

過酸化脂質の反応と毒性に関する研究  
— リノール酸ヒドロペルオキシシ  
ドおよび関連アルデヒドの反応  
性と細胞毒性 —

金子孝夫

# 目次

序論	-----	1
本論	-----	9
第1章	リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化	
	反応-----	9
第1節	リノール酸ヒドロペルオキシドの合成	
	および精製-----	10
第2節	リノール酸ヒドロペルオキシドの異性	
	化-----	16
第3節	考察-----	24
第2章	ビタミンEモデル化合物によるリノール	
	酸ヒドロペルオキシド捕捉反応-----	28
第1節	リノール酸ヒドロペルオキシドとビタ	
	ミンEモデル化合物との反応-----	31
第2節	生成物の構造決定-----	33
第3節	捕捉反応への気相の影響-----	39
第4節	考察-----	40
第3章	リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関	
	連アルデヒドのヒト二倍体線維芽細胞に	
	対する毒性-----	44
第1節	トリパンプルー排除能および乳酸脱水	
	素酵素活性を用いる細胞生存率の算定---	46
第2節	リノール酸ヒドロペルオキシドの自動	

	酸化で生成するアルデヒドの同定	48
第 3 節	リノール酸、リノール酸ヒドロペルキシド、リノール酸ヒドロキシドおよびリノール酸ヒドロペルオキシド自動酸化混合物の細胞毒性	51
第 4 節	リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化から生成するアルデヒドの細胞毒性	53
第 5 節	考察	58
第 4 章	リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト臍帯静脈内皮細胞に対する毒性	60
第 1 節	アール液中におけるヒト血管細胞の培養	62
第 2 節	リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドの毒性発現への培地の影響	64
第 3 節	リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト血管内皮細胞に対する毒性	66
第 4 節	リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドによるヒト血管内皮細胞の増殖に対する影響	71
第 5 節	化合物の官能基による毒性の差異	74
第 6 節	臍帯静脈内皮細胞と線維芽細胞に対するリノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドの毒性の比較	76

第 7 節	考 察	77
第 5 章	高度不飽和脂肪酸酸化物の細胞毒性	80
第 1 節	高度不飽和脂肪酸の自動酸化	81
第 2 節	高度不飽和脂肪酸のヒト血管内皮細胞 に対する毒性	84
第 3 節	考 察	91
<u>結 語</u>		93
<u>謝 辞</u>		97
<u>実 験 の 部</u>		98
<u>参 考 文 献</u>		124

## 序論

地球上のほとんどの生物は酸素なしでは生きていけない。生物は酸素を取り込んで種々の反応を介して生体保持に必要なエネルギーを得ている。しかし酸素はその化学的性質から、生体に対して好ましくない酸化反応を起こすこともあり、その結果過酸化脂質と呼ばれる物質を生成して、生体に悪影響を及ぼすことが明らかになってきた。

脂質は生体内においてりん脂質として細胞膜や細胞内小器官の膜の重要な構成要素として存在している。りん脂質はFig. 1に示すような構造を持ちβ位には不飽和脂肪酸を含むことが多く、その存在によって生体膜の流動性や透過性という特性が発揮される。

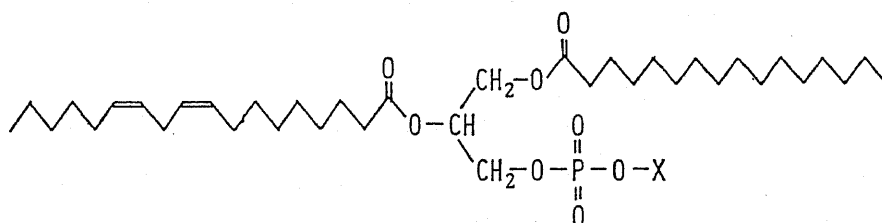


Fig. 1. Structure of phospholipids.

特に二重結合を二個以上含む高度不飽和脂肪酸は生体構成成分としてだけでなく必須脂肪酸として栄養学的にも重要であり、プロスタグランジンのような生理活性物質の生合成の前駆物質としても重要である。しかしこの高度不飽和脂肪酸は酸化を受けやすく、生成する過酸化脂質は生体膜の破壊、溶血<sup>1)</sup>、動脈硬化<sup>2)</sup>、糖尿病<sup>3)</sup>、肺疾患<sup>4)</sup>、肝疾患<sup>5)</sup>などに関連していると考えられている。さらに老化<sup>6)</sup>やがん<sup>7)</sup>の発生にも過酸化

脂質が関与しているとの考え方もある。

脂質の過酸化は生体内でも生体外でも起こり得る。生体外の反応としては分子状酸素による自動酸化が最も重要である。この反応はFig. 2に示すようなラジカル連鎖反応であり、開始反

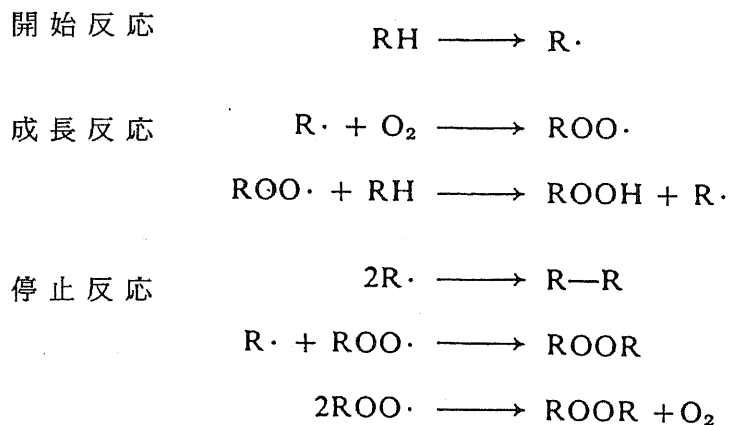


Fig. 2. Mechanism of the radical chain reaction in the autoxidation.

応、成長反応、停止反応の三段階に分類される<sup>8)</sup>。高度不飽和脂肪酸の場合はFig. 3に示すように二個の二重結合の間のビスアリル位のメチレン水素が最も引き抜かれやすく、酸素による

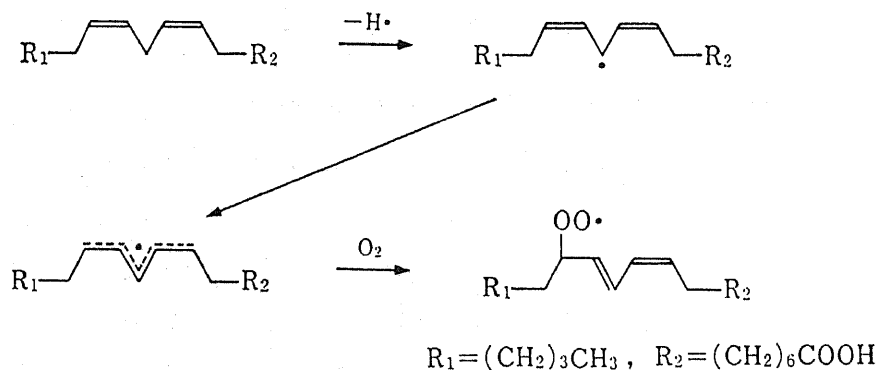


Fig. 3. Initiation of the autoxidation of linoleic acid.

この水素引き抜き反応がラジカル連鎖の開始反応である。生成したラジカルはより安定な共役形のアリルラジカルになり、酸素と反応してヒドロペルオキシラジカルを生ずる。ヒドロペルオキシラジカルは他のリノール酸から水素を引き抜き、連鎖反応が進展する。生成するヒドロペルオキシドは高度不飽和脂肪酸の場合は二重結合が共役したものだけである。例えば、高度不飽和脂肪酸のなかで最も構造の簡単なリノール酸ではアリルラジカルと酸素との反応点は2ヶ所であり、生成する共役ジェンヒドロペルオキシドには4種類の異性体がある (Fig. 4) <sup>9)</sup>。

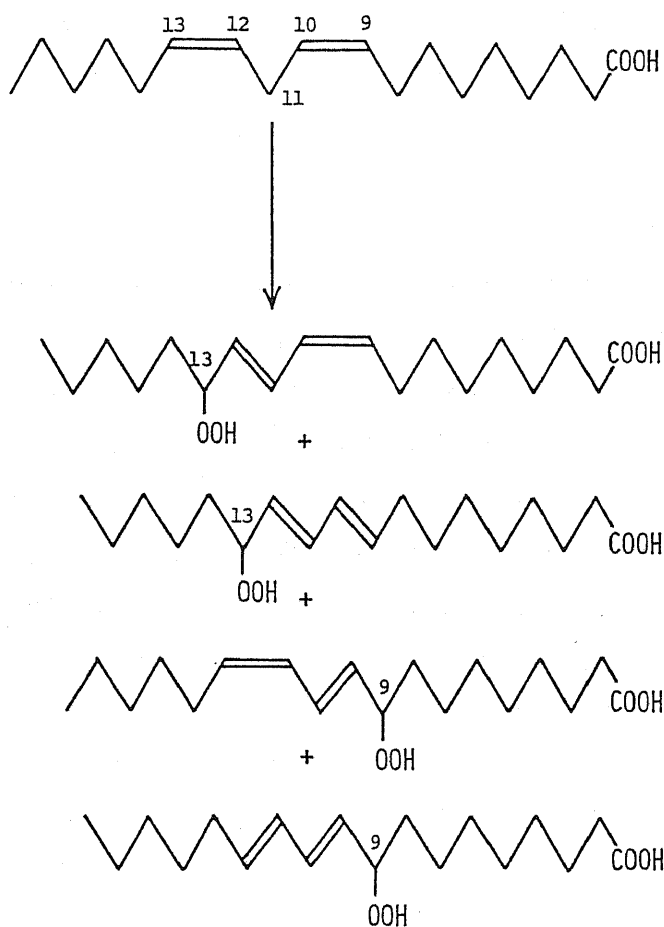


Fig. 4. Four isomeric linoleic acid hydroperoxides prepared from the autoxidation of linoleic acid.

また活性酸素種である一重項酸素によっても不飽和脂肪酸は過酸化物となるが、この酸化反応はエン反応で進行するので、二重結合が共役していない過酸化物も生成する点で自動酸化とは異なる<sup>10)</sup>。

生体内で過酸化脂質を生成する酵素としてはリポキシゲナーゼがよく知られている<sup>11)</sup>。この酵素は植物界に広く存在し、近年動物からも見い出されるようになってきた<sup>12)</sup>。生成するヒドロペルオキシドの種類は酵素の起源、純度、反応条件によって同一基質からでも異なる。この酵素反応は自動酸化と同様のラジカル反応で進むと考えられている<sup>13)</sup>。他にはプロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ<sup>14)</sup>、スーパーオキシド( $O_2^-$ )依存性脂質過酸化反応を起こすキサントキシゲナーゼ<sup>15)</sup>およびミクロソーム<sup>16)</sup>なども知られている。

過酸化脂質と総称される物質は狭義では脂質や脂肪酸の過酸化物を指すが、一般的にはそれに関連する種々の化合物群を含むことが多い。過酸化脂質は毒性が強く生体に有害な作用を示すことは上記の疾患との関連からも多数報告されているが、実際に生体に対して有害な作用を及ぼす化合物についての研究は極めて少ない。その原因は脂質過酸化反応の一次産物として生成するヒドロペルオキシドが不安定で、さらに酸化反応を受けて、Fig. 5のようにアルデヒドや炭化水素を始めとする種々の二次産物に変化しやすく<sup>17)</sup>、それらの分離や精製が困難であったためと思われる。

従来過酸化脂質の毒性研究では、植物油や不飽和脂肪酸の酸化混合物を動物に投与して、その影響を調べたものが多かった。またヒドロペルオキシドを単離しても、さらに異性体レベルまで精製することができなかつたので、異性体の混合物のまま用

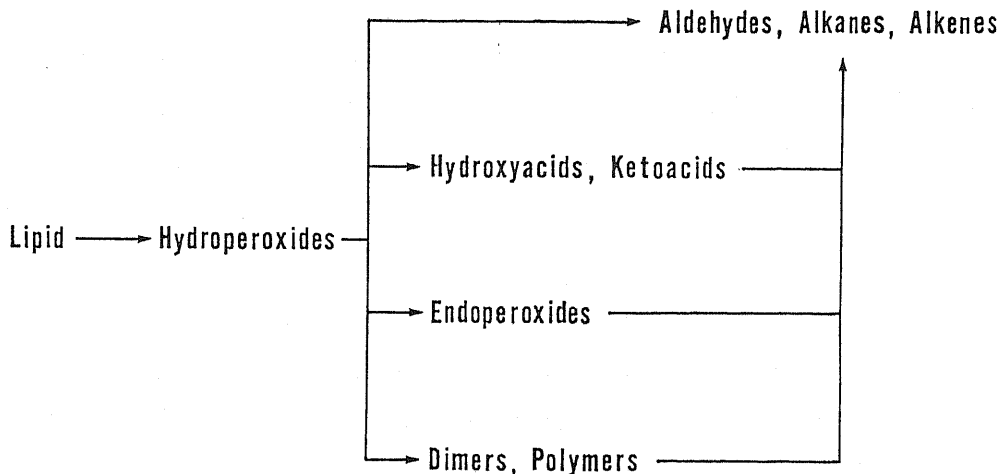


Fig. 5. Secondary products derived from lipid peroxides.

いて反応性が調べられてきた。また過酸化脂質は不安定で、分解しやすいため、迅速な単離法の確立が望まれていた。近年高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が急速に発達し、異性体の分離を始め種々の生成物の分離が可能になった。例えば、リノール酸メチルの自動酸化から生成する4種類のヒドロペルオキシドはHPLCを用いて不完全ではあるが分離された<sup>18)</sup>。分離が困難な遊離リノール酸のヒドロペルオキシドでも、13-Z, E-L00Hおよび13-E, E-L00Hの分離が報告された<sup>19)</sup>。そして精製したリノール酸メチルのヒドロペルオキシド異性体 [methyl (9E, 11Z)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoate] を用いた研究から、ヒドロペルオキシドは酸素の存在下において異性化反応を起こすことが見い出された<sup>20)</sup>。著者は過酸化脂質の反応性を研究する場合、その基本構造である不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドの化学的性質をまず解明することが重要であると考えた。そこで構造の簡単なリノール酸のヒドロペルオキシド [(9Z, 11E)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid] の

種々の共存ガスおよび溶媒に対する性質を検討し、嫌氣的条件下においても異性化が起こることを初めて見出した<sup>21)</sup>。

正常な生体においては、過酸化脂質の生成は防御系によって抑えられている。例えば、過酸化反応の開始剤となり得る活性酸素のうちスーパーオキシドにはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が、過酸化水素や他の過酸化物にはカタラーゼやペルオキシダーゼという酵素が存在し過酸化反応を抑えている。一方生体内において酵素系ではなくて強い抗酸化性やラジカル捕捉性を示す化合物としてはビタミンE ( $\alpha$ -tocopherol) やグルタチオンのようなチオール化合物が知られている。チオール化合物と過酸化物との反応機構は3価の鉄の存在下でシステインとリノール酸メチルヒドロペルオキシドとを用いて詳しく検討されている<sup>22-24)</sup>。システインは嫌氣的条件下においては過酸化物由来のアルコキシラジカルを捕捉して付加物を形成するが、酸素が存在すると過酸化物に直接には作用しなくなる。これに対して、ビタミンEを脂質過酸化物と反応させた場合の生成物に関する報告は少なかった。単離同定された生成物としては、窒素気流下でリノール酸メチルヒドロペルオキシドとビタミンEまたはそのモデル化合物を光または3価の鉄の存在下で反応させ、クロマノキシ基が付加したシスおよびトランスエポキシドが報告された<sup>25)</sup>。しかし生体内は決して嫌氣的条件ではないと考えられるにもかかわらず、酸素の影響など詳しい検討が為されていなかった。著者は2価鉄存在下における(9Z, 11E)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid とビタミンEモデル化合物との反応を空気中とアルゴン中で比較検討した。その結果、分子状酸素はビタミンE類のラジカル捕捉反応には影響を及ぼさず、チオール化合物とはその反応性が異なることを明らかにした<sup>26)</sup>。

脂質過酸化反応の一次産物であるヒドロペルオキシドは上述のように不安定で多種類の二次産物に変化する<sup>17)</sup>。過酸化脂質の毒性が何に由来するのかについてはラットなどの動物を用いて研究されてきた<sup>27, 28)</sup>。しかし動物を用いた実験では、投与物質が毒性を示したとしても、代謝や分解などの問題から実際に毒性を発揮したものが何かを明確にすることが難しくなることも考えられる。著者は生体モデルとして単純化された培養細胞を用い、細胞致死を指標として過酸化脂質関連化合物の毒性を検討した。細胞としてはヒト由来の線維芽細胞および血管内皮細胞を用いた。リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシドおよびその分解から生ずるアルデヒドについて細胞毒性を調べた。その結果、リノール酸ヒドロペルオキシド、(E)-4-hydroxy-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienalおよび(E,E)-2,4-decadienal (Fig. 6) がこれらの培養細胞に強い毒性を示すことをあきらかにした<sup>29, 30)</sup>。

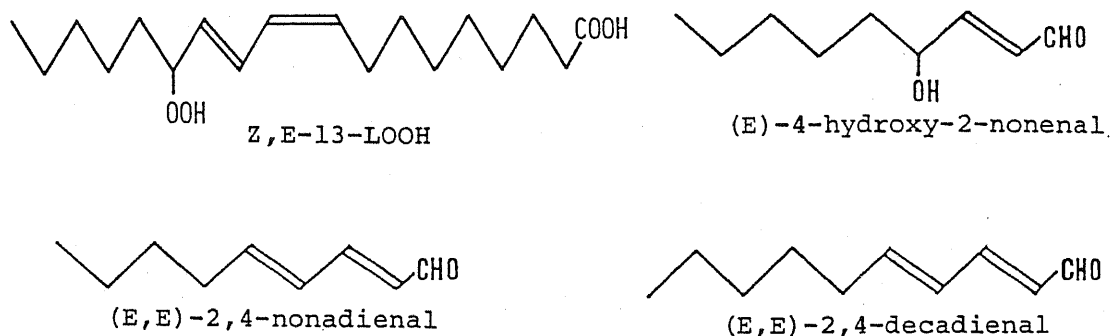


Fig. 6. Structures of cytotoxic compounds.

ところで毒性を持つ化合物が実際に毒性を発揮するには、その化合物の生成量が重要な因子であると考えられる。そこで高度不飽和脂肪酸を自動酸化して、その混合物中で実際に毒性を

発揮している化合物の検索を試みた。不飽和脂肪酸の種類によって酸化反応の進行が異なるため、40℃で3日間酸素を通じるという一定の反応条件下において生成した酸化混合物について毒性を検討した。その結果、リノール酸の場合そのヒドロペルオキシドが、アラキドン酸の場合は(E)-4-hydroxy-2-nonenal が酸化混合物の毒性の主要成分であることを確認した。

本論文では、第1章ではリノール酸ヒドロペルオキシドの異性化および分解への気相や溶媒の影響について述べ、第2章では生体内において抗酸化剤およびラジカル捕捉剤として機能するビタミンE ( $\alpha$ -tocopherol) のモデル化合物である 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol によるリノール酸ヒドロペルオキシドの捕捉反応について述べる。リノール酸ヒドロペルオキシドおよびその酸化分解から生成するアルデヒドの細胞毒性について、ヒト線維芽細胞に対する研究を第3章に、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する研究を第4章に記述した。第5章では数種の高度不飽和脂肪酸の自動酸化物の毒性について述べる。

# 本 論

## 第 1 章 リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化反応

過酸化脂質が生体にとって栄養学および病理学的に有害であると数多く報告されている。過酸化脂質と呼ばれる物質のうち最も基本となる化合物は不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドである。この化合物の化学的および生化学的反応性が過酸化脂質の性質の根源となっていると考えられる。しかし脂質は、分子レベルで純粋な形として単離したり、構造を確認したりすることが遅れている生体成分の一つである。従来の過酸化脂質の研究では脂肪酸は混合物のまま使用されていたので、生成する過酸化化物も単一構造ではなかった。更に過酸化化物は不安定であることも精製を困難にさせていた。

近年、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が急速に発達し、不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドの異性体が精製できるようになった。リノール酸メチルヒドロペルオキシドの位置異性体の分離が1975年に報告され<sup>31)</sup>、次いで1977年には立体異性体の分離が報告された<sup>18)</sup>。これにより従来混合物のまま実験に供されてきた過酸化脂質が純粋な有機化合物として取り扱えるようになった。

著者は不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドの性質のうち分解および異性化に興味をもち、ヒドロペルオキシドの異性体を単離して、実験を試みた。

## 第1節 リノール酸ヒドロペルオキシドの合成および精製

リノール酸をほう酸緩衝液 (pH 9.0) 中でダイズリポキシゲナーゼ-1 によって酸化し<sup>32)</sup>、シリカゲルカラムでヒドロペルオキシドを分離した。このヒドロペルオキシドを HPLC で分析すると異性体の混合物であることが判明した (Fig. 7)。

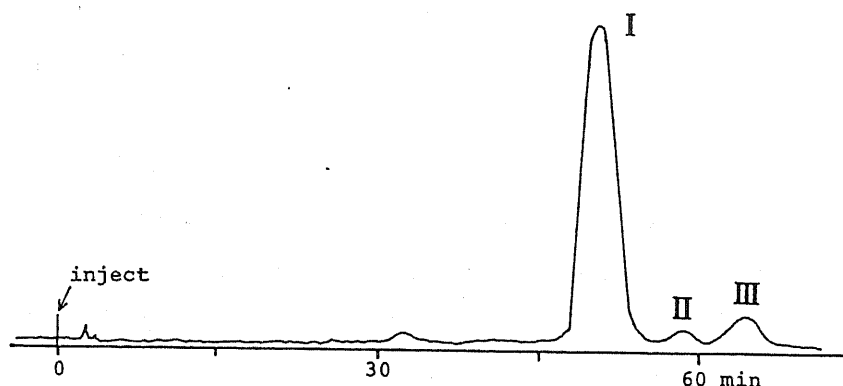
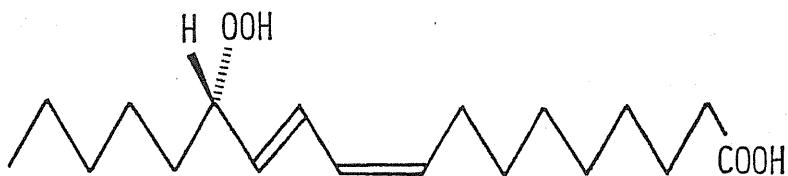


Fig. 7. High performance liquid chromatogram of linoleic acid hydroperoxides derived from the oxidation of linoleic acid with soybean lipoxygenase-1.

