の場合リポキシゲナーゼによって脂質過酸化反応を誘発させたためリポキシゲナーゼの指摘pHは弱アルカリ側であることから、このような結果が得られてものと推察された。いずれの系においても脂質過酸化を誘発させる場合指摘pHがあることが明らかとなった。

### 3.4 ヒドロペルオキシドの影響

いずれの系でも脂質過酸化によってヒドロペルオキシドが生成される。生成されたヒドロペルオキシド自身が脂質過酸化反応に関与しているものとするならば、ヒドロペルオキシドの生成が増加するほどヒドロペルオキシドの分解も増加するものと考えられたので、このことを検討しFig. 4にその結果を示した。

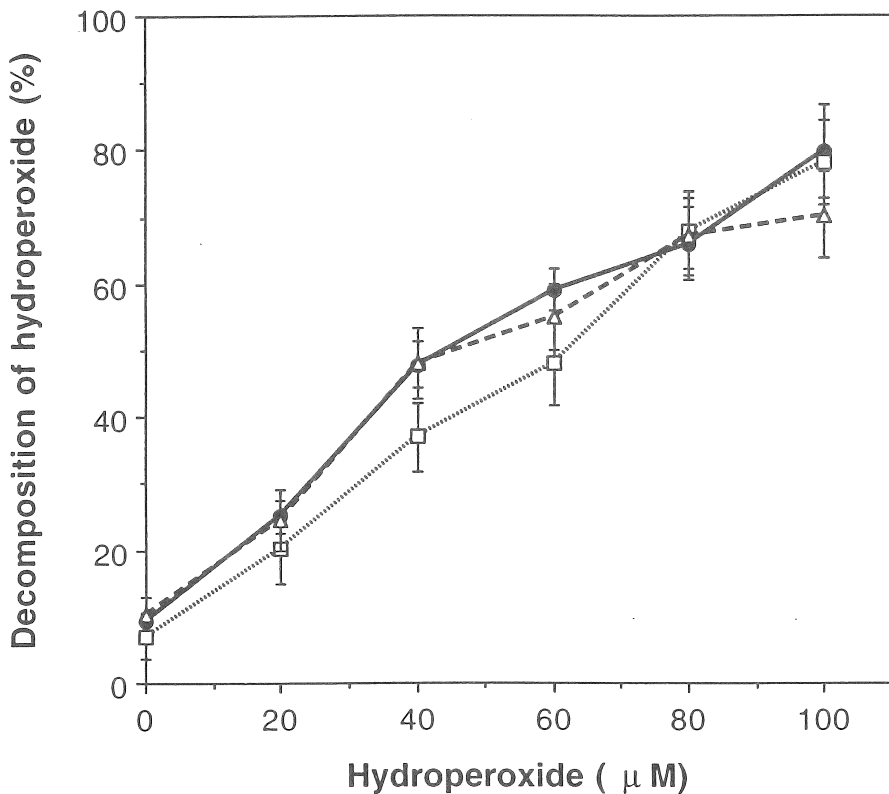


Fig. 4 Correlation between the decomposition of hydroperoxide on the various model systems with hydroperoxide added. Each point represents the mean of four trials; the standard deviation is given. Symbols same as in the legend of Fig. 2.



ヒドロペルオキシド添加濃度が上昇するとともに、いずれの系においてもヒドロペルオキシドの分解割合も増加し、その分解はいずれの系においてもほぼ直線的に分解した。

これらの結果から、いずれの系においても少なくとも脂質過酸化によって生成したヒドロペルオキシドが脂質過酸化反応に関与していることが明らかとなった。また、ヒドロペルオキシドの生成が多ければ多いほど、脂質過酸化を抑制するものとも考えられた。

### 3.5 NaClの脂質過酸化抑制機構

NaClはいずれの系においても溶液として利用した。このことから、NaClは解離して、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>という形で存在している。したがって、Na<sup>+</sup>あるいはCl<sup>-</sup>のいずれかが脂質過酸化反応に関与し、結果として脂質過酸化を抑制しているものと考えられる。そこでScheme 1に脂質過酸化反応抑制機構を示した。



**Scheme 1 Mechanism of antioxidant effect on the NaCl.**

脂質(LH)は酸素存在下で水素が引き抜かれることで過酸化を受け、ペルオキシラジカル(LOO<sup>·</sup>)が生成される。その反応時にNaClはNa<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>とに解離する。さらに、Cl<sup>-</sup>は脂質の水素を受け取りHClとなる。ペルオキシラジカルは新たな脂質から水素を引き抜き、ヒドロペルオキシド(LOOH)となる。ヒドロペルオキシドとHClとの反応によって、ヒドロペルオキシド自身が分解する。