分取用 HPLC カラムを用いてピーク I を分離精製した。ピーク I は本酵素からの主生成異性体と報告されている (13S)-(9Z, 11E)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid (Z, E-13-L00H) である<sup>13)</sup>と考えられた (Fig. 8)。他のヒドロペルオキシド異性体 II および III は本酵素反応では少量しか生成しないので自動酸化によって合成し、酵素反応の場合と同様に処理してピーク II および III に相当する分画を分離精製した。

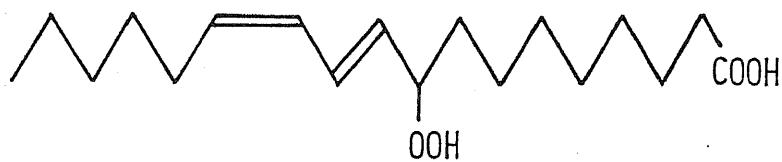
ヒドロペルオキシドとしては Fig. 8 に示すようにヒドロペルオキシ基の付く位置が 9 位と 13 位の二点がある。さらにそれぞれ二重結合の幾何異性によって 2 種類の合計 4 種類の異性体があるが、ピーク I、II、III の構造の確認には質量分析法 (MS)



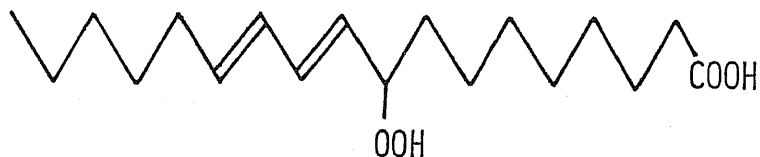
(13S)-(9Z,11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid  
(Z,E-13-LOOH)



(9E,11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid  
(E,E-13-LOOH)



(10E,12Z)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid  
(E,Z-9-LOOH)



(10E,12E)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid  
(E,E-9-LOOH)

Fig. 8. Structures of linoleic acid hydroperoxides.

および核磁気共鳴分光法 (NMR) が有効であった。ピーク I、II、III の分画を  $\text{NaBH}_4$  還元、メチルエステル化、接触還元、およびトリメチルシリル (TMS) 化と処理して得た methyl trimethylsilyloxystearate を MS で分析した。ピーク I および II からの誘導体では  $m/e$  315、173 が、ピーク III からの誘導体では  $m/e$  259、229 が確認されたこと (Fig. 9) から、ピーク I および II は 13-ヒドロペルオキシドであり、ピーク III は 9-ヒドロペルオキシドであると判明した。プロトン-NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ; 200 MHz) におけるオレフィン性プロトンおよびヒドロペルオキシ基の付加した炭素のメチンプロトンの結合定数の分析およびデカップリング法を用いて二重結合の幾何異性と位置を決定した。従来リノール酸メチルヒドロペルオキシドのうち 13-Z, E-, 13-E, E-, および 9-E, Z-異性体の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは報告されていたが、それらのオレフィンプロトンの帰属は為されていない<sup>18)</sup>。またダイズリポキシゲナーゼ-1 により生成する 13-Z, E-LOOH は重水中における測定が

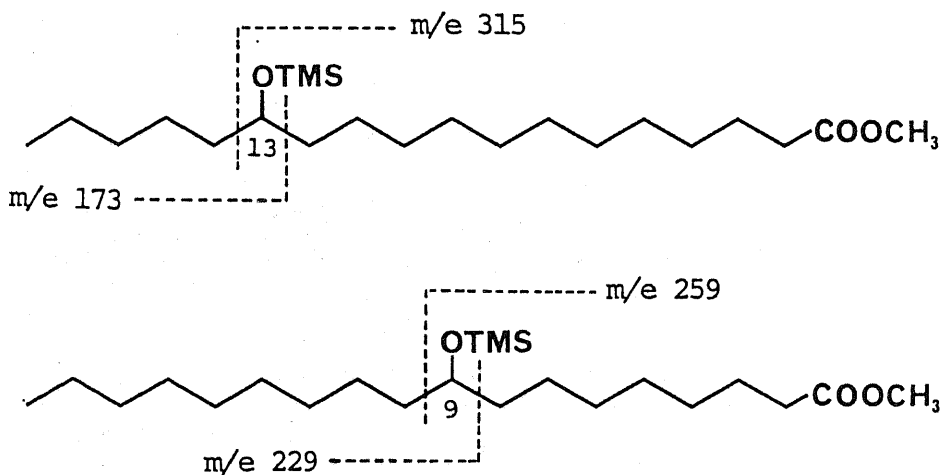


Fig. 9. Origin of characteristic fragment ions in the mass spectra of trimethylsilyl derivatives of methyl 9-hydroxystearate and methyl 13-hydroxystearate.

報告されたが、9位と12位のシグナルが重なりオレフィンプロトンの完全な解析はできなかった<sup>33)</sup>。本実験で単離した各ピーク分画の重メタノール中の<sup>1</sup>H-NMRチャートの低磁場部分をFig. 10に示した。ピークIの分画はヒドロペルオキシ基に隣接した二重結合のプロトンが15Hzの結合定数を示したのでE(トランス)であり、それに共役した二重結合は11Hzの結合定数を示したのでZ(シス)であることが判明した(Fig. 10a)。ピークIIの分画は共役した二重結合のいずれもが15Hzの結合定数を示したのでEE異性体であることが明らかになった(Fig. 10b)。ピークIIIの9-ヒドロペルオキシド(Fig. 10c)はオレフィン周辺のクロモフォアに関しては13-ヒドロペルオキシドと同様であると考えられることから、EEとEZ異性体の

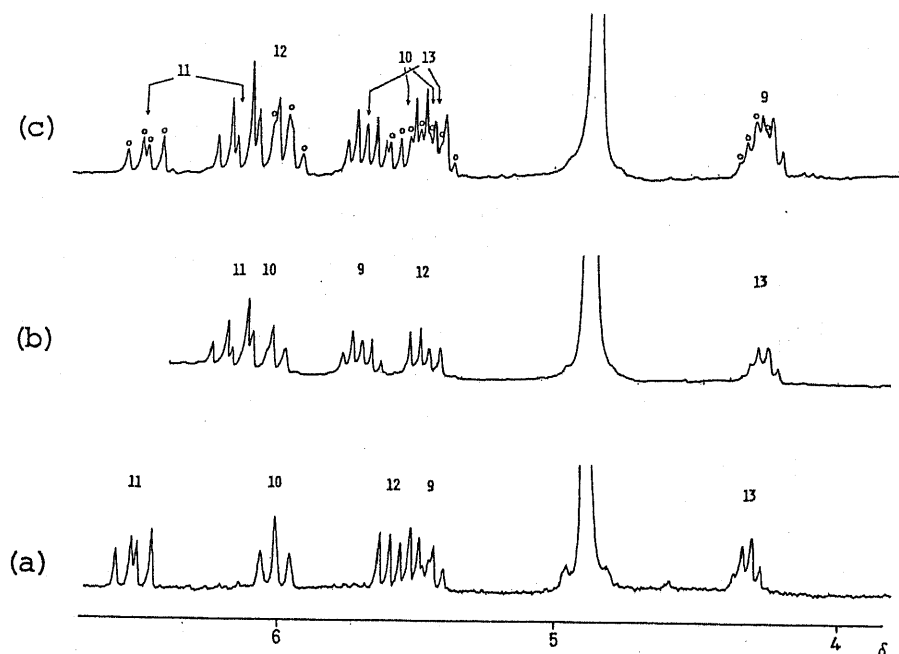


Fig. 10. Low field region of <sup>1</sup>H-NMR spectra of linoleic acid hydroperoxides [(a), peak I; (b), peak II; (c), peak III]. Numbers in the spectra indicate positions assigned in each compound. Signals marked with open circle in the spectrum (c) indicate protons based on 9-E,Z-LOOH.

混合物であると判定された。Fig. 10c中で○印を付けたシグナルは9-E, Z-L00Hに由来すると考えられるものである。MSおよび<sup>1</sup>H-NMRの結果より、各シグナルはTable Iのように帰属され、ピーク I は(9Z, 11E)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid (Z, E-13-L00H)、ピーク II は(9E, 11E)-13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid (E, E-13-L00H)、ピーク III は(10E, 12Z)-および(10E, 12E)-9-hydroperoxy-10, 12-octadecadienoic acid (E, Z-9-L00HおよびE, E-9-L00H)の混合物であるとを同定された。

Table I

Proton chemical shifts of H-9~13 in linoleic acid hydroperoxides.

Hydroperoxide	Solvent	H-9	10	11	12	13
Z,E-13-L00H	CDCl <sub>3</sub>	5.52(8,11)	6.04(11)	6.60(11,15)	5.60(7,15)	4.41
E,E-13-L00H	"	5.77(8,15)	6.08(9,15)	6.30(9,16)	5.50(8,16)	4.26
E,Z-9-L00H	"	4.38	5.56	6.60(10,15)	6.05	5.56
E,E-9-L00H	"	4.38	5.56	6.29(10,15)	6.05	5.78(7,15)
Z,E-13-L00H	CD <sub>3</sub> OD	5.45(8,10)	6.01(10,11)	6.54(11,16)	5.57(8,16)	4.28
E,E-13-L00H	"	5.76(8,15)	6.12(10,15)	6.20(10,15)	5.50(8,15)	4.25
E,Z-9-L00H	"	4.28	5.57(8,15)	6.54(10,15)	6.01	5.45
E,E-9-L00H	"	4.25	5.47(8,15)	6.18(10,15)	6.06	5.72(7,14)

Internal standard: TMS.

各異性体の炭素-13 NMR (<sup>13</sup>C-NMR)によるシグナルは選択デカップリング法<sup>34)</sup>および残余スピン結合プロット法<sup>35)</sup>を用いて Table IIのように帰属した。

Table II

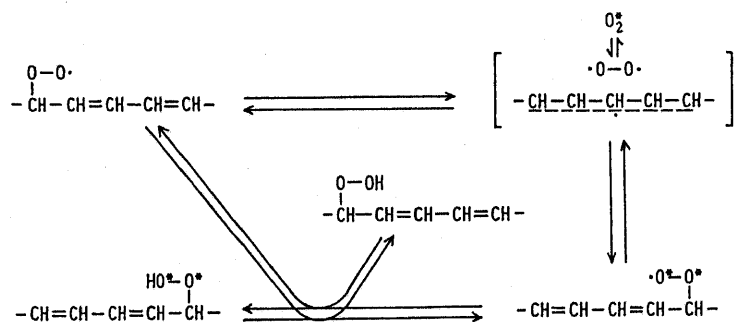
Carbon chemical shifts of C-8~16 in linoleic acid hydroperoxides.

COMPOUND	SOLVENT	C-16	15	14	13	12	11	10	9	8
E,E-9-LOOH	CDCl <sub>3</sub>	31.5	25.2	32.6	<u>136.0</u>	<u>129.5</u>	<u>134.5</u>	<u>129.5</u>	86.4	32.6
					E	E	E			
E,Z-9-LOOH	"	31.5	25.2	27.8	<u>133.3</u>	<u>127.8</u>	<u>129.4</u>	<u>131.7</u>	86.4	32.6
					Z	E	E			
E,E-13-LOOH	"	31.8	25.0	32.6	86.7	<u>129.2</u>	<u>134.2</u>	<u>129.4</u>	<u>136.2</u>	32.6
						E	E	E		
Z,E-13-LOOH	"	31.8	25.0	32.6	86.7	<u>131.5</u>	<u>129.7</u>	<u>127.7</u>	<u>133.6</u>	27.6
						E	Z	Z		

Internal standard: TMS.

## 第 2 節 リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化

リノール酸ヒドロペルオキシドは不安定で熱、光または金属イオンなどによって容易に分解される<sup>36)</sup>。近年、ヒドロペルオキシドは酸素存在下において、ヒドロペルオキシドは酸化分解ばかりでなく異性化をも受けることが近年見いだされ<sup>37)</sup>、脂質ヒドロペルオキシドの化学的不安定性を示す現象の一つとして注目された。Chanらはリノール酸メチルヒドロペルオキシドの四異性体（13-Z, E-, 13-E, E-, 9-E, Z-, および9-E, E-異性体）を単離（純度73%以上）して40℃に加熱すると、それぞれの異性体は異性化を受けて四異性体の混合物になることを報告した<sup>20)</sup>。さらに彼らは酸素-18で標識したリノール酸メチルヒドロペルオキシド（9-E, Z-異性体）を40℃で16時間加熱した後、回収した原料ヒドロペルオキシドには<sup>18</sup>Oが82%保持されており、異性化で生成した他の3種類のヒドロペルオキシドには<sup>18</sup>Oがいずれの異性体にも約55%取り込まれていたことから、Fig. 11に示すような機構を提唱した。そして



H.W.-S. Chan, G. Levett, and J.A. Matthew, *Chem. Phys. Lipids*, **24**, 245 (1979)

Fig. 11. Mechanism of the isomerization of linoleate hydroperoxides in the presence of oxygen.

嫌氣的条件下ではヒドロペルオキシドの異性化は起こらないと報告した。また、Singleton はリノール酸ヒドロペルオキシド（13-Z,E-LOOH が約70%の混合物）をヘキサン溶液で25℃に保持すると異性化が起こり、その異性化は温度や濃度が高いほど速いと報告した<sup>38)</sup>。著者は嫌氣的条件下において異性化が起こるか確かめることが不安定なヒドロペルオキシドの反応性を検討や保管に重要であると考え、嫌氣的条件下を始めとして種々の条件下におけるリノール酸ヒドロペルオキシド（13-Z,E-LOOH）の異性化および分解を検討した。

種々の溶媒や共存ガス下においてリノール酸ヒドロペルオキシドを50℃に加熱した。経時的に234nmの吸光度（共役ジェン構造による）の変化およびHPLCにおける各ヒドロペルオキシド異性体のピーク面積を測定した。異性化（I）と分解（D）の割合は次式に従って求めた。

$$I = (100 - A) \times \frac{[\text{全LOOH面積}] - [\text{原料LOOH}]}{[\text{全LOOH面積}]}$$

$$D = A + (100 - A) \times \frac{[\text{LOOH以外の生成物面積}]}{[\text{全面積}]}$$

A : 234nmの吸光度の減衰率

面積 : HPLCによるピーク面積

## ベンゼン中アルゴン雰囲気下におけるリノール酸ヒドロペルオキシドの異性化

脱気とアルゴンガス導入を4～5回繰り返してアルゴン雰囲気にしたバイアルにミニナートバルブを装着し、アルゴンガスで飽和した50 mMリノール酸ヒドロペルオキシド (Z,E-13-LOOH) / ベンゼン溶液を加え50℃に加熱すると、異性化が起こり、E,E-13-LOOH およびE,E-9-LOOHが生成した (Fig. 12)。Z,E-13-LOOHの異性化は反応初期に急速に進行するのに対して、分解は反応時間が延びるに従って比較的ゆっくり増加した (Fig. 13)。異性化生成物をHPLCで分離し、 $^1\text{H-NMR}$ を用いて同定した。従来Z,E-13-LOOHの異性化においては他の3種類の異性体が生成すると報告されている<sup>20,38)</sup>。本実験で分離した9-LOOH分画を $^1\text{H-NMR}$ で調べるとE,Z-9-LOOHを含まないことを示した。この結果は得られた9-LOOH分画を tri-phenylphosphineで還元しても、(10E,12E)-9-hydroxy-10,12-

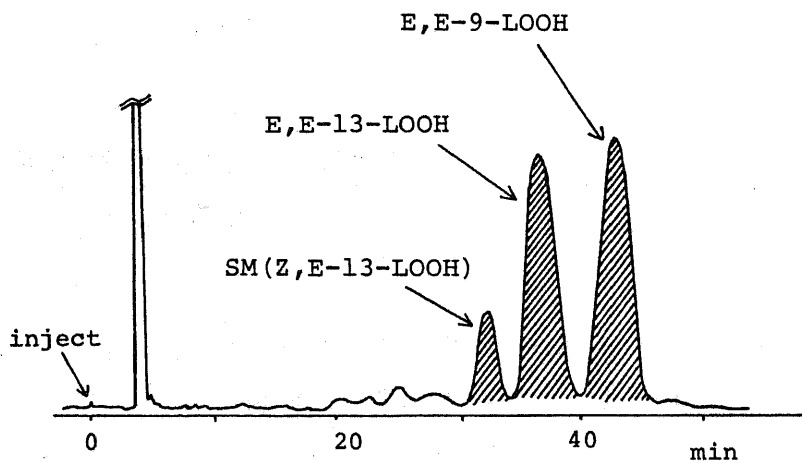


Fig. 12. High performance liquid chromatogram of Z,E-13-LOOH incubated for 2 days at 50°C under argon.

octadecadienoic acid しか得られないことから確認された。また E,E-13-LOOH は同条件下で E,E-9-LOOH に異性化するが、その速度は Z,E-13-LOOH よりもかなり遅かった (Fig. 14)。

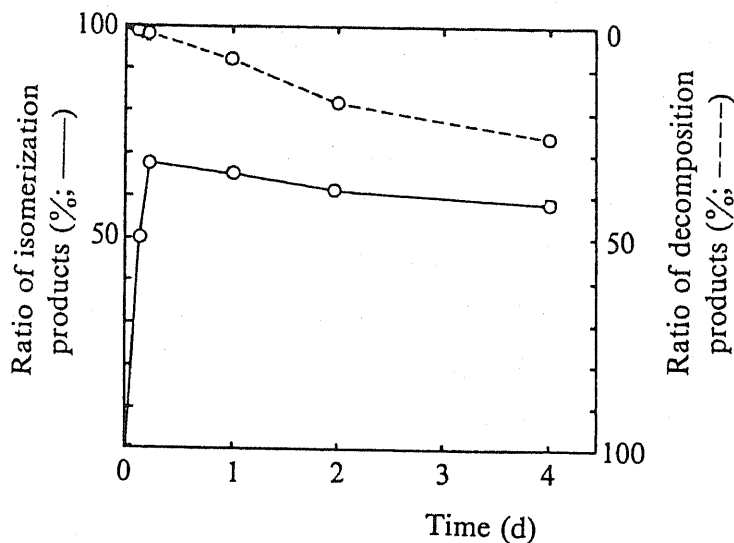


Fig. 13. Time courses of the isomerization and decomposition of Z,E-13-LOOH at 50°C under argon.

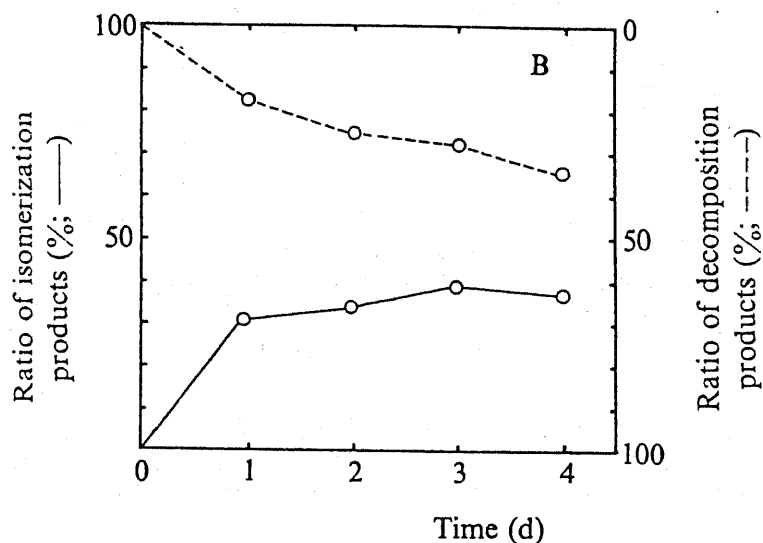


Fig. 14. Time courses of the isomerization and decomposition of E,E-13-LOOH at 50°C under argon.

## 異性化に対する溶媒の効果

アルゴン雰囲気下、種々の溶媒中におけるZ,E-13-LOOHの異性化および分解の経時変化をFig. 15に示した。ベンゼン中(○)では異性化が急速に起こり、6時間後には約70%がE,E-13-LOOHおよびE,E-9-LOOHへ異性化したが、分解はほとんど起こっていなかった。異性化の割合はその後徐々に減少し、分解が増加した。クロロホルム中(▲)では異性化と分解の両反応が急速に起こり、2日後にはほとんど全て分解した。それに対してメタノール中(△)では異性化はほとんど起こらず、分解のみが起こった。n-プロピルエーテル中(●)では異性化も分解もいずれもあまり進行しなかった。

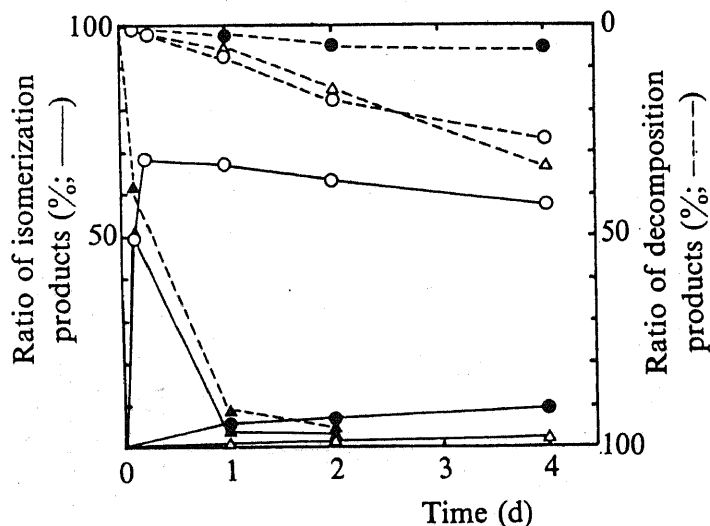


Fig. 15. Effects of solvents on the isomerization and decomposition of Z,E-13-LOOH under argon: ○, benzene; ●, n-propylether; △, methanol; ▲, chloroform.

## 異性化に対する共存ガスの影響

異性化が急速に起こるベンゼンおよび異性化の起こりにくい *n*-プロピルエーテルを溶媒として用い、*Z,E*-13-LOOH の異性化と分解に対する共存ガスの影響を調べた。いずれの溶媒でも窒素雰囲気下の結果はアルゴン雰囲気下のものと同様であった (Fig. 16)。一方、空気および酸素雰囲気下では、酸素の影響が顕著に現れた。ベンゼン溶液では、酸素の有無にかかわらず異性化の初期速度はアルゴン中 (○) や窒素中 (●) とほぼ同様であった。しかし分解反応は酸素の存在で促進され、1日後には *Z,E*-13-LOOH はほとんど消失し、それ以降異性化生成物も急速に分解した。*n*-プロピルエーテル溶液では酸素が存在する (△、空気; ▲、酸素) と、異性化および分解のいずれもが促進された。

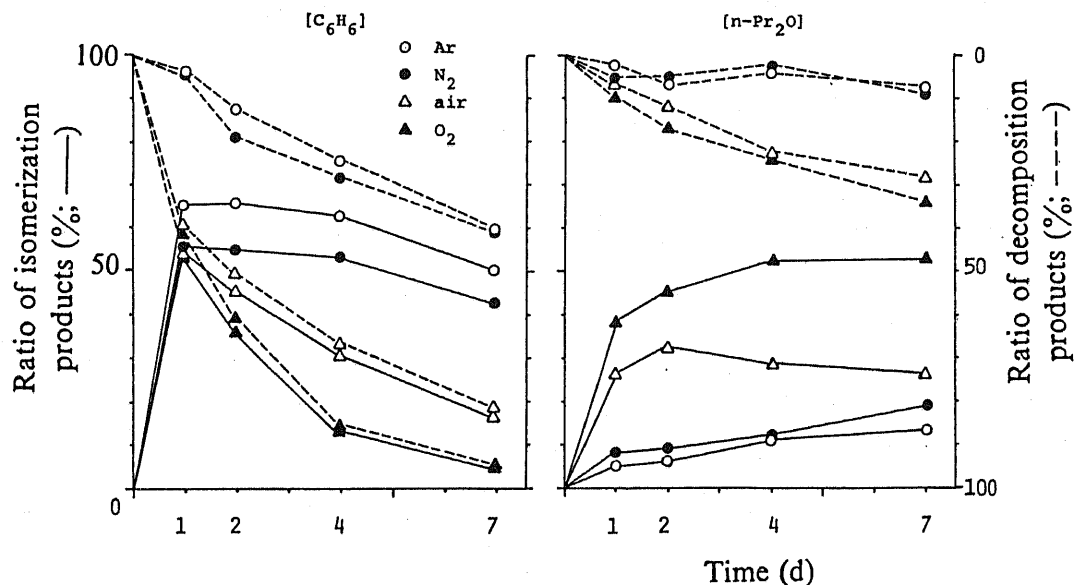


Fig. 16. Effects of gas phase on the isomerization and decomposition of *Z,E*-13-LOOH in benzene or *n*-propylether.

## 異性化に対する B H T および A I B N などの影響

アルゴン雰囲気下で Z, E-13-L00H のベンゼン溶液にラジカル捕捉剤である butylated hydroxytoluene (B H T) を添加する (●) と、異性化は完全に抑制されたが分解は生じた (Fig. 1.8)。異性化反応の進行しにくい n-プロピルエーテル溶液にラジカル開始剤である  $\alpha, \alpha$ -azobisisobutyronitrile (A I B N) を添加した (▲) が、異性化反応は促進されず分解のみが促進された。

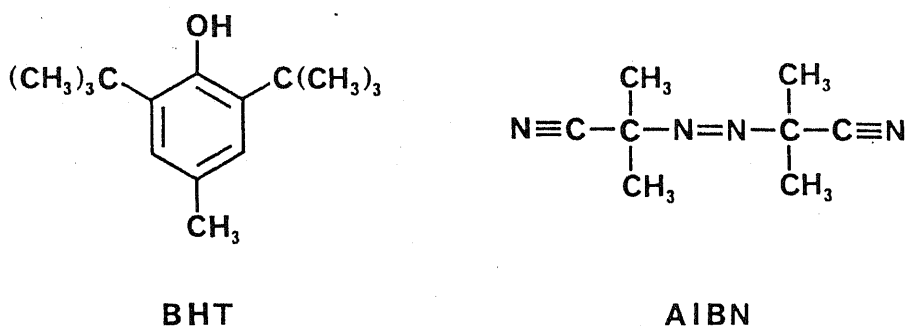


Fig. 17. Structures of butylated hydroxytoluene (BHT) and  $\alpha, \alpha$ -azobisisobutyronitrile (AIBN).

異性化に対する Z, E-13-L00H の濃度の影響を窒素雰囲気下において 10 から 100 mM の濃度範囲で調べたが、Singleton が報告したような濃度依存性<sup>38)</sup> は認められなかった。

Z, E-13-L00H のベンゼン溶液をアンプルに入れ、脱気 ( $5.0 \times 10^{-4}$  mmHg) して封入し、50 °C に加熱すると異性化は起こったが、アルゴン雰囲気下よりも少なかった。Z, E-13-L00H をアンプルに入れアルゴン下に封入して、液体窒素中 (-195.8 °C) に保管すると 2 ヶ月後でも数%しか異性化を起こさず、しかもほとんど分解していなかった。

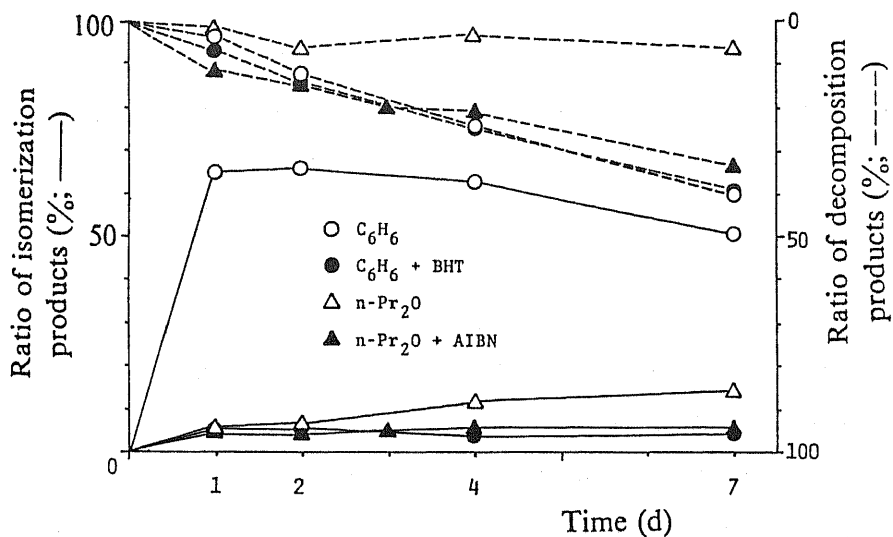


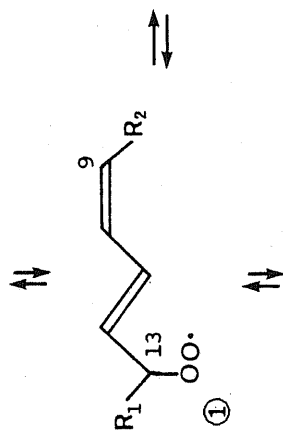
Fig. 18. Effects of BHT and AIBN on the isomerization and decomposition of Z,E-13-LOOH at 50°C under argon.

### 第3節 考察

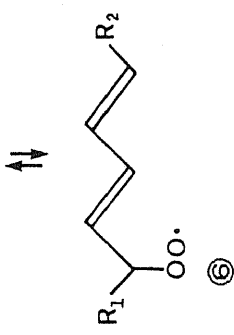
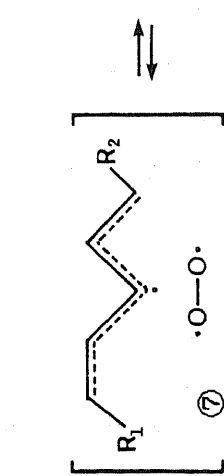
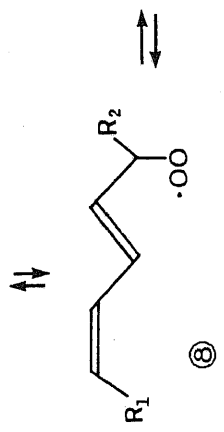
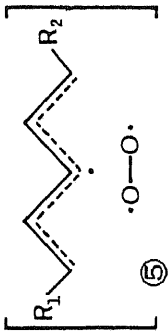
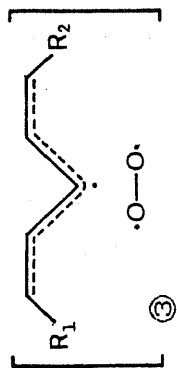
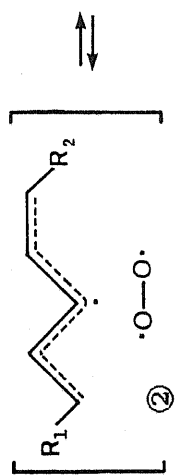
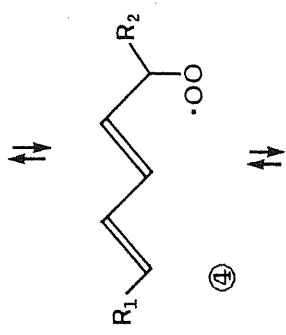
Chanらはリノール酸メチルヒドロペルオキシドが酸素存在下では異性化を起こすが、嫌氣的条件下では異性化を起こさないと報告している<sup>20)</sup>。しかし著者はリノール酸ヒドロペルオキシドの安定性は溶媒や共存ガスによって複雑な影響を受けることを見出した。

Z, E-13-L00H はベンゼン溶液中ではアルゴン雰囲気下でも E, E-9-L00H および E, E-13-L00H に異性化した。同様に E, E-13-L00H を処理すると E, E-9-L00H に異性化した。しかし E E 異性体から E Z 異性体への変化は観察されなかった。これらの実験結果および Porterらにより検討された異性化についての機構<sup>39, 40)</sup> などからリノール酸ヒドロペルオキシドの異性化機構を考えた (Fig. 19)。ヒドロペルオキシドの水素引き抜きによって生成したペルオキシラジカル①から酸素が脱離して生成するペンタジェニルラジカルには②および③が考えられる。ラジカル②の9位に酸素が付加するとペルオキシラジカル④が生成し、再び酸素の脱離および13位への付加を経てラジカル⑥が生成する。ラジカル④および⑥が他分子から水素を引き抜くと、それぞれ E, E-9-L00H および E, E-13-L00H が生成する。今回生成が確認されなかった E, Z-9-L00H はラジカル⑧から生成すると考えられるが、⑧へはラジカル③または⑦を経由しなければならない。しかし①→③または⑥→⑦という変化は立体化学的には起こりにくいと考えられる。これはニューマン式投影図を用いた Fig. 20 に示されるように、ラジカル①からの酸素の脱離において、ラジカル③への反応は②への反応と比較するとアルキル基 R<sub>1</sub> と二重結合炭素鎖との立体障害があるため進行しにくいと考えられる。

Z, E-13-LOOH



E, E-13-LOOH



E, Z-9-LOOH

E, E-9-LOOH

Fig. 19. Possible reaction pathways for the isomerization of the linoleic acid hydroperoxide.  $R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-$ ;  $R_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ .

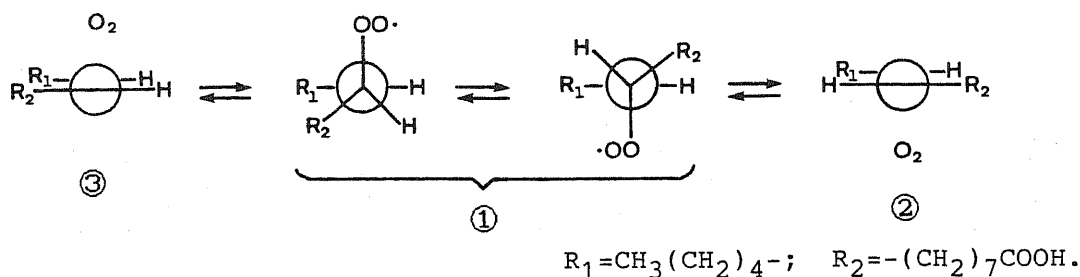


Fig. 20. A Newman's projection of radical ①.

炭素ラジカルと酸素との反応はほぼ拡散律速であることが知られており<sup>41)</sup>、さらにE, Z-ペンタジエニルラジカルは約170 °K以上の温度でE, E-ペンタジエニルラジカルに変わり得るが、逆の変化は420 °Kという高温でさえ起こらず熱力学的に大きな違いがあること<sup>42)</sup>が報告されている。従ってE, Z-ペンタジエニルラジカルがE, E-ペンタジエニルラジカルに直接異性化する可能性は考えられるが、E, E-ペンタジエニルラジカルがE, Z-ペンタジエニルラジカルに直接異性化を起こすことは考えにくい。本研究によって高度不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドが嫌氣的条件下でも異性化反応を起こすことを明らかにした。この結果より一度切断された酸素はただちに溶媒中に拡散してしまふのではなく、ある程度溶媒によるかご効果(cage effect)がありペンタジエニルラジカルの付近に留まっていると考えられる。

異性化はベンゼンおよびクロロホルム中では急速に起こるが、メタノールおよびn-プロピルエーテル中では遅いことが見いだされた。Chanらは溶媒の極性が異性化に関連すると示唆したが、今回の結果からは単純にはそのような関連は見いだされなかった。ただしクロロホルムはラジカルを生成しやすいことが知られており<sup>43)</sup>、分解と異性化の両者が急速に起こるのでは

ないかと考えられた。しかしベンゼン中で異性化が急速に進行する理由については明らかにできなかった。メタノールはヒドロペルオキシドと反応し得る<sup>43)</sup>ので、異性化反応よりも分解が優先して進行したものと思われた。このような要因を含めて考えると、やはり非極性溶媒中では異性化が起こりやすいと考えられた。

n-プロピルエーテル中では異性化や分解が遅いのでヒドロペルオキシドの貯蔵用溶媒として薦められる。しかしヒドロペルオキシドを液体窒素中で保管すると、溶媒を用いなくとも数カ月間ほとんど異性化および分解を起こさずに保持できた。従来の希釈溶液にして-20℃に保存する方法に比べて、液体窒素を用いるこの方法は簡便で効率のよいものと考えられる。

Z,E-13-L00H は n-プロピルエーテル溶液において嫌氣的条件下では異性化を起こさないが、酸素の存在下では異性化が進行するので、酸素により異性化が促進されることは確実である。ラジカル捕捉剤である BHT の添加により Z,E-13-L00H の異性化が抑制される事実は、この異性化反応がラジカル反応であることを示唆している。嫌氣的条件下の n-プロピルエーテル溶液にラジカル開始剤である AIBN を添加しても、異性化は促進されず、分解反応のみが促進された。このことは単にアルキルペルオキシラジカルを生成するだけでは、直接異性化には連結しないことを示して

## 第2章 ビタミンEモデル化合物によるリノール酸ヒドロペル オキシド捕捉反応

不飽和脂肪酸は生体内において、りん脂質の成分として生体膜の主要な構成要素をなしている。現代分子生物学では正常な生命活動の維持の根源を、細胞や細胞内小器官を区画している生体膜にあるという考えもある。生体膜は内外を隔てるコンパートメントとしての役割にとどまらず膜自身に多様な能力を保有する。しかしその成分である高度不飽和脂肪酸が酸化されると、生体膜が損傷を受けて円滑な機能の発揮に支障をきたしたり、他の生体成分と容易に反応するラジカルや二次産物に分解して、細胞さらには組織に傷害を与えると考えられている<sup>44)</sup>。

生体内において強い抗酸化性やラジカル捕捉性を示す化合物としてビタミンE ( $\alpha$ -tocopherol) やチオール化合物が知られている。このラジカル捕捉反応の機構を解明するため、ビタミンE またはそのモデル化合物と過酸化脂質との反応における生成物の分析が試みられてきた<sup>45-47)</sup>。しかし反応の複雑さ、原料過酸化脂質の精製の困難さおよび不安定さなどから生成物の単離および構造の決定は一部しか達成されていない。そのなかで最も詳しく検討されているのはFe(III)の存在下リノール酸ヒドロペルオキシドとシステインとの反応である<sup>22-24)</sup>。その反応機構はFig. 21に示すように酸素の有無によって経路が大きく異なる(実線が酸素存在下、破線が酸素不在下)。この反応ではまずシステインによるFe(III)の還元からFe(II)が生成し、ヒドロペルオキシドが分解される。嫌気的条件下ではチールラジカル(CyS $\cdot$ )は、生成するアルコキシラジカル(LO $\cdot$ )を捕捉して付加物(CySLO)を生成する。しかし酸素が存

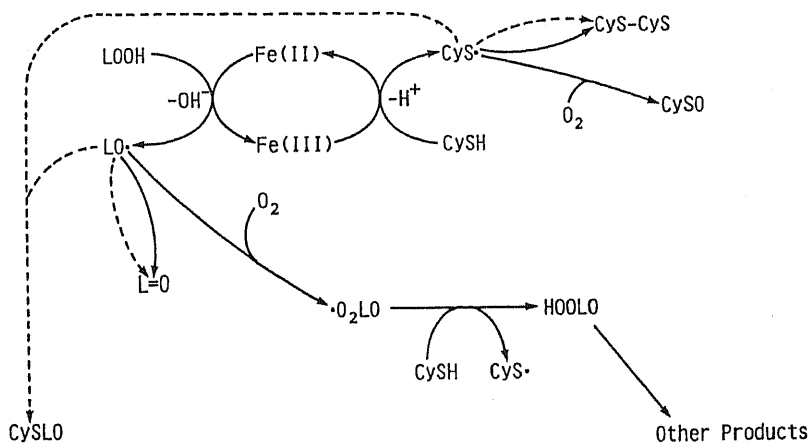


Fig. 21. Product pathways proposed for the linoleic acid hydroperoxide (LOOH) - cysteine (CySH) -  $\text{FeCl}_3$  reaction in the presence of oxygen (solid lines) or absence of oxygen (dashed lines).

[H.W. Gardner and P.A. Jursinic, *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 100 (1981)]

在するとチールラジカルは酸素と反応して、アルコキシラジカルは捕捉されない。

ビタミンEは生体膜における脂質過酸化を防護する物質として知られている<sup>48)</sup>。従ってビタミンEがラジカルを捕捉する機構についてはかなり注目されている。しかしビタミンEがいかなる機構で脂肪酸ヒドロペルオキシドと反応し、どのような化合物が生成するかについての報告はほとんどなく、生成物を確実に単離した報告は一例しかない。その報告では窒素中、光またはFe(III)の存在下でリノール酸メチルヒドロペルオキシド(異性体の混合物)とビタミンEまたはそのモデル化合物を反応させると、シス-およびトランス-エポキシ型付加物(epoxychromanoxy-octadecenoates)が生成することが見い出されている(Fig. 22)<sup>24)</sup>。著者はリノール酸ヒドロペルオキ

シドの異性体を精製してビタミンEモデル化合物との反応を行い、生成物を単離同定することによって、その反応機構についての知見を得ようと試みた。

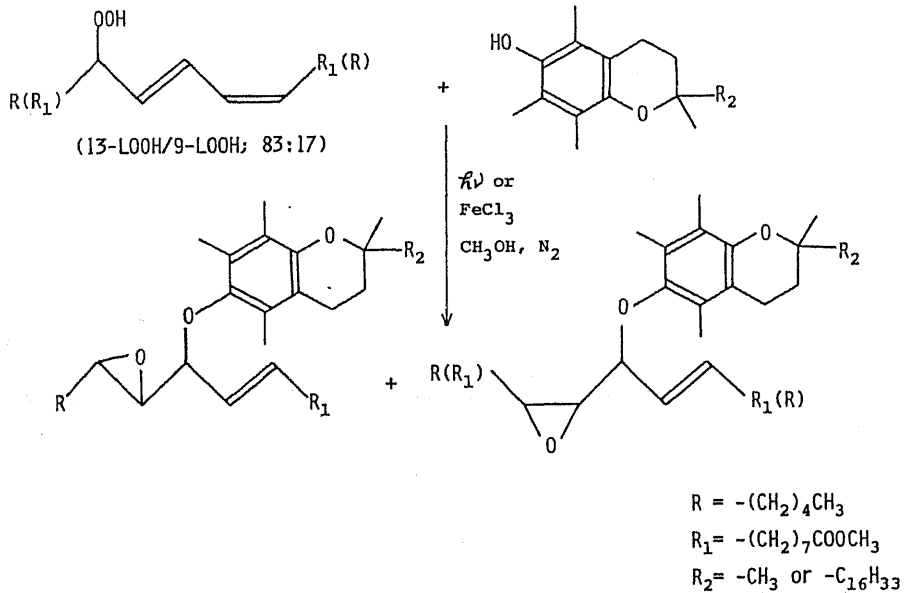


Fig. 22. Structures of addition products of linoleic acid hydroperoxide and vitamin E or its model compound (2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol).

[H.W. Gardner, K. Eskins, G.W. Grams and G.E. Inglett, *Lipids*, 7, 324 (1972)]

# 第1節 リノール酸ヒドロペルオキシドとビタミンEモデル化合物との反応

ダイズリポキシゲナーゼ-1によって作製したZ,E-13-LOOHをメタノールに溶解して4℃に冷却し、アルゴンを通じながらビタミンEのモデル化合物(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol)および過塩素酸第一鉄を添加すると、すみやかに反応が進行しヒドロペルオキシドは減少した。20分後の反応混合物をHPLCで調べるとFig. 23に示すように多数のピークが観察されたので、これらのピークの分離を試みた。またビタミンEモデル化合物(Fig. 23におけるSM)は反応混合物中に残っていたが、ヒドロペルオキシドのピーク(保持時間; 34.5分)は全く確認できなかった。

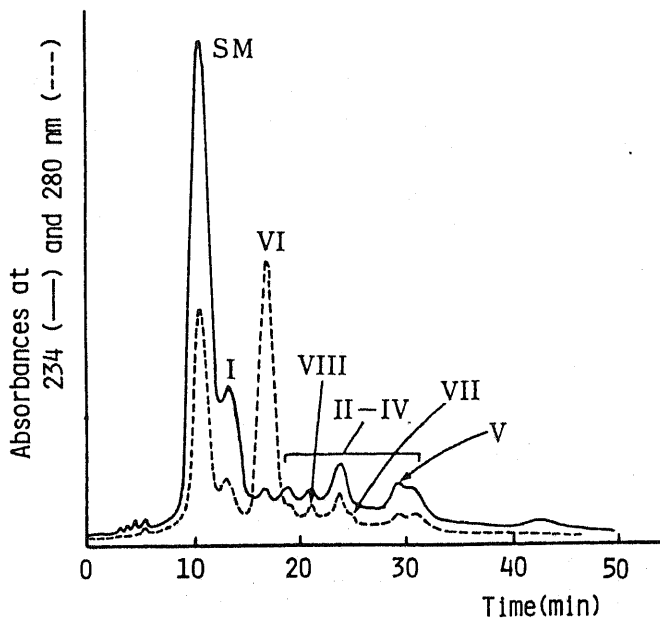


Fig. 23. High performance liquid chromatograms of the reaction mixture resulting from the addition of Fe(II) to a mixture of Z,E-13-LOOH and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol in methanol under argon. SM, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol.