このような反応機構によって、脂質過酸化が抑制されたものと推察できた。このことから、Cl<sup>-</sup>が脂質過酸化反応に関与し、結果として脂質過酸化を抑制したものと推察された。また、Fig. 4の結果については、生成されたヒドロペルオキシドが多ければ多いほどScheme 1の反応機構が進行する確立が高くなり、結果としてヒドロペルオキシドの分解割合が増加したものと推察できた。このことから、NaClが存在している系であれば、脂質過酸化反応によってヒドロペルオキシドを一端生成させることで、最終的には逆に脂質過酸化を抑制することになるものと考えられた。なお、Scheme 1の反応機構が実際進行しているものかはもう少し詳しく追跡する必要がある。また、反応機構の過程ではHClが生成されている。Fig. 3の結果を考慮すると、酵素系以外の系ではpHが酸性側で脂質過酸化が進行したことから、おそらくScheme 1に示したようにHClが生成されている可能性は十分に考えられるが、この点についても今後詳しく検討する必要がある。

### 3.6 トコフェロールとの相乗効果

食品系あるいは生体系において、トコフェロールは脂質過酸化を抑制する酸化防止剤として広く利用されている。このことから、NaClはトコフェロールとの相乗効果があるもの

かを検討し、Fig. 5にその結果を示した。水系、エマルジョン系あるいは酵素系のいずれの系においても明らかにトコフェロールとの相乗効果を有する結果が確認された。ただ、これは一つの現象であるため、どのような機構によって相乗効果を示したのかは今回検討しなかった。この点が明らかとなれば食品系以外の生体系でのNaClの効果が期待できるものと考えられる。

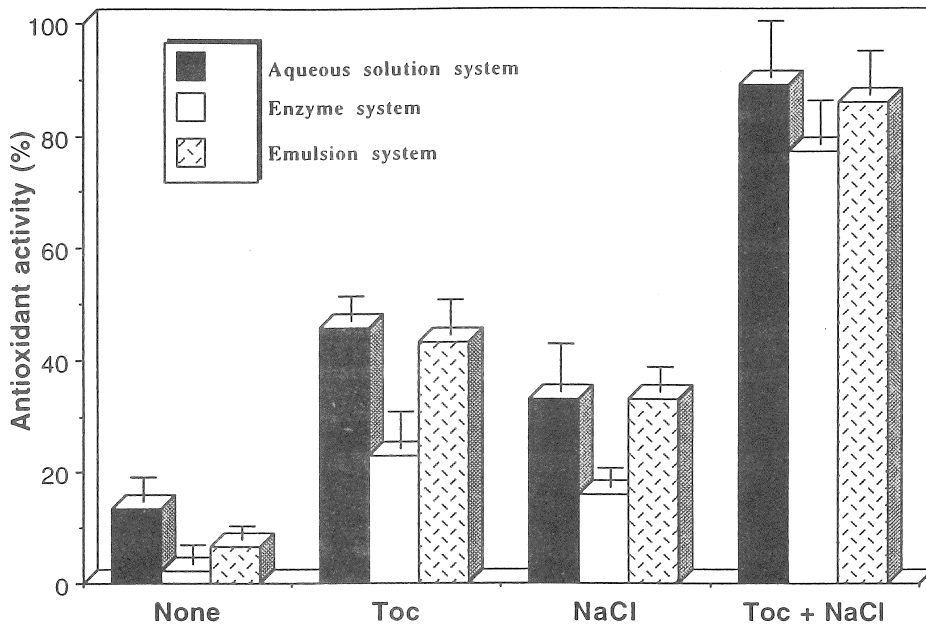


Fig. 5 Effect of  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant action of NaCl. Each column represents the mean of four trials; the standard deviation is given.

#### 4. 今後の課題

本研究によってNaClが脂質過酸化を抑制する、いわゆる抗酸化効果のあることを初めて明らかにした。また、その機構はCl<sup>-</sup>が関与することで脂質過酸化を抑制したことが本研究によって確固たるものとなった。著者はここで得られた結果が生体内の脂質過酸化をもNaClが何らかのかたちで関与することで脂質過酸化を抑制している可能性がきわめて高いであろうと考えた。そこで平成7年度のソルト・サイエンス研究財団に血清LDLの脂質過酸化反応におけるNaイオンの阻害とその機構というテーマで申請した結果、ふたたび助成していただくことになった。本研究で得られた知見を基礎に、複雑な生体内でNaClが脂質過酸化の抑制に関与し、もし、LDLの脂質過酸化を抑制するならば、少なくともアテローム性の動脈硬化のメカニズムの解明への一つの知見を提起できるものと考えられる。さらに、LDLの脂質過酸化がNaClによって抑制するとすれば、新たなLDLの過酸化のメカニズムが明らかとなるものと考えられる。