まず反応混合物をシリカゲルカラムで分画し、さらに分取用 H P L C カラムを用いて精製した。単離同定された生成物を Fig. 2 4 に示した。反応混合物には原料ヒドロペルオキシドは残っていなかったが、ビタミン E モデル化合物は約 3 0 % 回収された。

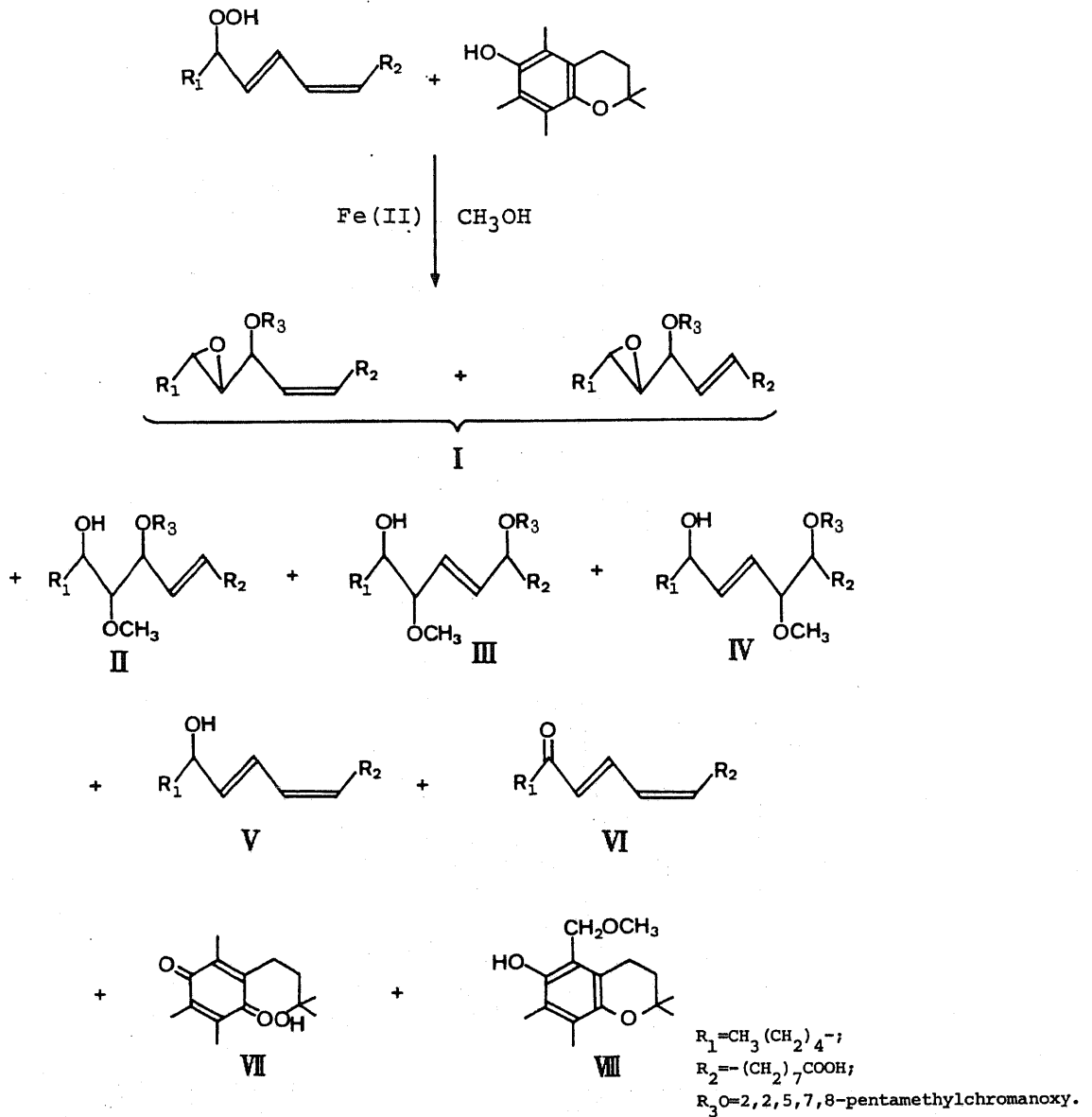


Fig. 24. Structures of products from the reaction of Z,E-13-LOOH with 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol in the presence of Fe(II).

## 第 2 節 生成物の構造決定

### エポキシ型付加物

ピーク I の化合物はメチルエステルに変換して、HPLC [MicroPak Si-10 ; ヘキサン / エーテル (97.5 : 2.5, v/v)] を用いると、3 個の分画 (I a, I b, I c) に分離された (Fig. 25)。

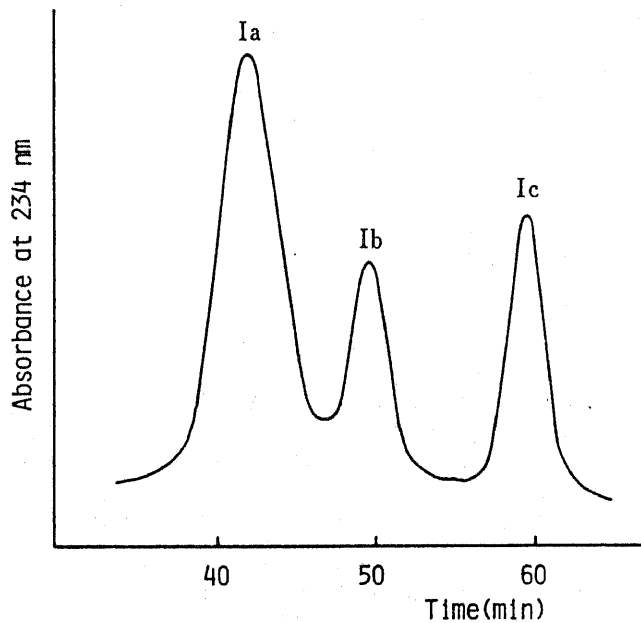
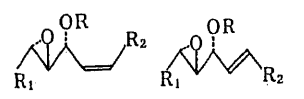
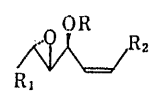
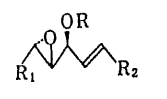



Fig. 25. Separation of methyl epoxy(pentamethylchromanoxy)-octadecenoates by high performance liquid chromatography.

各分画のスペクトルデータを Table III に示した。いずれの分画も UV スペクトルにおいて 283 および 289 nm に吸収を示し、クロマノキシ基の存在が示唆された。また MS で  $m/e$  528 に分子イオンピークを示すことから、これらは methyl epoxy-

Table III

Yields and spectral data of methyl epoxy(pentamethylchromanoxy)octadecenoates.

	 Ia	 Ib	 Ic
Yield (%)	4.6	1.2	2.1
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (e)	283sh (2460) 289 (2770)	283sh (2270) 289 (2640)	283sh (2420) 289 (2700)
IR (CCl <sub>4</sub> ) cm <sup>-1</sup>	1745 (C=O) 970 ( <i>E</i> -olefin) 900 ( <i>trans</i> -epoxide)	1745 895	1745 970 895
MS <i>m/e</i>	528 (M <sup>+</sup> ) 428 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHO) 415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH-CH) 	528 428 415	528 428 415
<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) ppm			
H-9 and 10	5.58 (m, 2H)	5.53 (m, 2H)	5.52 (m, 2H)
H-11	4.40 (dd, 0.75H, <i>J</i> =8.3, 4.9 Hz) <sup>a)</sup> 3.87 (dd, 0.25H, <i>J</i> =5.8, 5.6 Hz) <sup>a)</sup>	4.25 (dd, 1H, <i>J</i> =8.7, 6.3 Hz)	3.81 (dd, 1H, <i>J</i> =6.4, 6.2 Hz)
H-12	2.93 (dd, 1H, <i>J</i> =4.9, 2.2 Hz)	3.05 (dd, 1H, <i>J</i> =6.3, 2.2 Hz)	3.04 (dd, 1H, <i>J</i> =6.2, 2.3 Hz)
H-13	2.69 (m, 1H)	2.80 (dt, 1H, <i>J</i> =5.6, 2.2 Hz)	2.79 (dt, 1H, <i>J</i> =5.7, 2.3 Hz)

R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-; R<sub>2</sub> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOCH<sub>3</sub>; RO = 2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxy. a) *Z/E*-olefin = 3:1.

(pentamethylchromanoxy)octadecenoate (I) と考えられた。また <sup>1</sup>H-NMR において δ 2.69~3.00 のエポキシドプロトンのシグナルが 2.2~2.3 Hz の結合定数を示すことから、これらの生成物がトランスエポキシドを含む<sup>49)</sup>ことが確認された。各生成物中のエポキシ環、二重結合、クロマノキシ基の位置は MS におけるフラグメンテーションパターンおよび <sup>1</sup>H-NM

Rにおけるデカップリング実験などによって決定した。また<sup>1</sup>H-NMRにおいてオレフィンプロトンは重複しており、結合定数の解析はできなかった。しかしIRにおいてE二重結合による $\delta$ CH(面外)が $970\text{ cm}^{-1}$ に観察できるか否かによりE-Z異性を決めることができた。すなわち分画I bはZ異性体、I cはE異性体であり、I aは $970\text{ cm}^{-1}$ の吸収を示すが、その強度が弱くE異性体とZ異性体との混合物であると考えられた。二重結合に隣接するメチンプロトン(クロマノキシ基の付け根)のシグナルはZ異性体(I b)とE異性体(I c)で、それぞれ $\delta$  4.25と3.81に分離して観察される。分画I aにおける相当シグナルは $\delta$  4.40と3.87に観察され、各ピーク面積の積分から分画I aはE/Z比が1:3の混合物であることが判明した。エポキシ型付加物I b、I cとI aとの違いは11位へのクロマノキシ基が付加するときの方向の違いによる。11位のクロマノキシ基と12位のエポキシ基とのコンホメーション(立体配座)は<sup>1</sup>H-NMRにおける結合定数の値<sup>50, 51)</sup>およびシリカゲルクロマトグラフィーにおける移動速度<sup>52-54)</sup>から、分画I aはエリスロ(erythro)異性体であり、分画I bとI cはスレオ(threo)異性体であると考えた。以上の結果よりI aは methyl trans-12,13-epoxy-erythro-11-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxy)-9-octadecenoate の(9E)異性体と(9Z)異性体の1:3の混合物、I bは methyl (9Z)-trans-12,13-epoxy-threo-11-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxy)-9-octadecenoate、I cは methyl (9E)-trans-12,13-epoxy-threo-11-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxy)-9-octadecenoateであることを明らかにした。

## ヒドロキシメトキシ型付加物

H P L C において18~33分で溶出する分画からエポキシ環を含まない付加物が単離された。これらの生成物は全て水酸基 (I R によって確認)、メトキシ基 ( $^1\text{H-NMR}$ )、クロマノキシ基 (U V) および二重結合 ( $^1\text{H-NMR}$ ) を含む脂肪酸誘導体であった (Table IV)。これらのメチルエステルは全てMS において  $m/e$  560 に分子イオンピークを示すことから、I のエポキシ環が溶媒のメタノールによって加溶媒分解を受けた化合物であると推定された。これらのトリメチルシリル (TMS) 化誘導体のMS が  $m/e$  173 [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OTMS})$ ] のフラグメントイオンピークを示すことから、これらは13位に水酸基が付いていることが判明した。I R における  $970\sim 980\text{cm}^{-1}$  の吸収および  $^1\text{H-NMR}$  におけるオレフィンプロトンの結合定数 (15.3~15.6 Hz) から全ての生成物がE-オレフィンであることが確認された。II a、III a、IV について  $^1\text{H-NMR}$  のデカップリング法および結合パターンの分析から各分子中の9位から13位のプロトンのシグナルを帰属することができた (Table IV)。すなわち II a は9-エン、III a は10-エンそしてIV は11-エン化合物であった。II a と III a は  $m/e$  415 [ $\text{M}^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ] にフラグメントイオンピークを示すので、12位にメトキシ基が付加したものであり、IV のTMS化誘導体は  $m/e$  243 [ $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OTMS})\text{CH}=\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ] のフラグメントイオンピークを示すので、10位にメトキシ基が付加している。これらの結果から II a は (9E)-13-hydroxy-12-methoxy-11-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxyl)-9-octadecenoic acid で、III a は (10E)-13-hydroxy-12-methoxy-9-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxyl)-10-octadecenoic acid で、IV は (11E)-13-

Table IV

Yields and spectral data of hydroxymethoxy(pentamethylchromanoxy)octadecenoic acids.

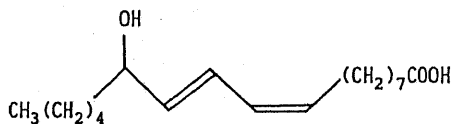
	IIa		IIb		IIIc		IIIa		IIIb		IIIc		IV	
Yield (%)	4.5	5.2	2.3	4.2	3.8	1.5	1.1	283sh (2300)	283sh (2350)	283sh (2310)	283sh (2350)	283sh (2300)	283sh (2300)	289 (2590)
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{COH}}$ nm ( $\epsilon$ )	282.5 (2630)	283sh (2340)	283sh (2480)	283sh (2340)	283sh (2310)	283sh (2350)	283sh (2300)	289 (2790)	289 (2670)	289 (2610)	289 (2700)	289 (2590)	3590	1715
IR (CCl <sub>4</sub> ) cm <sup>-1</sup>	1715 (C=O)	3550 (OH)	1715	3570	1715	3600	1715	970 ( <i>E</i> -olefin)	980	980	980	980	3590	1715
MS <i>m/e</i>	560 (M <sup>+</sup> )	560 (M <sup>+</sup> )	560	560	560	560	560	460	460	460	460	460	560	560
	460 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHO)	460 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHO)	460	460	460	460	460	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )	415 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHCH <sub>3</sub> )
H-NMR	173(CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CHOTMS)	173	173	173	173	173	173	5.22 (dt, 1H, J=15.3, 6.4 Hz)	5.22 (dt, 1H, J=15.5, 5.9 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)
	5.23 (dt, 1H, J=15.3, 6.4 Hz)	5.23 (dt, 1H, J=15.5, 5.9 Hz)	5.16 (dt, 1H, J=15.5, 3.2 Hz)	4.17 (dt, 1H, J=8.3, 5.5 Hz)	4.19 (dt, 1H, J=8.8, 5.8 Hz)	4.18 (dt, 1H, J=8.7, 7.7 Hz)	4.18 (dt, 1H, J=8.7, 7.7 Hz)	4.17 (dt, 1H, J=8.3, 5.5 Hz)	4.17 (dt, 1H, J=8.3, 5.5 Hz)	4.19 (dt, 1H, J=8.8, 5.8 Hz)	4.19 (dt, 1H, J=8.8, 5.8 Hz)	4.18 (dt, 1H, J=8.7, 7.7 Hz)	4.18 (dt, 1H, J=8.7, 7.7 Hz)	4.18 (dt, 1H, J=8.7, 7.7 Hz)
(CDCl <sub>3</sub> ) ppm	5.45 (dd, 1H, J=15.3, 9.2 Hz)	5.61 (dd, 1H, J=15.5, 9.4 Hz)	5.60 (dd, 1H, J=15.5, 9.5 Hz)	5.68 (dd, 1H, J=15.5, 8.3 Hz)	5.65 (dd, 1H, J=15.5, 8.8 Hz)	5.70 (dd, 1H, J=15.4, 8.7 Hz)	5.70 (dd, 1H, J=15.4, 8.7 Hz)	5.61 (dd, 1H, J=15.5, 9.4 Hz)	5.68 (dd, 1H, J=15.5, 8.3 Hz)	5.65 (dd, 1H, J=15.5, 8.8 Hz)	5.70 (dd, 1H, J=15.4, 8.7 Hz)	5.70 (dd, 1H, J=15.4, 8.7 Hz)	5.61 (dd, 1H, J=15.5, 9.4 Hz)	5.68 (dd, 1H, J=15.5, 8.3 Hz)
	4.32 (dd, 1H, J=9.2, 6.7 Hz)	4.31 (dd, 1H, J=9.4, 3.9 Hz)	4.19 (dd, 1H, J=9.5, 3.2 Hz)	5.26 (dd, 1H, J=15.5, 8.0 Hz)	5.26 (dd, 1H, J=15.5, 8.4 Hz)	5.17 (dd, 1H, J=15.4, 7.7 Hz)	5.17 (dd, 1H, J=15.4, 7.7 Hz)	4.31 (dd, 1H, J=9.4, 3.9 Hz)	5.26 (dd, 1H, J=15.5, 8.0 Hz)	5.26 (dd, 1H, J=15.5, 8.4 Hz)	5.17 (dd, 1H, J=15.4, 7.7 Hz)	5.17 (dd, 1H, J=15.4, 7.7 Hz)	4.31 (dd, 1H, J=9.4, 3.9 Hz)	5.26 (dd, 1H, J=15.5, 8.3 Hz)
H-11	3.30 (dd, 1H, J=6.7, 1.7 Hz)	3.45 (dd, 1H, J=6.9, 3.9 Hz)	3.45 (dd, 1H, J=6.9, 3.9 Hz)	3.36 (dd, 1H, J=8.0, 4.2 Hz)	3.39 (dd, 1H, J=8.4, 3.6 Hz)	3.28 (dd, 1H, J=7.7, 5.4 Hz)	3.28 (dd, 1H, J=7.7, 5.4 Hz)	3.45 (dd, 1H, J=6.9, 3.9 Hz)	3.45 (dd, 1H, J=6.9, 3.9 Hz)	3.36 (dd, 1H, J=8.0, 4.2 Hz)	3.39 (dd, 1H, J=8.4, 3.6 Hz)	3.28 (dd, 1H, J=7.7, 5.4 Hz)	3.28 (dd, 1H, J=7.7, 5.4 Hz)	3.28 (dd, 1H, J=7.7, 5.4 Hz)
	3.74 (m, 1H)	3.70 (m, 1H)	3.68 (overlapped with OCH <sub>3</sub> signal, 1H)	3.42 (m, 1H)	3.60 (m, 1H)	3.32 (m, 1H)	3.32 (m, 1H)	3.70 (m, 1H)	3.68 (overlapped with OCH <sub>3</sub> signal, 1H)	3.42 (m, 1H)	3.60 (m, 1H)	3.32 (m, 1H)	3.32 (m, 1H)	3.32 (m, 1H)
H-12	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)
	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)
H-13	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)
	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)
CH <sub>3</sub> O	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)
	3.66 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.59 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	2.92 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)	3.22 (s, 3H)

R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; R<sub>2</sub>=-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOH; RO=2, 2', 5', 7, 8-pentamethylchromanoxy.

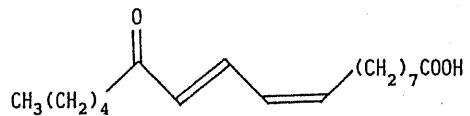
hydroxy-10-methoxy-9-(2,2,5,7,8-pentamethylchromanoxyl)-11-octadecenoic acidと決定された。さらに II a および III a には立体異性体と考えられる化合物がそれぞれ 2 種類ずつ得られたが、スペクトルデータのみからではその立体化学的帰属はできなかった。

### 他の生成物

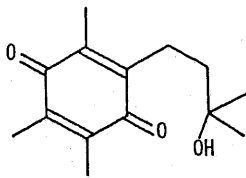
付加体以外の生成物としては、従来から知られているリノール酸のヒドロキシ体 (V)、オキソ体 (VI) およびビタミン E モデル化合物のパラキノン型の化合物 (VII) が得られた。またクロマノールの 5 位のメチル基の水素がメトキシ基に置換された化合物 (VIII) も得られた (Fig. 26)。



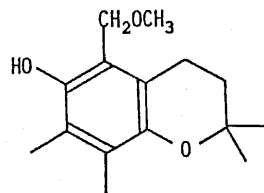
V



VI



VII



VIII

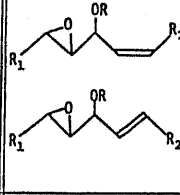
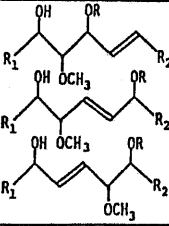
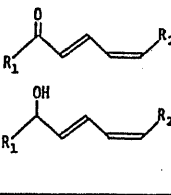
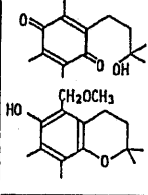
Fig. 26. Structures of products other than adducts products of Z,E-13-LOOH and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol.

### 第 3 節 捕捉反応への気相の影響

ビタミン E モデル化合物によるラジカル捕捉反応に対する酸素の影響を調べるため空気中における反応を行い、酸素の有無における生成物の種類および収率の相違を調べた。Table V に示すように生成物の種類については、いずれの条件下においても同様であった。収率はリノール酸ヒドロペルオキシドとビタミン E モデル化合物との付加物 (I) ~ (IV) およびヒドロペルオキシド由来生成物 (V)、(VI) に関しては使用したヒドロペルオキシド量から算出し、ビタミン E モデル化合物由来生成物 (VII)、(VIII) は使用したビタミン E モデル化合物量から算出した。アルゴン気流下の反応では付加物の収率はエポキシ型 (I) と開裂型 (II) ~ (IV) の両者を合計すると約 30% であった。酸素の存在下でも付加物の収率や生成物の種類についてはアルゴン中での反応と大きな差異は認められなかった。

Table V

Yields of reaction products of Z,E-13-LOOH and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol under argon or air.

atmosphere	product			
	(I)	(II)~(IV)	(V), (VI)	(VII), (VIII)
				
argon	7.9 %	22.6 %	10.3 %	9.1 %
air	5.7 %	20.2 %	5.8 %	19.6 %

$R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-$ ;  $R_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ;  $\text{RO} = 2,2,5,7,8\text{-pentamethylchromanoxy}$ .

第 4 節 考察

Fe(II)存在下、リノール酸ヒドロペルオキシドとビタミンEモデル化合物を混合すると、epoxy(pentamethylchromanoxy)-およびhydroxymethoxy(pentamethylchromanoxy)octadecenoic acidsのような付加物などが得られた。これらの付加物の生成機構をFig. 27のように考えた。まずヒドロペルオキシドとFe(II)とが反応してアルコキシラジカルを生成する。このアルコキシラジカルは隣接する二重結合に閉環してZ-トランス-エポキシアリルラジカルになり、このラジカルはE-トランス-エポキシアリルラジカルと平衡にあると考えられる。これらのラジカルにビタミンEモデル化合物からの水素引き抜き反応で生ずるクロマノキシラジカル(R<sub>3</sub>O・)が付加してエポキシ型付加体(I)が生成する。但しクロマノキシ基の付加する方

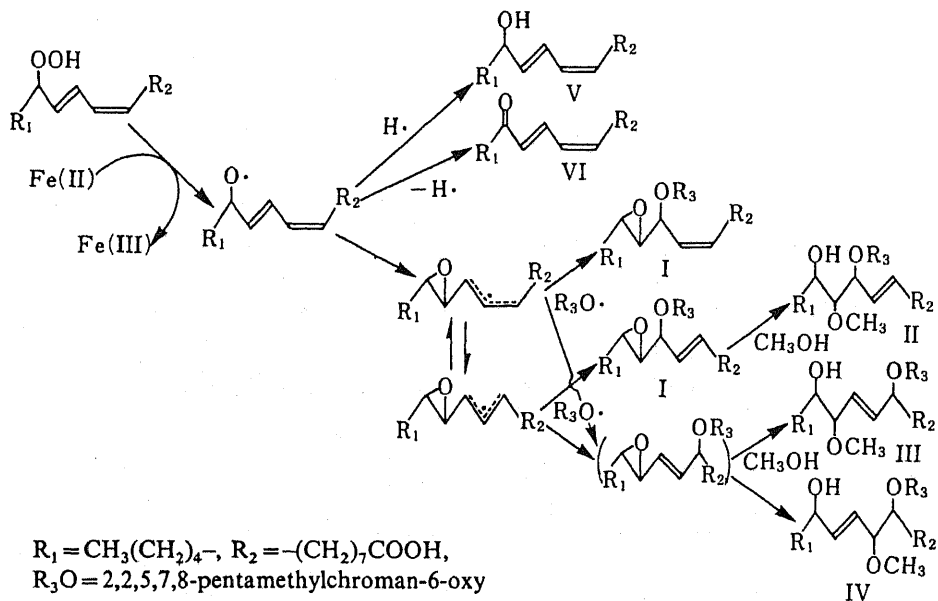


Fig. 27. Possible reaction pathways for the formation of the reaction products.

向によってエリスロ体とスレオ体の両立体異性体が生成し得る (Fig. 28)。これらはさらにメタノールによる加溶媒分解を受けるとヒドロキシメトキシ型付加体 (II) ~ (IV) に変化する。エポキシアリルラジカルの9位にクロマノキシラジカルが付加すると括弧内に示した付加物が生成するが、反応混合物中からは単離されなかった。しかしこの付加物のエポキシ環が開裂したと考えられる生成物 (III)、(IV) が得られたことから反応系に一時的には生成していると考えられる。

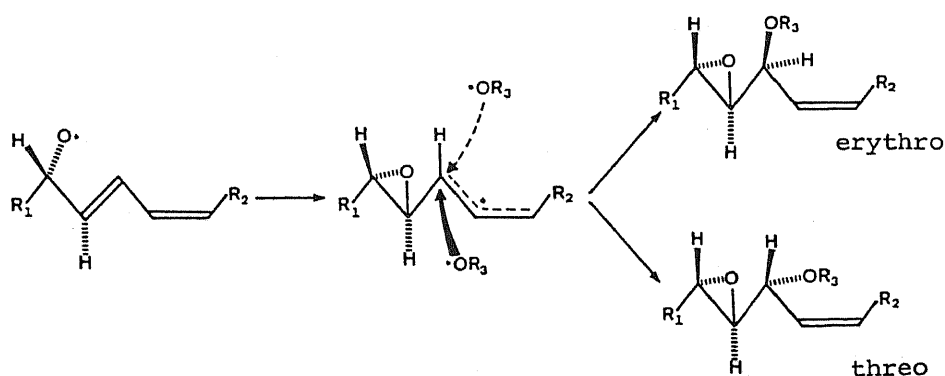


Fig. 28. Pathway proposed for introduction of chiral center into adduct (I).

Gardner らは Fe(III) 存在下、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (異性体の混合物) とビタミン E モデル化合物との反応から  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを基にしてシス-およびトランス-エポキシドを得たと報告している<sup>25)</sup>。本実験で著者はトランス-エポキシドのみを得た。この差異の理由は明らかではないが、Fig. 29 に示すようにトランス-エポキシドはシス-エポキシドより安定なコンホメーションのアルコキシラジカルを経て形成すると考えられるので、トランス-エポキシドの生成が優先したのではないかと考えた。

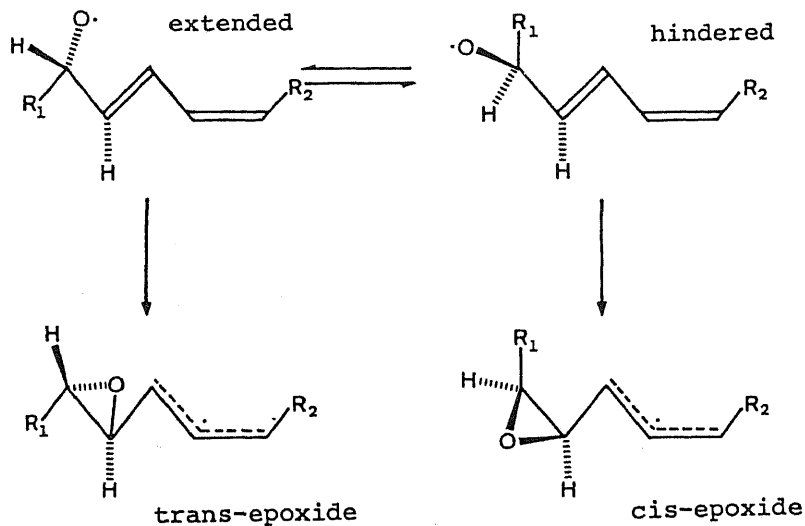


Fig. 29. Pathway suggested to cis- or trans-epoxy adducts through either the hindered or extended conformers of the alkoxy radical.

リノール酸のヒドロキシ体およびオキシ体はアルコキシラジカルの水素引き抜きにより生成し、パラキノン体やメトキシクロマノールの生成は水酸イオンやメトキシイオンとの反応から生ずると考えられる。

Z,E-13-LOOH とビタミンEモデル化合物との反応からの生成物は分子状酸素の有無によって変わらなかった。この結果はクロマノキシラジカルによる反応は分子状酸素によって影響を受けないことを示唆している。この知見はビタミンEラジカルおよびそのモデルラジカルが分子状酸素と反応しないというESRの観察<sup>55)</sup>とも一致する。

ビタミンEとともに生体内ラジカル捕捉剤として知られているシステインなどのチオール化合物は酸素の有無により反応経路に大きな影響を受ける<sup>56)</sup>。すなわちFe(III)の存在下、リノ

ール酸ヒドロペルオキシドとシステインを混合すると、嫌気的条件下では(IV)に相当する化合物が得られるが、空気中ではリノール酸ヒドロペルオキシド由来のアルコキシルラジカルはシステインには捕捉されなかった。これらの結果はビタミンEとチオール化合物とのラジカル捕捉反応に差異があることを示している。チオール化合物は酸素存在下ではその効力を減ずるのに対して、ビタミンEは酸素の有無にかかわらずラジカル捕捉性を発揮し得ることが判明した。

### 第3章 リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒド のヒト二倍体線維芽細胞に対する毒性

既に述べたように過酸化脂質は生体に対して有害な作用を及ぼすと考えられており、種々の疾患の危険因子として注目されている<sup>44)</sup>。しかし過酸化脂質と呼ばれている物質は多種類の化合物を総称している場合が多い。過酸化脂質の毒性が脂質過酸化反応の一次産物であるヒドロペルオキシドによるのか、またはヒドロペルオキシドがさらに酸化分解された二次産物によるのかに関する報告は、関心が高い割には少ない。過酸化脂質に関する毒性化合物の解明は病理学的にも栄養学的にも重要であると考えられる。

過酸化脂質関連化合物のうち生体に対して毒性が報告されている化合物としては、ヒドロペルオキシド<sup>57, 58)</sup>、二量体<sup>59)</sup>、アルデヒド<sup>60, 61)</sup>、ヒドロペルオキシアルケナール（不飽和アルデヒド）<sup>62)</sup> およびヒドロペルオキシエポキシド<sup>63)</sup> などがある。

上述の報告を含め、ヒドロペルオキシドなどの毒性は、経口などの方法で動物に投与して検討されることが多かった。しかし投与化合物が毒性を示したとしても動物を用いた実験では、代謝や分解などの生理的機能が関与する可能性があるため、毒性化合物を断定することが難しくなることも考えられる。

著者は生体モデルとして単純化された培養細胞を用いてリノール酸ヒドロペルオキシドおよびその関連アルデヒドの毒性を定量的に調べる方法を検討した。種々の疾患との関連から、使用する細胞の動物種はヒト細胞が好ましい。そこで培養ヒト細胞のうち、取り扱いの容易な線(織)維芽細胞を用いて実験を試

みた。線維芽細胞とは動物の体内のほとんどすべての組織中に分散して存在する中胚葉由来の細胞で、一般に培養下では紡錘形をしている。体内では臓器の形態形成に重要な役割を果たす細胞である。本実験には著者の所属する東京都老人研究所で樹立されたヒト胎児肺由来線維芽細胞（TIG-1）<sup>64</sup>）を使用した。

第1節 トリパンプルー排除能および乳酸脱水素酵素活性を用いる細胞生存率の算定

試験化合物の細胞毒性の定量的指標として細胞の生存率を用いた。エタノールのみを添加した対照実験における生存細胞数に対する試験化合物の添加実験における生存細胞数の比率を相対的生存率とした。試験化合物をウシ胎児血清（FBS）含有イーグル基本培地（BME）に加え細胞を1日培養した後、生存細胞数を計数した。細胞の生存率はディッシュの底に付着した細胞に対するトリパンプルー排除試験<sup>65)</sup> および乳酸脱水素酵素（LDH）活性測定<sup>66)</sup> を併用した。Fig. 30 に示すよう

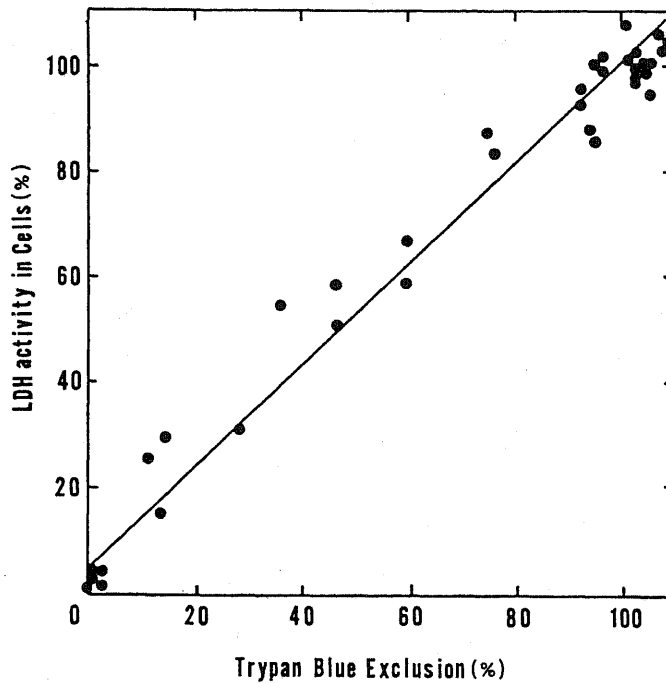


Fig. 30. Correlation between trypan blue exclusion and LDH activity in cells.

に細胞のトリパンプルー排除率と細胞内LDH活性率とは良い相関を示した。相関はサンプル数39で  $y = 0.95x + 5.62$  であり、相関係数(r)は0.99であった。この結果より細胞の生存率はどちらの方法でも計測できることが判明した。

## 第2節 リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化で生成するアルデヒドの同定

リノール酸は過酸化を受けて種々のアルデヒドを生成することが知られている。そこでリノール酸ヒドロペルオキシドを自動酸化して、実際に生成するアルデヒドを検討した。反応混合物を2,4-dinitrophenylhydrazineで処理してカルボニル化合物を黄色のヒドラゾン誘導体にし、HPLCで分析した。自動酸化は酸素気流下または5%CO<sub>2</sub>-95%空気中の二種類の方法で行ったが、反応混合物中のヒドラゾン誘導体の種類はいずれの場合も大差なかった。Fig. 31に、5%CO<sub>2</sub>-95%空気中

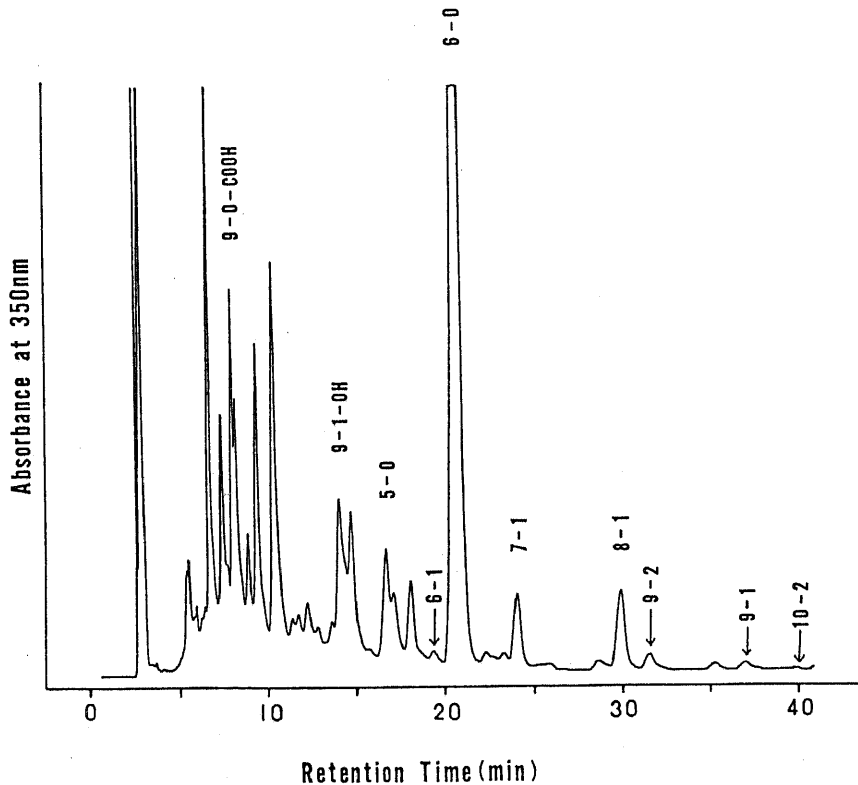


Fig. 31. A high performance liquid chromatogram of the 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds from the autoxidation of Z,E-13-LOOH for 3 days in a 5% CO<sub>2</sub> - 95% air atmosphere. Abbreviations are shown in Table VI.

で3日間自動酸化したときのカルボニル化合物のヒドラゾン誘導体のHPLCを示した。リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化からは30本以上のカルボニル化合物によるピークが確認された。それらのピークをHPLCを用いて分離を試み、pentanal、hexanal、(E)-2-hexenal、(E)-2-heptenal、(E)-2-octenal、(E)-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienal、(E,E)-2,4-decadienal、(E)-4-hydroxyl-2-nonenal、9-oxononanoic acidの10種類のアルデヒドの生成が確認された。構造は標品とのHPLCにおける保持時間の比較およびMSによって同定した。各アルデヒドの構造はTable VIに示す。Table中の略号の左側の数字はアルデヒドの炭素鎖の長さを、右側の数字は二重結合

Table VI

Structures of aldehydes from the autoxidation of Z,E-13-LOOH.

Aldehyde	Abbreviation	Structure
Pentanal	5-0	
Hexanal	6-0	
Hexenal	6-1	
Heptenal	7-1	
Octenal	8-1	
Nonenal	9-1	
Nonadienal	9-2	
Decadienal	10-2	
9-Oxononanoic acid	9-0-COOH	
4-Hydroxynonenal	9-1-OH	

の数を表している。例えば 6-1は炭素数6個で二重結合を1個含むhexenalを表す。分子内の二重結合は全てE（トランス）であり、アルデヒドのカルボニル基と共役した位置にある。9-oxononanoic acidと(E)-4-hydroxy-2-nonenal はリノール酸ヒドロペルオキシドの9、10位間の二重結合の酸化開裂によって生成すると考えられる化合物である。飽和アルデヒド（アルカナル）が3種類、二重結合を1個含む $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド（アルケナル）が5種類、二重結合を2個含む $\alpha$ 、 $\beta$ ： $\gamma$ 、 $\delta$ -不飽和アルデヒド（アルカジエナル）が2種類の合計10種類である。

### 第3節 リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシド、リノール酸ヒドロキシドおよびリノール酸ヒドロペルオキシド自動酸化混合物の細胞毒性

ヒト二倍体線維芽細胞をプラスチックディッシュに播種して、10%ウシ胎児血清(FBS)添加イーグル基本培地(BME)を用いて、CO<sub>2</sub>培養器中37°Cで培養した。まず、リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシド(Z,E-13-LOOH)、リノール酸ヒドロキシド(Z,E-13-LOH)およびリノール酸ヒドロペルオキシド自動酸化混合物(5%CO<sub>2</sub>-95%空气中で反応した混合物)を増殖中の線維芽細胞に5~50μMで添加して1日培養して増殖阻害を調べた(Fig. 32)。細胞へのリノール酸ヒ

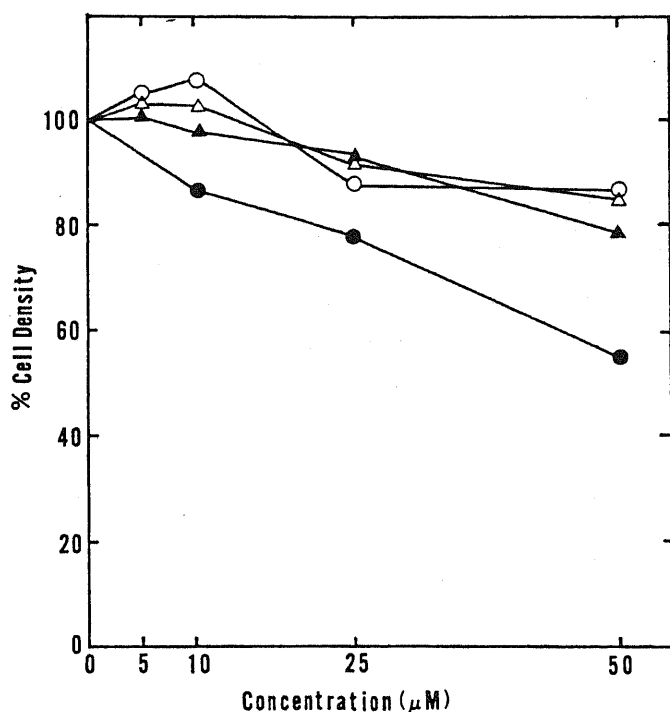


Fig. 32. Lethal effects of linoleic acid (O), its hydroperoxide (▲), its alcohol (Δ) and a reaction mixture (●) from the autoxidation of the hydroperoxide on human diploid fibroblasts in logarithmic growth phase.

ドロペルオキシドの影響はリノール酸およびリノール酸ヒドロキシドによるものと差異は認められなかった。しかしドロペルオキシドの自動酸化混合物はドロペルオキシド自身よりも明らかに強い毒性を示した。この結果は、本実験条件下ではリノール酸ヒドロペルオキシド自身は、脂肪酸の表面活性剤としての毒性<sup>6,7)</sup>しか持たないことを示している。しかしドロペルオキシドがさらに酸化を受けた物質（脂質過酸化反応の二次産物に相当）中には強い毒性を持つ化合物が含まれていることを示している。ただし血清濃度を0.1%に低下させて実験を行うとリノール酸ヒドロペルオキシドは毒性を示した。

第4節 リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化から生成するアルデヒドの細胞毒性

リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化において生成が確認されたアルデヒドを増殖期の線維芽細胞に投与して1日培養し、その影響を調べた (Fig. 33)。pentanal(5-0)、hexanal(6-0)、9-oxononanoic acid(9-0-COOH)のような飽和アルデヒドは全く毒性を示さなかった。二重結合を1個含むアルケナールは50  $\mu$ Mになると明確な阻害効果を示した。その効果は(E)-2-hexenal(6-1)から(E)-2-nonenal(9-1)へと炭素鎖が長く

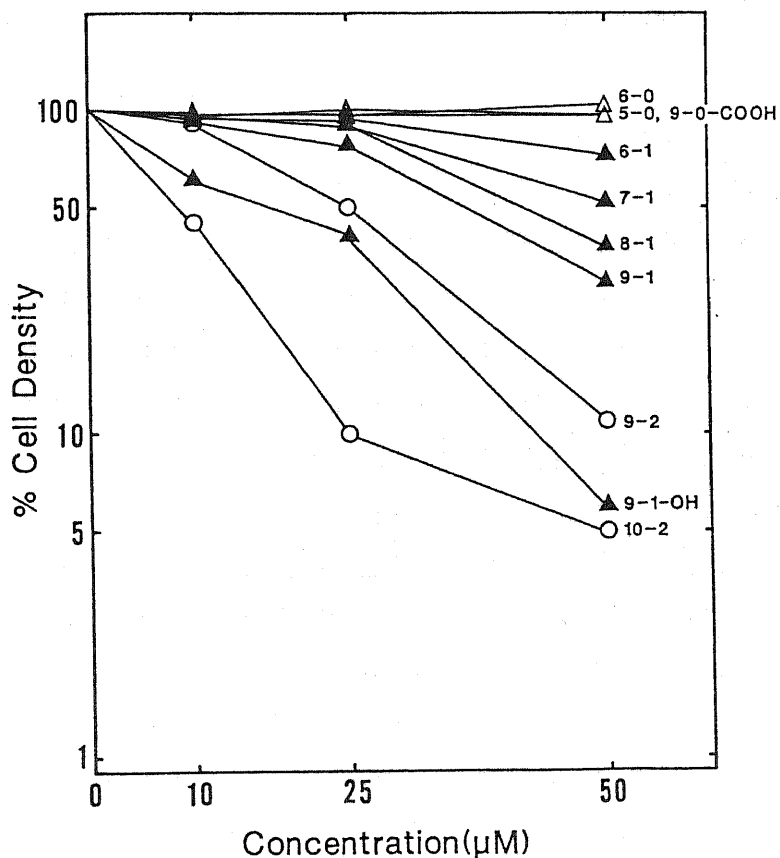


Fig. 33. Lethal effects of the aldehydes from the autoxidation of Z,E-13-LOOH on human diploid fibroblasts in logarithmic growth phase.