## 5. 引用文献

- 1) Agarwal, S., Baanerjee, S. and Chatterjee, S.N. Effects of oxygen on ascorbic acid-induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 21, 375-360 (1984).
- 2) Kellog, E.W., III, Fridovich, I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 250, 8812-8817 (1975).
- 3) Maier, V.P. and Tappel, A.L. Rate studies of unsaturated fatty acid oxidation catalyzed by hemein compounds. *J. Am. Oil Chem.*, 36, 8-12 (1959).
- 4) Yamashoji, S., Yoshida, H. and Kajimoto, G. Photooxidation of linoleic acid by ultraviolet light and effect of superoxide anion quencher. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1249-1254 (1979).
- 5) Thomas, C.E., Morehouse, L.A. and Aust, S.D. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 260, 3275-3280 (1985).
- 6) Porter, N.A., Wolf, R.A. and Weenen, H. The free radical oxidation of polyunsaturated lecithins. *Lipid*, 15, 163-167 (1980).
- 7) Tovar, G.L.R. and Kaneda, T. Studies on the toxicity of the autoxidized oils VI. Comparative toxicity of secondary oxidation products in autoxidized methyl linoleate. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 26, 27-30 (1977).
- 8) 梶本五郎、山本司志郎、芝原 章、吉田弘美: 抗酸化剤の理論と実際。pp. 4-25 (1984), 三銕書房。
- 9) Ito, N., Fukushima, S. and Tsuda, H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and Other antioxidants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 15, 109-150 (1985).
- 10) Ponder, D.L. and Green, N.R. Effects of dietary fats and butylated hydroxytoluene on mutagen activation in rats. *Cancer Res.*, 45, 559-560 (1985).
- 11) Witsch, H.P. and Morse, C.C. Cell kinetic in mouse lung following administration of carcinogens and butylated hydroxytoluene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 464-472 (1985).
- 12) Kajimoto, G., Yoshida, H. and Shibahara, A. Effects of soya lecithin with different degrees of hydrogenation on the coloring and decomposition of tocopherol in heated oils. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food*, 40, 497-504 (1987a).
- 13) Kajimoto, G., Yoshida, H. and Shibahara, A. A effects of lecithin, and of gallic acids on the thermal decomposition of tocopherols in heated hardened vegetable oils. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food*, 40, 321-327 (1987b).
- 14) Jung, M.Y. and Min, D.B. Effects of  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.*, 55, 1461-1465 (1990).

- 15) Matsuda, Y., Beppu, T. and Arima, K. Crystallization and positional specificity of hydroperoxidation of fusarium lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 530, 439-450 (1978).
- 16) 満田久輝、安本教傳、岩見公相: リノール酸の自動酸化に対するインドール化合物の抗酸化作用。*栄養誌*、19, 210-214 (1966).
- 17) Cathcart, R., Schwieters, E. and Ames, B.N. Detection of picomole levels of lipid peroxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay. "Methods in Enzymology" (Ed. L. Packer), Vol. 105, p. 352, Academic Press, New York (1984).

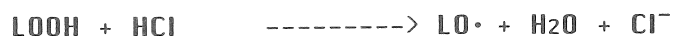
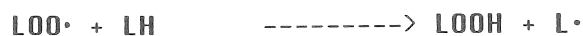
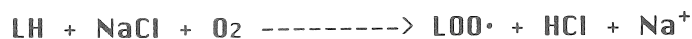
# Mechanism of the antioxidant effect of NaCl on the lipid peroxidation

Toshiyuki Toyosaki

*Department of Home Economics, Koran Women's Junior College*

## Summary

This paper reveals for the first time that the studies of the lipid peroxidation and the antioxidant effect of NaCl. The purpose of this studies was to antioxidant effect of NaCl using aqueous solution system, emulsion system, and enzyme system and to follow the mechanisms to determine how they occur, as was the effect of tocopherol on the antioxidant actions. The antioxidant effects of NaCl were confirmed to exist in all systems and to be the same anti oxidizing effect. The mechanism of antioxidant action were as follows:



Linoleic acid (LH) combines with oxygen, which produces peroxy radicals (LOO·), while NaCl is dissociated Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> at the same time. Then hydrogen is removed from LH and combines with the peroxy radicals, which produces by hydroperoxide (LOOH). Peroxy radical are then produced again. Thus, there can be a chain reaction, which cases LOOH to accumulate. Once a certain amount of LOOH accumulate, LH can also react with oxygen and Cl<sup>-</sup>, which would produce HCl. The HCl can then react with LOOH are produced of H<sub>2</sub>O. In that reaction, LOOH accepts and decomposes. The effect of tocopherol on the antioxidant action at NaCl was synergistic in the all model systems. The study thus offers important finding for lipid biochemistry and sciences.