なるに従って強くなる傾向を示した。nonenal の 4 位にヒドロキシ基が付いた (E)-4-hydroxy-2-nonenal (9-1-0H) および分子内に二重結合を 2 個含む (E,E)-2,4-nonadienal (9-2) や (E,E)-2,4-decadienal (10-2) のようなアルカジエナールはさらに強い毒性を示した。例えば、(E,E)-2,4-nonadienal、(E,E)-2,4-

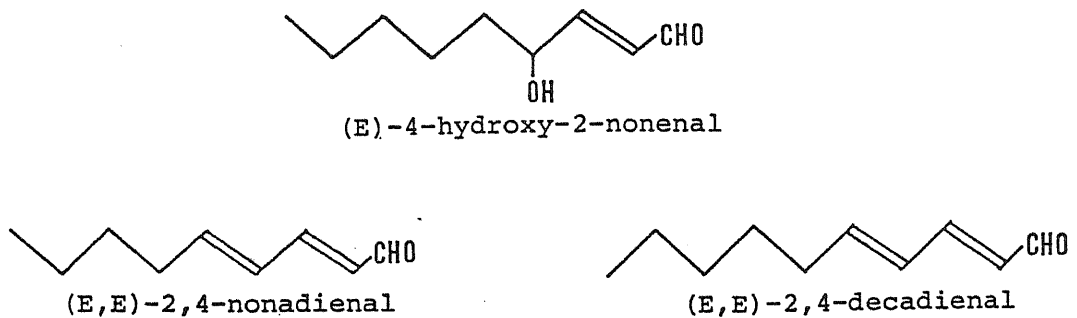


Fig. 34. Structures of toxic aldehydes toward human diploid fibroblasts.

decadienal または (E)-4-hydroxy-2-nonenal を  $25 \mu\text{M}$  投与して 1 日培養すると、生存細胞数はそれぞれ約 50、10 または 40% に減少した。さらに (E,E)-2,4-decadienal や (E)-4-hydroxy-2-nonenal を  $50 \mu\text{M}$  投与すると大部分の細胞が死滅した。特に (E,E)-2,4-decadienal は今回検討したアルデヒドのなかでもっとも強い毒性を示し、 $10 \mu\text{M}$  においても 50% 以上の細胞が死亡した。

アルデヒドを添加した時の細胞の形態を Fig. 35 に示した。(A) はエタノールのみを 0.1% 濃度で 10% FBS 添加 BME に加えて 1 日培養した対照実験もので、全く影響は認められない。(E)-4-hydroxy-2-nonenal を  $25 \mu\text{M}$  投与した (B) では、大半の細胞が死亡して丸くなり、生き残った細胞も線維芽細胞特有の突起が短くなり、空胞が多数観察されるなどかなり損傷を受けていることを示している。

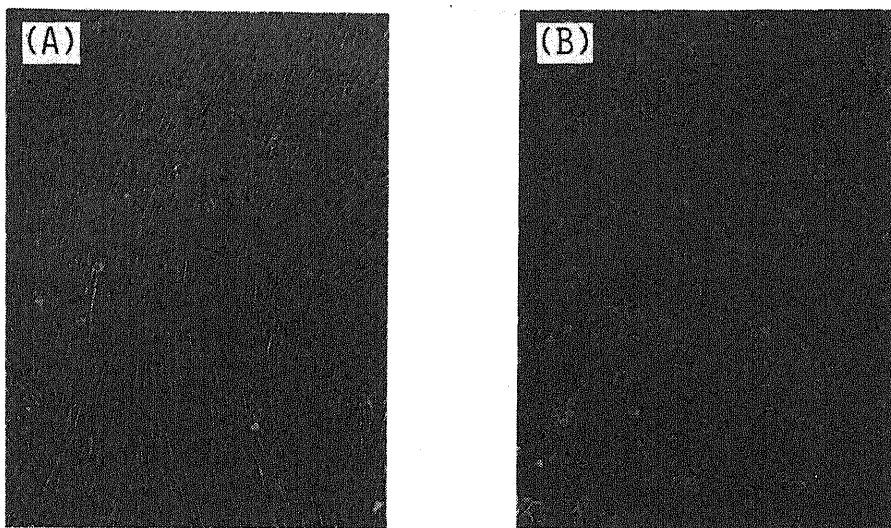


Fig. 35. Cytomorphological changes in human diploid fibroblasts induced by incubation with ethanol (A) and 25  $\mu$ M (E)-4-hydroxy-2-nonenal (B) for 1 day at 37 °C.

ウシ胎児血清 (FBS) をほとんど除いた 0.1 % FBS 添加 BME 中で培養すると、細胞は増殖はしないが代謝は維持した状態にとどまっている。この状態の細胞にアルデヒドを添加して、その毒性を調べた (Fig. 36)。 (E,E)-2,4-nonadienal (9-2)、 (E,E)-2,4-nonadienal (10-2) または (E)-4-hydroxy-2-nonenal (9-1-0H) を 25  $\mu$ M 投与して 1 日培養するとそれぞれ約 75、90 またはほとんど 100 % の細胞が死亡した。 (E)-2-octenal (8-1) および (E)-2-nonenal (9-1) も若干の毒性を示した。しかし (E)-2-hexenal (6-1) や (E)-2-heptenal (7-1) および飽和アルデヒドは全く影響を示さなかった。

アルデヒド化合物はある種の生体成分と反応することが知られている<sup>68)</sup>。もしアルデヒドが培地中の成分と反応を起こして急速に消費されると、それらの毒性は実際よりも低く評価さ

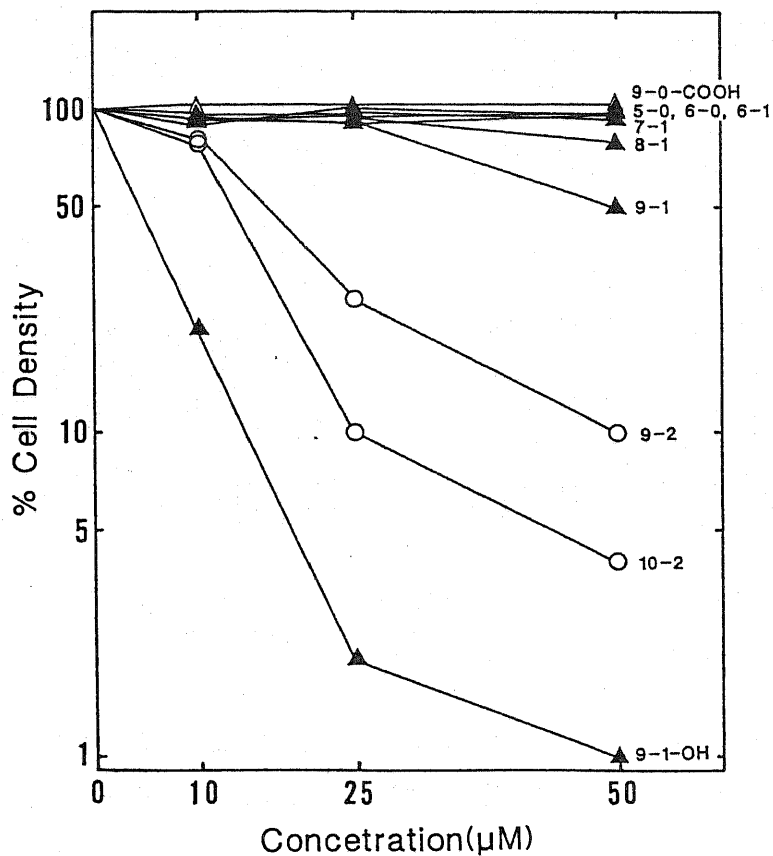


Fig. 36. Lethal effects of the aldehydes from the autoxidation of Z,E-13-LOOH on human diploid fibroblasts under growth arrested conditions.

れる恐れがある。この可能性を確かめるため、(E)-4-hydroxy-2-nonenal および (E,E)-2,4-decadienal について培地中における濃度変化および細胞の生存率を経時的に調べた (Fig. 37)。細胞を含まない系では、(E)-4-hydroxy-2-nonenal は 0.1 % FBS 添加 BME 中 (□) では徐々に減少するだけであったが、10 % FBS 添加中 (■) では急速に減少した (2 時間で約 40 % に減少)。この減少速度の違いは細胞が存在する場合に

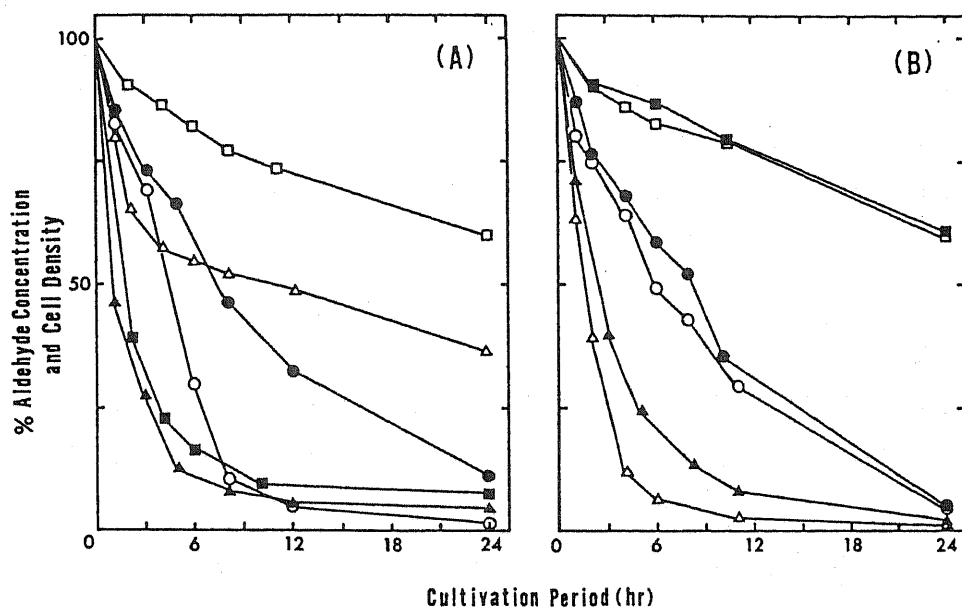


Fig. 37. Time courses for the decrease in (E)-4-hydroxy-2-nonenal (A) and (E,E)-2,4-decadienal (B) and for cell density.

も同様に認められた (0.1 % FBS 添加 BME、 $\Delta$  ; 10 % FBS 添加 BME、 $\blacktriangle$ )。細胞は 10 % FBS 添加 BME 中 ( $\bullet$ ) よりも 0.1 % FBS 添加 BME 中 ( $\circ$ ) の方がより強く損傷を受けた。他方 (E,E)-2,4-decadienal は細胞を含まない場合、0.1 % ( $\square$ ) および 10 % FBS 添加 ( $\blacksquare$ ) のいずれの培地においても減少は同様で遅かった。しかし細胞を含む系ではいずれの培地中 (0.1 % FBS、 $\Delta$  ; 10 % FBS、 $\blacktriangle$ ) でも、アルデヒドは急速に減少した。細胞の減少は 0.1 % ( $\circ$ ) および 10 % FBS 添加 ( $\bullet$ ) のいずれの培地でも同様の減少を示し、差異は認められなかった。

## 第 5 節 考察

10% ウシ胎児血清含有培地中におけるヒト二倍体線維芽細胞に対する実験では、リノール酸ヒドロペルオキシドはリノール酸自身と同様の毒性しか示さなかった。これらの毒性は脂肪酸の表面活性剤としての作用<sup>68)</sup>によるものと思われた。しかしリノール酸ヒドロペルオキシドを自動酸化した混合物はリノール酸ヒドロペルオキシドよりも強い毒性を示した。この結果は脂質過酸化反応の二次産物中に毒性化合物が生成していることを示唆した。ただしリノール酸ヒドロペルオキシドは血清0.1%添加培地中では強い毒性を示したので、化合物自身としては毒性を持つが、血清中の成分と反応を起こして減少してしまうと考えられた。

二次産物のうちアルデヒドについてヒト線維芽細胞に対する毒性を調べ、(E,E)-2,4-decadienalおよび(E)-4-hydroxy-2-nonenalが強い毒性を持つことを明らかにした。(E,E)-2,4-decadienalは増殖中と停止中との両条件とも同様に強い毒性を示した。しかし(E)-4-hydroxy-2-nonenalは増殖中よりも停止中の方が毒性が強かった。Scaifeは類似の4-hydroxy-2-pentenalが増殖停止中の細胞に対するよりも増殖中の細胞に対し、より強い毒性を示すと報告している<sup>69)</sup>。この報告と著者の結果とは一致しないように見える。しかし使用したアルデヒド、細胞および培地などの培養条件が異なるので厳密に比較することは難しい。特に試験化合物の安定性が毒性の発現に重大な影響を及ぼすと考えられる。(E)-4-hydroxy-2-nonenalおよび(E,E)-2,4-decadienalの培地中における濃度の経時変化を調べると、化合物の種類によって濃度変化がかなり異なることが判明した。(E)-4-hydroxy-2-nonenalはリノール酸ヒドロペルオ

キシドと同様に培地中の成分、特に F B S 中の成分と強い相互作用を持つために、F B S が存在すると減少が促進される。これは細胞の有無にかかわらず、アルデヒドの減少パターンが類似していることから支持される。その結果、細胞の生存率に関しては、予想通り 10% F B S 添加 B M E 中よりも 0.1% F B S 添加 B M E 中の方がより強い傷害を受けた。すなわち高濃度の F B S が存在すると (E)-4-hydroxy-2-nonenal は F B S 成分と反応を起こして減少し、(E)-4-hydroxy-2-nonenal の毒性が結果的には弱まることが判明した。

脂質過酸化反応の二次産物中にヒト線維芽細胞に対して毒性を示す化合物（不飽和アルデヒド）が生成することが明らかになった。アルデヒドの毒性は分子中の二重結合が数が増すと強まり、ヒドロキシ基が付加すると一層強まった。また同族化合物間では、炭素鎖が長くなると毒性が強くなる傾向を示した（hexenal→nonenal、nonadienal→decadienal）。今回検討した不飽和アルデヒドの毒性の強さは以下のような順序であった。  
hexenal < heptenal < nonenal < nonadienal < decadienal ≤ hydroxynonenal。

Schauensteinらによれば、不飽和アルデヒド（アルケナール）はチオール化合物と Michael 型付加反応を起こし、生理的 pH においても、低濃度ですばやく反応するが、飽和アルデヒドはチオール化合物に対して反応性が弱いと報告している<sup>67)</sup>。特に 4-ヒドロキシアルケナールはチオール化合物と急速に反応し、他のアルケナールから形成される付加物よりも安定な付加物を形成する<sup>70, 71)</sup>。今回示されたアルデヒドの線維芽細胞に対する毒性も、それらのチオール化合物に対する反応が原因になるとも考えられる。

#### 第4章 リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト臍帯静脈内皮細胞に対する毒性

ヒト大動脈において、動脈硬化の進行の具合と動脈壁中の過酸化脂質含量との間には強い相関があるとの報告がある<sup>72)</sup>。動脈硬化の発症過程は、まず内皮細胞が損傷を受け、その部位への血小板の凝集、付着が起こる。次いで中膜平滑筋細胞が内皮部位に移動して、そこで増殖を開始する。そして泡沫細胞が出現し、最終的には動脈硬化巣が形成されると考えられている。しかしその生化学的な基礎は必ずしも明確ではなく、特に発症の引金となる内皮の損傷を起こす化学的要因については長らく不明であった。

内皮の損傷部位への血小板の凝集や付着を抑制する物質としてプロスタサイクリンが知られているが、この物質の生合成は過酸化脂質によって阻害される<sup>73-76)</sup>。また平滑筋細胞によるLDLの取り込みならびにアポ蛋白の分解を過酸化脂質が促進することも報告されている<sup>77)</sup>。LDLはコレステロールを含むので、多量に取り込まれれば当然泡沫細胞の形成が起こる。泡沫細胞はマクロファージからも形成され<sup>78、79)</sup>、過酸化脂質によって変性したLDLは著しくマクロファージに取り込まれやすくなることも報告されている<sup>80)</sup>。このように過酸化脂質は動脈硬化の発症における多くの段階に促進的に関与すると考えられている。

リノール酸ヒドロペルオキシドをラットやウサギに投与すると血管壁を覆う内皮細胞が損傷を受けることが既に報告されている<sup>28、81、82)</sup>。培養ヒト臍帯内皮細胞にリノール酸ヒドロペルオキシドを投与して電顕で調べると、1  $\mu$ M投与では微小織

維、微小管、ピノソーム（飲作用胞）などの細胞内小器官が増加し、5  $\mu$ M 投与ではそれら小器官は減少しミトコンドリアの電子密度が著しく低下することが観察された<sup>2)</sup>。これらの知見は不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドおよび関連化合物が動脈硬化の危険因子となり得ることを示唆している<sup>83)</sup>。

著者は不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドおよびその酸化から生成するアルデヒドについて、血管内皮細胞に対する毒性、特に損傷（すなわち致死）に興味を持った。使用する培養細胞としてヒト血管内皮細胞を臍帯静脈より酵素法により単離した。血管内皮細胞の確認は血液凝固第Ⅷ因子抗原への蛍光抗体法を用いて行った（Fig. 38）。ヒト血管内皮細胞は最近まで長期の継代培養が難しかった<sup>84)</sup>が、ウシ胎児血清（FBS）、内皮細胞増殖因子（ECGF）、上皮細胞増殖因子（EGF）およびヘパリンを含有するMCDB-104培地（以降MCDB系培地と略称）を使用することにより、継代培養を可能にし、大量かつ均一な内皮細胞を実験に利用できるようになった。

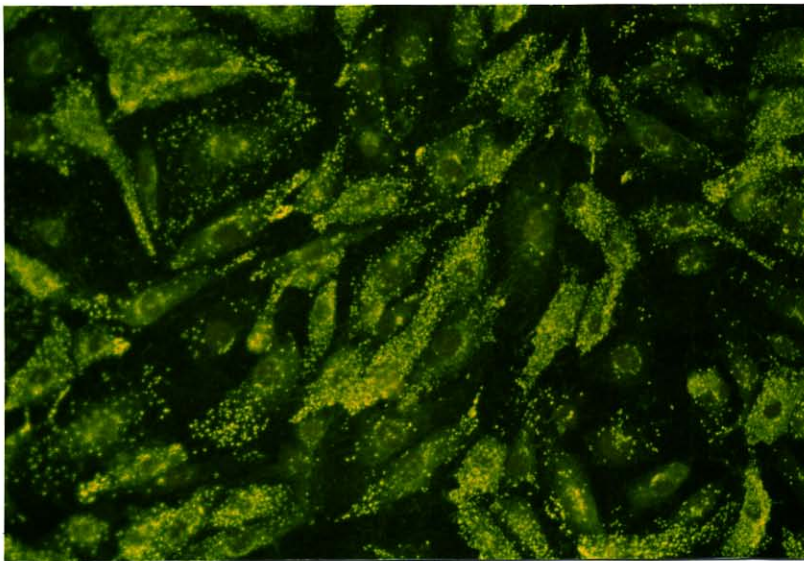


Fig. 38. Fluorescence of fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled antibody against factor VIII-related antigen.

## 第1節 アール液中におけるヒト血管内皮細胞の培養

ヒト血管内皮細胞はウシ胎児血清、増殖因子、ヘパリン、アミノ酸、ビタミンなどの多数の成分を添加した培地でないと培養できない。しかしこれらの成分のなかにはリノール酸ヒドロペルオキシドと反応し得るものがある。従って、リノール酸ヒドロペルオキシドや関連アルデヒドをこのような培地中で培養した細胞に投与して細胞毒性を調べる場合、信頼度の高い評価が困難となる可能性がある。

著者はヒト血管内皮細胞をアール液（有機化合物としてはグルコースのみを含有するCO<sub>2</sub>培養器用緩衝液<sup>85)</sup>）を用いることによって、培地成分による妨害を排除した実験系を考案した。アール液中では細胞は増殖を停止しており、徐々に細胞数を減じた。経時的に生存細胞数をトリパンプルー排除能により計測すると、5時間の培養では80%以上の細胞が生存してい

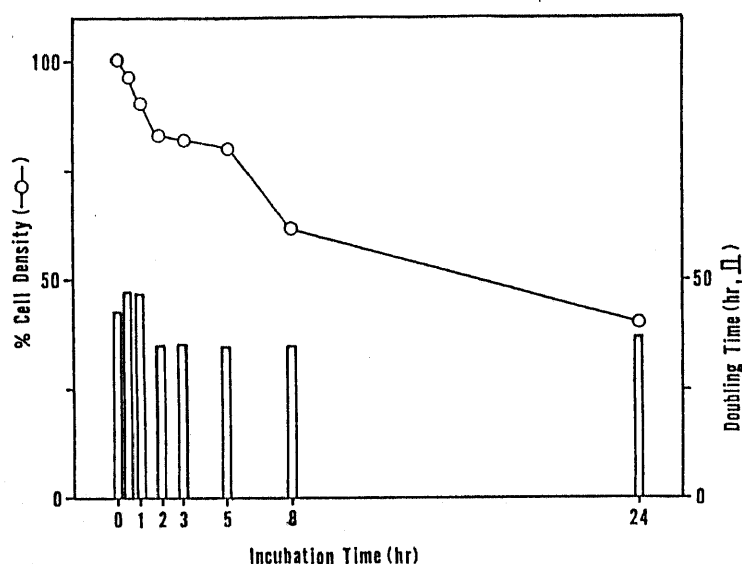


Fig. 39. Relative density and doubling time of human endothelial cells during 24 hr incubation in Earle' solution.

たが、8時間後には約60%になり、24時間後には約40%に減少した (Fig. 39)。各時点における生存細胞をMCD B系培地に交換して培養し、倍加時間を調べると、Fig. 39中のヒストグラムに示すように30分から24時間の培養において生存していた細胞はいずれも35~46時間であり、アール液を使用しない対照実験 (43時間) と差異はなかった。この結果は各時点の生存細胞にはアール液による影響が全く残っておらず、正常な細胞であることを示している。従って、以後の毒性実験はアール液中3時間培養という条件で行った。このアール液中3時間の培養という条件下では、リノール酸ヒドロペルオキシドはほとんど分解せず (約85%残留)、しかもほとんど異性化を起こしていなかった。またアルデヒド化合物もはアール液中3時間の培養では、ほとんど減少していなかった。

## 第2節 リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドの毒性発現への培地の影響

リノール酸ヒドロペルオキシドおよび数種のアルデヒドについて、MCD B系培地とアール液の2種類の培地を用いて毒性発現への培地の影響を調べた。

MCD B系培地またはアール液に10~50  $\mu$ M濃度のリノール酸ヒドロペルオキシドを加えて3時間培養した。細胞毒性はリノール酸ヒドロペルオキシドを含まない対照実験における生存細胞数に対する相対的な生存率として表した (Fig. 40 A)。MCD B系培地ではリノール酸ヒドロペルオキシドを50  $\mu$ Mで投与しても全く毒性を示さなかった。しかしアール液中ではリノール酸ヒドロペルオキシドは毒性を示し、25  $\mu$ M投与で細胞は約40%に減少し、50  $\mu$ Mでは約10%に減少した。(E,E)-2,4-decadienalはMCD B系培地中においても毒性を示し、50  $\mu$ M投与で細胞は約40%に減少した (Fig.

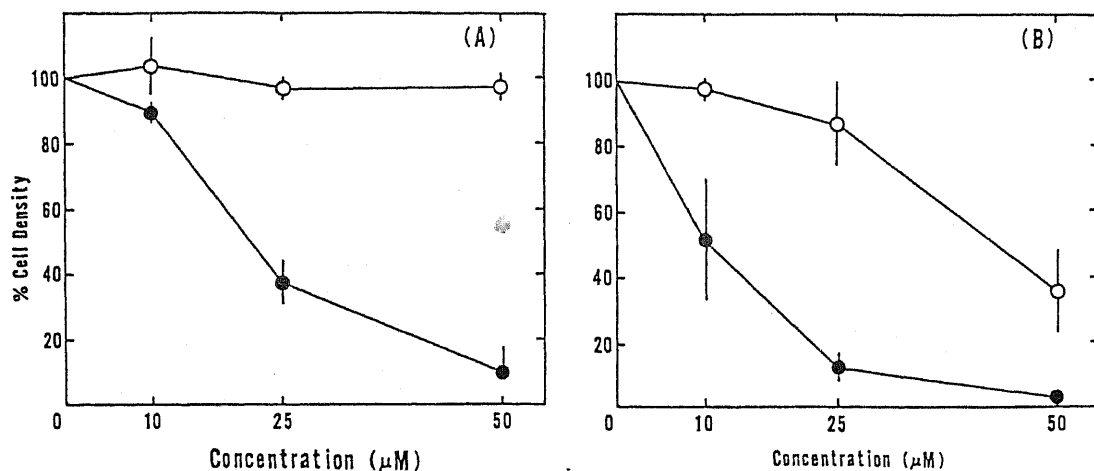


Fig. 40. Effects of the MCDB system (O) and Earle's solution (●) on the cytotoxicities of Z,E-13-LOOH (A) and (E,E)-2,4-decadienal (B).

40 B)。アール液中ではさらに強い毒性が発現し、 $10\ \mu\text{M}$ 投与で細胞は約50%に減少し、 $25\ \mu\text{M}$ ではほとんど全滅した。これらの結果は血清や増殖因子を含むMCD B-104培地によりヒドロペルオキシドやアルデヒドの毒性が弱まることを示す。化合物の毒性を短時間に検討するにはアール液を使用することが好ましく、MCD B系中には、これら化合物と反応してその毒性を低減する成分が存在することを明らかにした。

第3節 リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト血管内皮細胞に対する毒性

アール液を培地として用いて、リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト血管内皮細胞に対する毒性の定量化を試みた。実験に用いたアルデヒドは第3章に示したリノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化において生成が確認されたものである (Table VII)。それらの化合物を投

Table VII

Structures of aldehydes from the autoxidation of Z,E-13-LOOH.

Aldehyde	Abbreviation	Structure
Pentanal	5-0	
Hexanal	6-0	
Hexenal	6-1	
Heptenal	7-1	
Octenal	8-1	
Nonenal	9-1	
Nonadienal	9-2	
Decadienal	10-2	
9-Oxononanoic acid	9-0-COOH	
4-Hydroxynonenal	9-1-OH	

与して3時間培養したときの細胞の生存率をFig. 4 1に示した。リノール酸は50から100 μMという高濃度において若干の毒性を示すだけであった。それに対し、リノール酸ヒドロペルオキシドは強い毒性を示し、50%致死濃度(LC50)は20

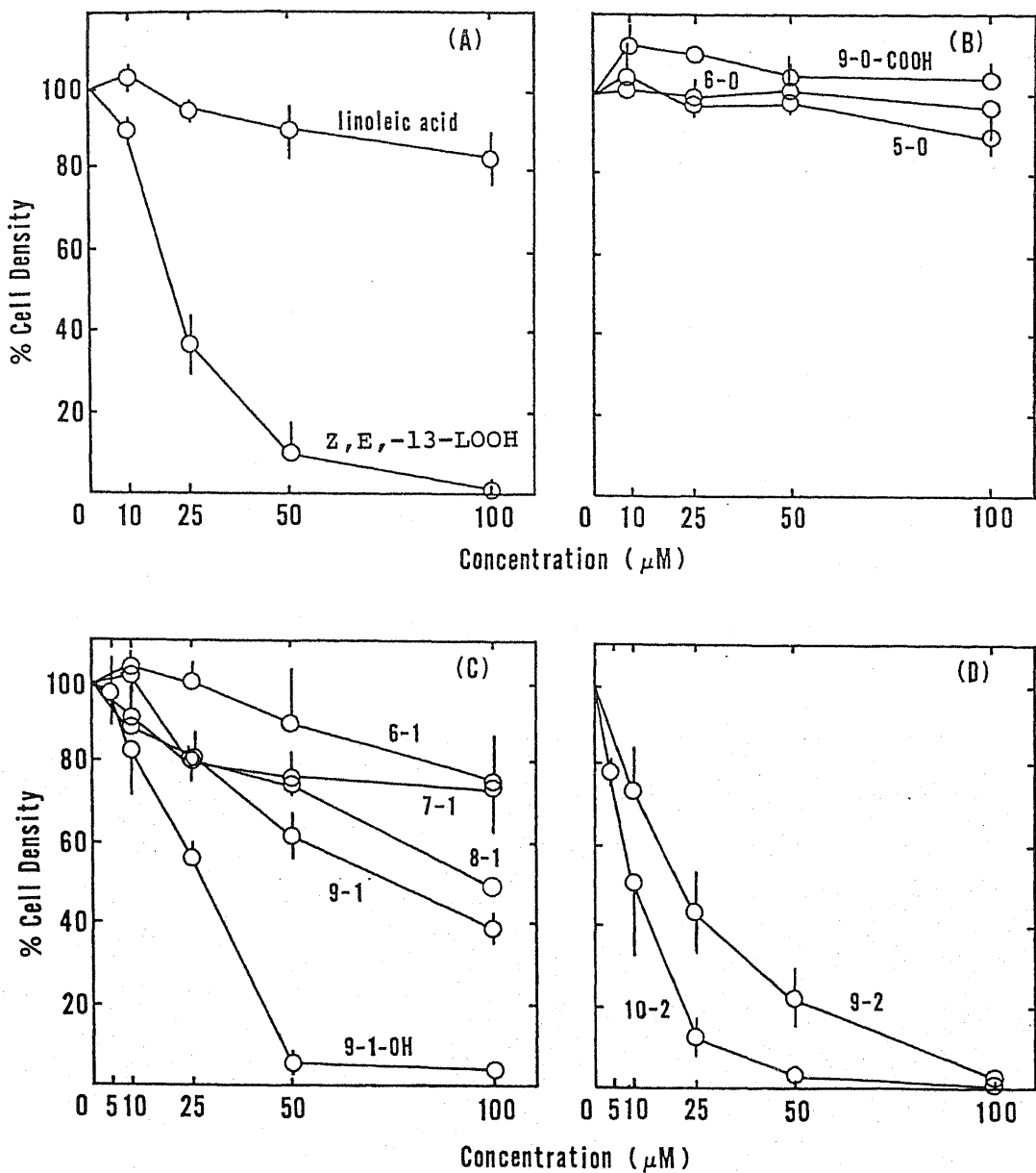


Fig. 41. Lethal effects of linoleic acid and Z,E-13-LOOH (A), saturated aldehydes (B),  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (C) and  $\alpha,\beta:\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes (D) on human endothelial cells in Earle's solution.

$\mu\text{M}$ であった (Fig. 4 1 A)。pentanal(5-0)、hexanal(6-0)および 9-oxononanoic acid(9-0-COOH)の飽和アルデヒドは全く毒性を示さなかった (Fig. 4 1 B)。 $\alpha, \beta$ -不飽和アルデヒド (アルケナール) は強くはないが明らかな毒性を示した。アルケナールの 4 位にヒドロキシ基が付加した (E)-4-hydroxy-2-nonenal (9-1-0H) はさらに強い毒性を示し、 $\text{LC}_{50}$ は  $25 \mu\text{M}$ であった (Fig. 4 1 C)。 $\alpha, \beta : \gamma, \delta$ -不飽和アルデヒド (アルカジエナール) も強い毒性を示し、 $\text{LC}_{50}$ は (E,E)-2,4-nonadienal (9-2) で  $21 \mu\text{M}$ 、(E,E)-2,4-decadienal (10-2) で  $9 \mu\text{M}$ であった (Fig. 4 1 D)。(E,E)-2,4-decadienalを投与したときの内皮細胞の形態的变化を Fig. 4 2 に示した。 $10 \mu\text{M}$ 投与では半分の細胞は死亡しており、生き残った細胞も周辺から縮み楕円形に変形した。 $25 \mu\text{M}$ 投与では大部分の細胞がディッシュから剥がれるか、または死亡して球形になっているのが観察された。

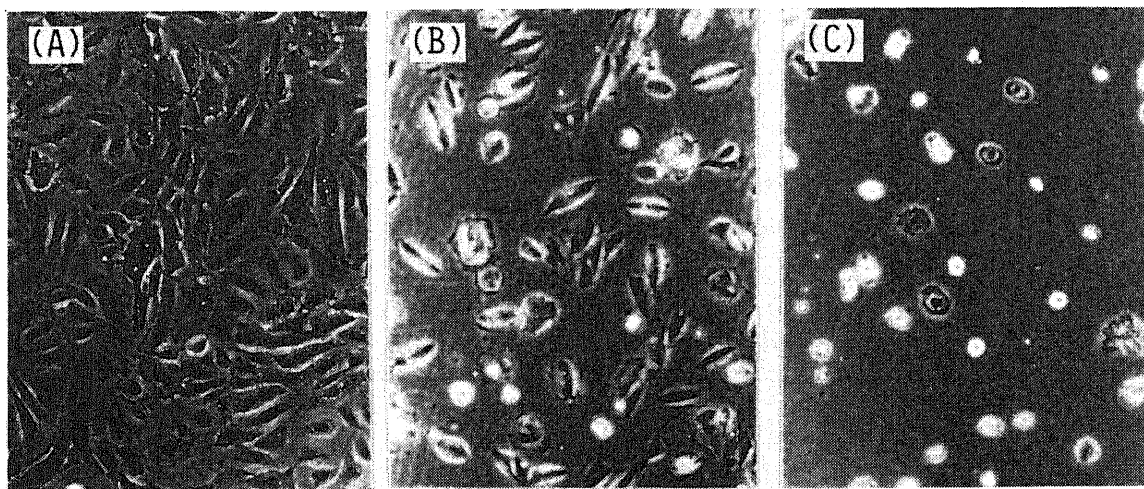


Fig. 42. Cytomorphological changes in human endothelial cells induced by incubation with ethanol (A),  $10 \mu\text{M}$  (B) and  $25 \mu\text{M}$  (E,E)-2,4-decadienal (C) for 3 hr at  $37^\circ\text{C}$ .

Table VIII

LC<sub>50</sub> of Z,E-13-LOOH and unsaturated aldehydes toward human endothelial cells.

Compound	LC <sub>50</sub> (μM)
Z,E-13-LOOH	20
Hexenal	>100
Heptenal	>100
Octenal	99
Nonenal	75
Hydroxynonenal	25
Nonadienal	21
Decadienal	9

Cells are incubated for 3 hr in Earle's solution supplemented with Z,E-13-LOOH or aldehyde.

リノール酸ヒドロペルオキシドおよび不飽和アルデヒドの50%致死濃度をTable VIIIに示した。リノール酸および飽和アルデヒドは今回の調べた濃度範囲においては毒性を示さなかつ

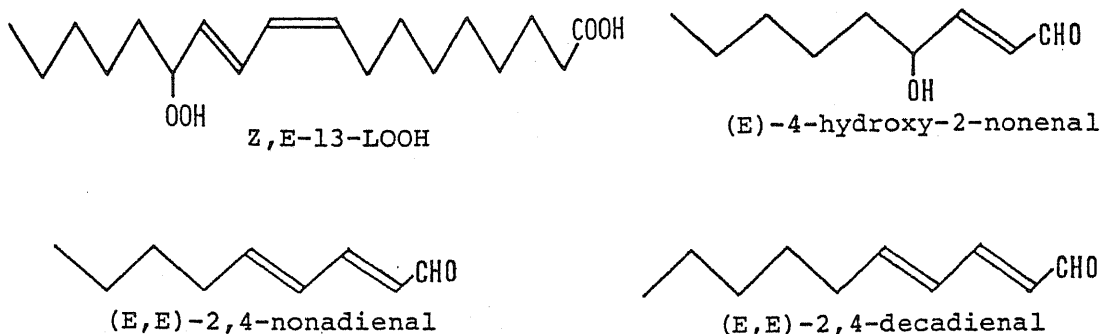


Fig. 43. Structures of toxic compounds toward human umbilical vein endothelial cells.

たので表には含まれていない。(E)-2-hexenal および (E)-2-heptenal の LC<sub>50</sub> は 100 μM 以上であり、毒性は弱かった。(E)-2-octenal および (E)-2-nonenal は若干の毒性を示した。リノール酸ヒドロペルオキシド、(E)-4-hydroxy-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienal および (E,E)-2,4-decadienal は強い毒性を示し、特に (E,E)-2,4-decadienal は今回検討した化合物の中でもっとも強い毒性を示した。

#### 第4節 リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒド によるヒト血管内皮細胞の増殖能に対する影響

アール液中でリノール酸ヒドロペルオキシドまたは関連不飽和アルデヒドと3時間培養した時点における生存細胞をMCDB系培地に戻し、細胞が毒性化合物から受けた損傷から回復する様子を調べた。(E)-2-octenal および (E,E)-2,4-decadienal を用いた場合の生存細胞数の経時変化をFig. 44に示した。アール液にエタノールのみを添加して3時間培養した対照実験における生存細胞数を100%として表現した。図中の矢印の時点で培地をMCDB系に交換した。10 $\mu$ M (E)-2-octenal (○) を投与された細胞の大半は増殖能を保持していた。25 $\mu$ M 投与 (●) の場合には、培地をMCDB系培地に戻して24~48時間後に徐々に増殖が再開され、生存細胞の一部が増殖能を回復したことを示した。50 $\mu$ M ( $\Delta$ ) および100 $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ) では細胞は直ちに死亡することはないが増殖能を消失しており、MCDB系培地に戻しても徐々にその数を減じた。(E,E)-2,4-decadienal と培養した細胞は、5 $\mu$ M 投与 ( $\diamond$ ) では実質上損傷を受けていないようであった。10 $\mu$ M 投与 (○) では約50%の細胞が死亡し、生き残った細胞も増殖能を失っており、徐々に死亡して減少した。25 $\mu$ M 以上の投与ではほとんどの細胞が投与直後に死滅した。

リノール酸ヒドロペルオキシドおよび不飽和アルデヒドを投与された細胞の増殖能をTable IXにまとめた。増殖能は0.1%のエタノールのみを添加したアール液中で3時間培養した後、MCDB系培地で48時間培養した後の生存細胞数を基にして、試験化合物を投与した実験における生存細胞数を比較して求めた。Tableには対照実験における増殖能を100として表した。

各化合物により内皮細胞の傷害が回復不能になる濃度を以下に示す：(E,E)-decadienal、 $10\mu\text{M}$ ；(E)-4-hydroxy-2-nonenal、(E)-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienal、Z,E-13-LOOH、 $25\mu\text{M}$ ；(E)-2-octenal、 $50\mu\text{M}$ ；(E)-2-heptenal、 $100\mu\text{M}$ ；(E)-2-hexenal、 $>100\mu\text{M}$ 。

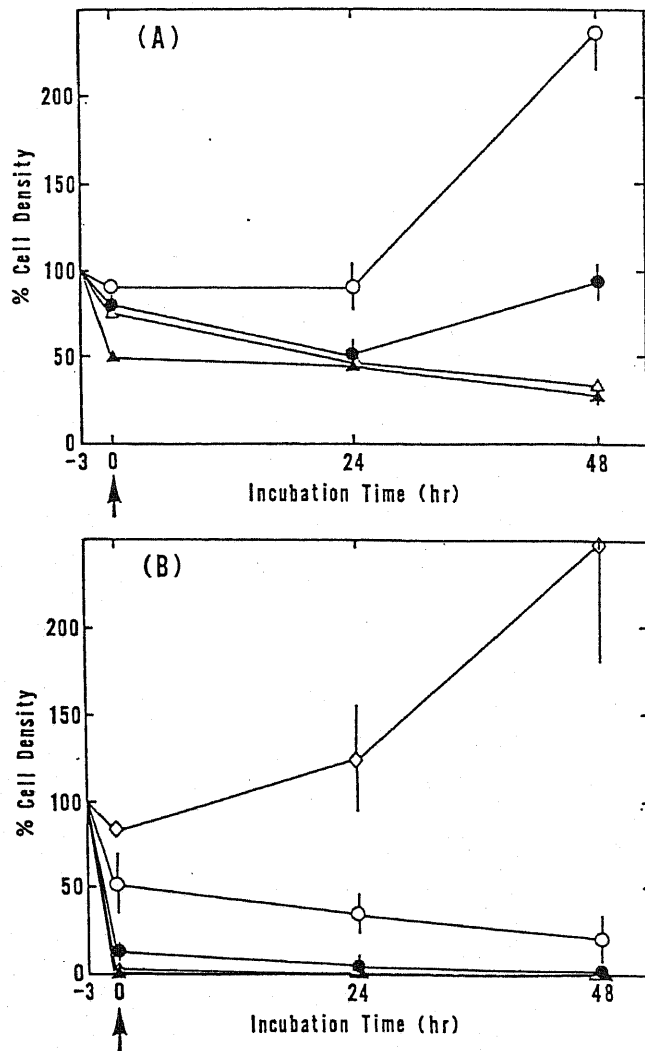


Fig. 44. Time courses of alteration in the density of human endothelial cells incubated in the MCDB system after exposure to (E)-2-octenal (A) and (E,E)-2,4-decadienal (B).

Table IX

Relative growth capabilities of human endothelial cells exposed to Z,E-13-LOOH or unsaturated aldehydes.

Compound	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Relative growth capability (%)
Z,E-13-LOOH	10	76.7 $\pm$ 0.4
	25	17.5 $\pm$ 4.5
	50	4.8 $\pm$ 5.1
	100	0.1 $\pm$ 0.1
(E)-2-hexenal	10	122.0 $\pm$ 1.0
	25	106.3 $\pm$ 0.8
	50	82.1 $\pm$ 2.3
	100	34.7 $\pm$ 2.7
(E)-2-heptenal	10	122.2 $\pm$ 1.0
	25	90.1 $\pm$ 16.9
	50	27.8 $\pm$ 14.6
	100	13.1 $\pm$ 2.3
(E)-2-octenal	10	77.4 $\pm$ 16.3
	25	33.4 $\pm$ 7.0
	50	11.1 $\pm$ 0.5
	100	9.4 $\pm$ 0.2
(E)-2-nonenal	10	51.3 $\pm$ 9.7
	25	9.9 $\pm$ 3.5
	50	9.6 $\pm$ 1.8
	100	7.5 $\pm$ 2.0
(E)-4-hydroxy-2-nonenal	5	65.3 $\pm$ 2.0
	10	39.0 $\pm$ 3.8
	25	11.1 $\pm$ 5.3
	50	0.9 $\pm$ 0.7
	100	0.2 $\pm$ 0.2
(E,E)-2,4-nonadienal	10	82.2 $\pm$ 8.7
	25	16.6 $\pm$ 6.1
	50	4.7 $\pm$ 2.4
	100	1.5 $\pm$ 1.0
(E,E)-2,4-decadienal	5	96.0 $\pm$ 12.3
	10	17.3 $\pm$ 7.3
	25	4.1 $\pm$ 1.8
	50	2.2 $\pm$ 1.8
	100	0.3 $\pm$ 0.3

Relative growth capability is defined as the percent cell density of an agent-treated culture compared with the cell density of the corresponding control culture after a 48 hr-cultivation in the MCDB-104 system, following exposure to agents.

## 第5節 化合物の官能基による毒性の差異

炭素数が9個の直鎖状化合物 (Fig. 45) について、種々の官能基による毒性への影響を調べた (Fig. 46)。アルコール (a) およびアルデヒド (b) は全く毒性を示さなかった。ケトン (c) は若干の毒性を示した。またアルデヒドとカルボン酸の両官能基を含む9-oxononanoic acid (e) も全く毒性を示さなかった。しかし二重結合とアルデヒドの両方を含む(E)-2-nonenal (f) は明白な毒性を示した。(E)-2-nonenal にヒドロキシ基 (g) や二重結合 (h) が加わると、さらに毒性は顕著であった。

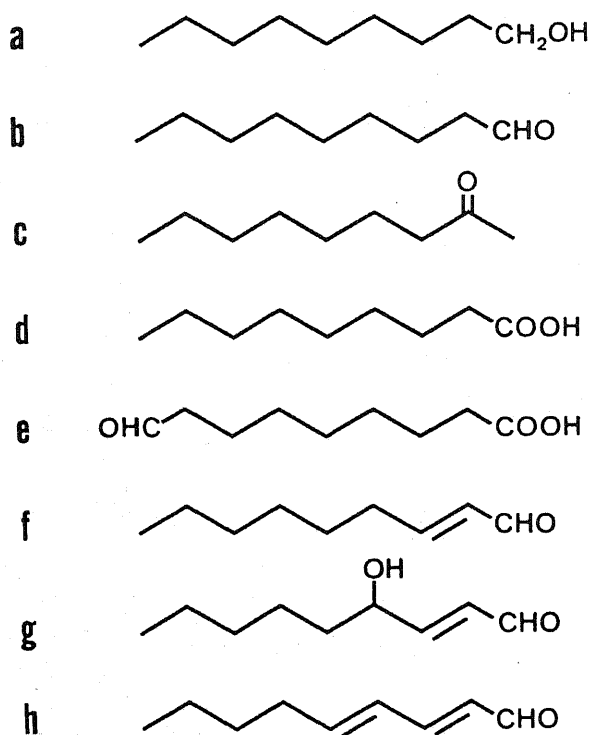


Fig. 45. Structures of C<sub>9</sub>-compounds.

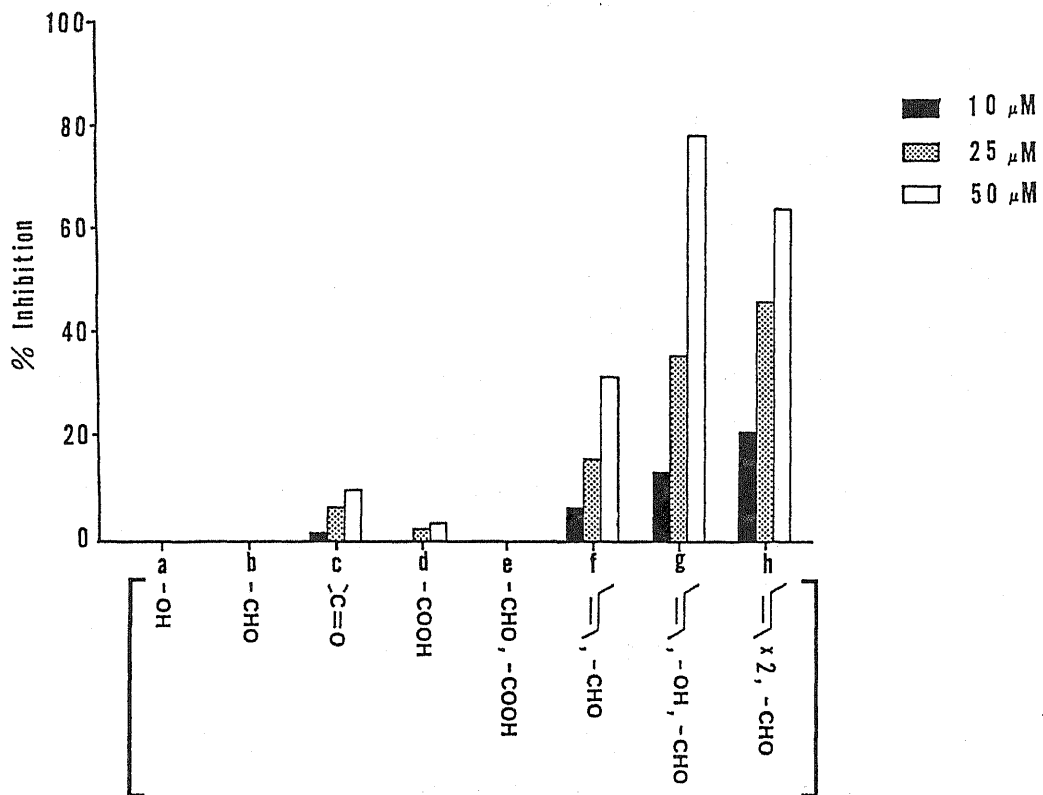


Fig. 46. Effects of functional groups in  $\text{C}_9$ -compounds on human endothelial cells. Alphabets in the figure indicate the  $\text{C}_9$ -compounds: see Fig. 45.

## 第6節 臍帯静脈内皮細胞と線維芽細胞に対するリノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドの毒性の比較

細胞種によって毒物に対する感受性が異なることが知られている<sup>86)</sup>。血管内皮細胞と線維芽細胞との間に毒性化合物への感受性に差異があるか検討した。Fig. 47に示すようにリノール酸ヒドロペルオキシド (Z,E-13-LOOH) および (E,E)-2,4-decadienalの両者とも、線維芽細胞の方が強い耐性を示した。検討した化合物のLC<sub>50</sub>は以下の通りであった: Z,E-13-LOOH、45 μM (20 μM); (E)-4-hydroxy-2-nonenal、38 μM (25 μM); (E,E)-2,4-decadienal、17 μM (9 μM)。括弧内の濃度は血管内皮細胞における各化合物のLC<sub>50</sub>である。両細胞種のLC<sub>50</sub>を比較すると、血管内皮細胞の方が感受性が高かったが、その差は約2倍であった。

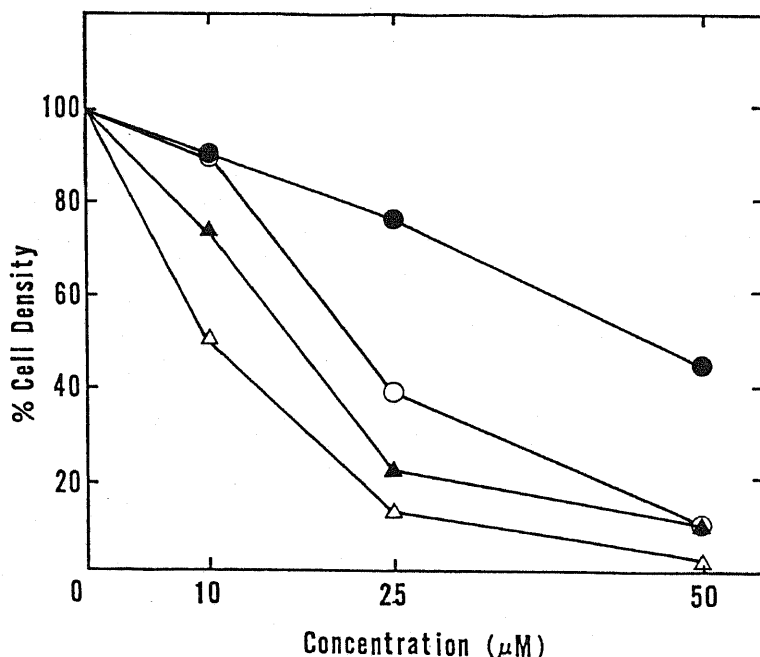


Fig. 47. Relative sensitivities of endothelial cells (open symbols) and fibroblasts (closed symbols) to Z,E-13-LOOH (○ and ●) or (E,E)-2,4-decadienal (△ and ▲).

## 第7節 考察

Rossにより提唱されたアテローム性動脈硬化発症についての“動脈硬化の傷害に対する反応説”によれば、アテローム性動脈硬化性プラーク（班）は血管壁を覆っている内皮細胞への傷害によって発生する<sup>87)</sup>。それが事実であるならば、内皮細胞への化学的傷害は本疾患の発生に極めて重要であると考えられる。他方、内皮細胞の生体膜において、特に酸化的ストレスに対する防御機構が劣化しているときには、脂質過酸化が起こりやすい状態にあると思われる。そのような場合には、脂質過酸化反応より生成する脂肪酸ヒドロペルオキシドやアルデヒドが血管内皮細胞を損傷する可能性を無視することはできない。動脈硬化の危険因子を検定するような研究を進めるには、ヒト血管内皮細胞に対する脂質過酸化物の細胞毒性を定量的に算定する手段が必要である。

従来、動物を用いた実験によって過酸化脂質の傷害作用が研究されてきたが、この種の実験では毒性を正確に評価することは難しい。最近Hennigらは培養ブタ血管内皮細胞を用いてリノール酸ヒドロペルオキシドが血管内皮細胞を傷害することを報告している<sup>88)</sup>。しかしブタ血管内皮細胞はヒト血管内皮細胞とは性質がかなり異なる。例えば、ブタ血管内皮細胞はFBS添加M199培地のような通常の培地で培養でき<sup>89)</sup>、エイジングを起こさず無限に増殖するとの報告もある<sup>90)</sup>。ウシ大動脈内皮細胞も多数研究されており、FBS添加F-12培地などで培養されている<sup>91)</sup>。それらの内皮細胞とは対照的に、ヒト血管内皮細胞はゼラチン（またはコラーゲン）でコートしたディッシュでないと培養できない<sup>92)</sup>。さらに培地中にFBSは勿論、増殖因子（ECGFやEGF）やヘパリンをも添加す

る必要がある<sup>93)</sup>。このようにヒトと他の動物種の血管内皮細胞の性質には大きな違いがあるので、動脈硬化症への危険因子を検討する場合には、ヒトの血管内皮細胞を用いるのが好ましい。近年までヒト血管内皮細胞の継代培養は難しかった<sup>84)</sup>が、著者らは増殖因子などを添加したMCD B系培地を用いることによって、ヒト臍帯静脈内皮細胞の継代培養を可能にし、大量かつ均一な内皮細胞を実験に使用できるようになった。

著者は実験培地としてアール液を用いることによって、ヒト血管内皮細胞に対する種々の化合物の毒性を定量的に分析する方法を考えた。この方法によりリノール酸ヒドロペルオキシドや関連アルデヒドをFBSや増殖因子を含む培地中で投与した場合、それらの細胞毒性が過小評価されることを明らかにした。このような培地中ではリノール酸ヒドロペルオキシドは鉄イオンなどにより容易に分解されるであろうし、アルデヒドはチオール化合物との反応によって減少するであろう。種々の化合物の細胞毒性を評価するには、培地の選択が重大な要素になることを明らかにした。培地の違いによって細胞傷害に差異が生ずることは、キサントニン-キサントニンオキシダーゼ系による実験で報告されたことがある<sup>94)</sup>。今回のアール液を用いるヒト血管内皮細胞への毒性の評価法は動脈硬化への危険因子の検索に有用と考えられる。

著者はこのアール液を用いる方法により、リノール酸ヒドロペルオキシドや不飽和アルデヒドがヒト血管内皮細胞に対して強い毒性を持つことを示した。アルデヒドの中でも (E)-4-hydroxy-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienal および (E,E)-2,4-decadienal は特に毒性が強くヒト血管内皮細胞は急速に傷害を受けた。50~100  $\mu$ M 濃度の (E)-2-heptenal、(E)-2-octenal または (E)-2-nonenal を投与した場合、細胞は直ちに

死亡することはないが増殖能を失った。これらのアルデヒドは細胞分裂を阻害しているとも考えられる。これらの結果よりアルデヒドに関しては、分子中に二重結合が存在することが毒性発現への必須条件と思われる。アルデヒド類の毒性の強さの順序は、ヒト線維芽細胞に対するものと同様であったが、LC50で比較すると血管内皮細胞の方が感受性が約2倍高かった。

4-ヒドロキシアルケナールのような不飽和アルデヒドはDNA合成、RNA合成、呼吸および解糖などの生体機能を阻害することが知られている<sup>67, 95-97)</sup>。本実験におけるヒト血管内皮細胞に対する毒性の作用機序は明らかではないが、不飽和アルデヒド(特にヒドロキシアルケナール)がチオール化合物に強い反応性を持つ<sup>70, 71)</sup>ことから、毒性はこれらのアルデヒドが細胞中のチオール含有化合物と反応することによって起こる可能性が考えられる。

## 第5章 高度不飽和脂肪酸酸化物の細胞毒性

不飽和脂肪酸は二重結合が多い程過酸化反応を受けやすいという報告がある<sup>98)</sup>。脂質過酸化反応の一次産物であるヒドロペルオキシドの安定性やその酸化分解から生成する二次産物の種類や比率は、原料となる不飽和脂肪酸に依存する。従って不飽和脂肪酸の違いによって酸化物の毒性は大きな影響を受けると考えられる。第3章および第4章の細胞への毒性実験において一次産物の脂肪酸ヒドロペルオキシドや二次産物のアルデヒドが毒性を持つことを明らかにした。高度不飽和脂肪酸が過酸化を受けた場合、その酸化物の毒性は酸化混合物中に生成する毒性化合物の量に依存すると考えられる。著者は高度不飽和脂肪酸としてリノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸を用いて自動酸化を行い、その酸化混合物のヒト臍帯静脈内皮細胞に対する毒性を調べ、その毒性成分の検索を試みた。

## 第 1 節 高度不飽和脂肪酸の自動酸化

リノール酸、リノレン酸またはアラキドン酸のベンゼン溶液に触媒として酢酸コバルトを添加し<sup>99)</sup>、40℃に温めながら酸素を通じて自動酸化を行った。排気はジニトロフェニルヒドラジン溶液に通して揮発性カルボニル化合物を捕捉した。酸素を3日間通じ経時的に過氧化物価(POV)<sup>100,101)</sup>およびカルボニル価(COV)<sup>102)</sup>を測定した(Fig. 48)。

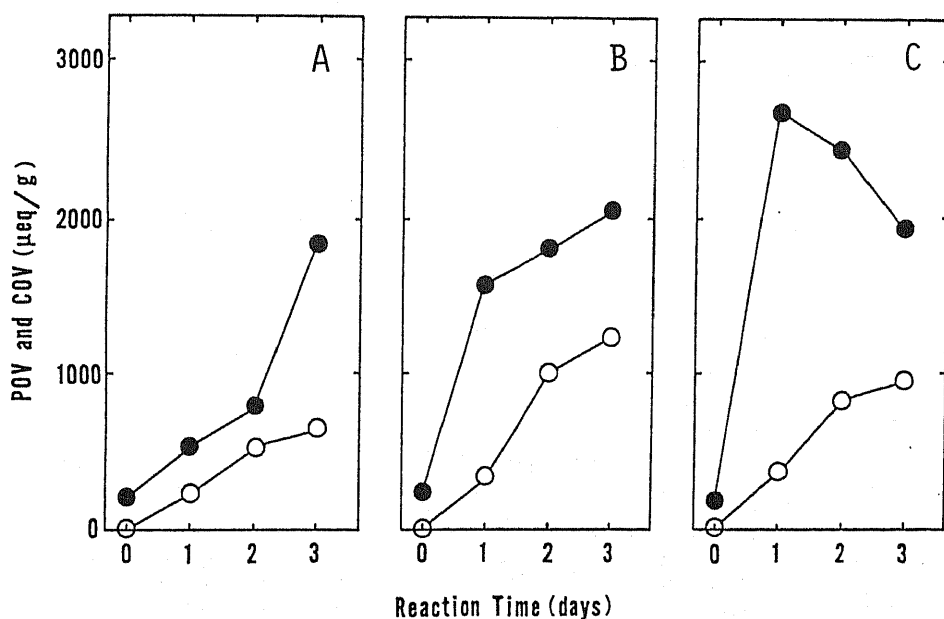


Fig. 48. Time courses of peroxide value (POV;●) and carbonyl value (COV;○) in the autoxidation of linoleic acid (A), linolenic acid (B) and arachidonic acid (C).

アラキドン酸は3種の脂肪酸のうちで最もPOVの上昇が速く、1日後には最大に達し、2日後にはPOVは低下し始めた。リノール酸は2日目までPOVの上昇はゆるやかであったが、3日目には急速に増加し始めた。リノレン酸は1日後にはPOVがかなり上昇したが、2、3日目は上昇がにぶった。POV

の経時変化から判断すると、本反応の自動酸化3日目という状態はリノール酸では成長反応の段階でヒドロペルオキシドの生成が急増し始めた状態であり、アラキドン酸ではヒドロペルオキシドの分解過程であると考えられた。COVはいずれの脂肪酸においても上昇し続けていたが、リノール酸の自動酸化では他の脂肪酸の場合の約半分と少なかった。Table Xには反応終了時のPOVなどの各種データを示した。脂質過酸化反応の最終産物の一つであるmalonedialdehydeなどと反応して発色するthiobarbituric acid (TBA)によるTBA値<sup>103)</sup>は、リノール酸の場合著しく低かった。ジニトロフェニルヒドラジンにより捕捉された排気中の揮発性カルボニル化合物のヒドラゾン誘導体の量はリノレン酸が他に比べて約1/5と少量であった。捕捉されたカルボニル化合物はいずれの脂肪酸においても、formaldehyde、acetaldehyde、propionaldehyde および hexanal であり、大きな違いは認められなかった。

Table X

Characteristics of autoxidized linoleic acid (18:2), linolenic acid (18:3) and arachidonic acid (20:4).

PUFA	POV μeq/g	COV μeq/g	TBA nmol/mg	DNPH-TRAP mg
18:2	1990	710	42	189
18:3	2250	1340	875	36
20:4	2150	1060	841	194

Polyunsaturated fatty acid (PUFA) was autoxidized for 3 days under oxygen at 40°C in the presence of Co(II).

COVを構成しているカルボニル化合物の種類の違いを調べるため、反応混合物のジニトロフェニルヒドラゾン誘導物をHPLCで分析した。リノール酸は二次産物の生成に至らない状態であったので、カルボニル化合物の生成は少なかった (Fig. 49A)。リノレン酸とアラキドン酸はともに二次産物が主要生成物になっている状態であったが、カルボニル生成物を比較するとアラキドン酸では(E)-4-hydroxy-2-nonenal (矢印)が確認できた (Fig. 49C) のに対し、リノレン酸では生成していなかった (Fig. 49B)。また生成するアルデヒドのHPLC分離パターンはリノール酸 (Fig. 31も参照)、アラキドン酸とリノレン酸とは異なっていた。

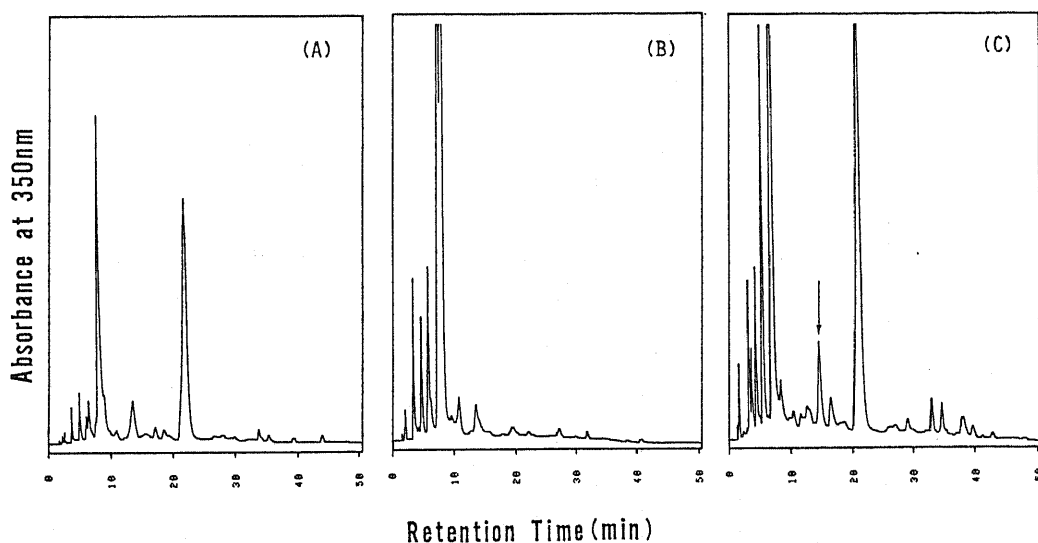


Fig. 49. High performance liquid chromatograms of the 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds from the autoxidation of linoleic acid (A), linolenic acid (B) and arachidonic acid (C) for 3 days under oxygen at 40 °C.

## 第 2 節 高度不飽和脂肪酸酸化物のヒト血管内皮細胞に対する毒性

ヒト臍帯静脈内皮細胞は第 4 章で単離した細胞を用いた。しかし本実験では、細胞をコンフルエント（集密的；約  $10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$ ）にして実験に用いた。25  $\mu\text{M}$  の脂肪酸またはその酸化混合物を添加したアール液中で 3 時間培養して毒性を調べた。リノール酸の酸化混合物は、リノール酸自身よりも明らかに強い毒性を示した（Fig. 50 A）。リノレン酸の場合は逆に酸化混合物の方が酸自身よりも毒性が弱かった（Fig. 50 B）。アラキドン酸では、酸自身と酸化混合物との間に差異は認められなかった（Fig. 50 C）。毒性を示したりノール酸および毒性成分が含まれていると予想されたアラキドン酸の酸化

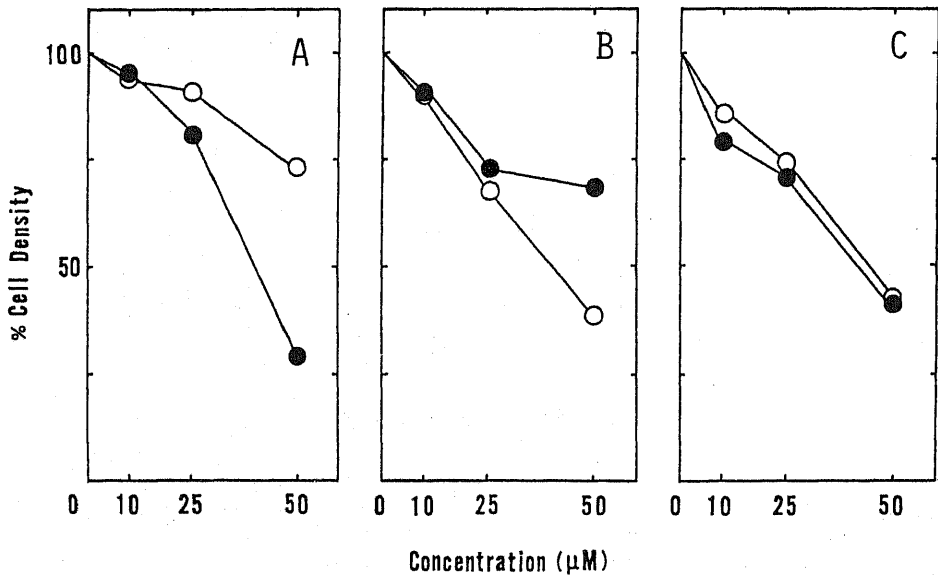


Fig. 50. Lethal effects of polyunsaturated fatty acids (○) and autoxidized ones (●) on human endothelial cells: (A), linoleic acid; (B), linolenic acid; (C), arachidonic acid.

混合物について、実際に毒性を引き起こしている化合物を検索する目的で、カラムによる分画を試みた。

### リノール酸酸化混合物中の毒性化合物の検索

リノール酸を3日間自動酸化した混合物(25  $\mu$ M相当量)を投与したときの細胞生存率は83%であった。この混合物をシリカゲルカラム(ヘキサン/エーテル; 90:10~0:100、v/v)により6分画に分けた。これらの分画の相対重量および細胞生存率をFig. 51に示した。最も強い毒性を示した分画4をさらにHPLC [Inertsil ODS-5; アセトニトリル/水 (-30:70-

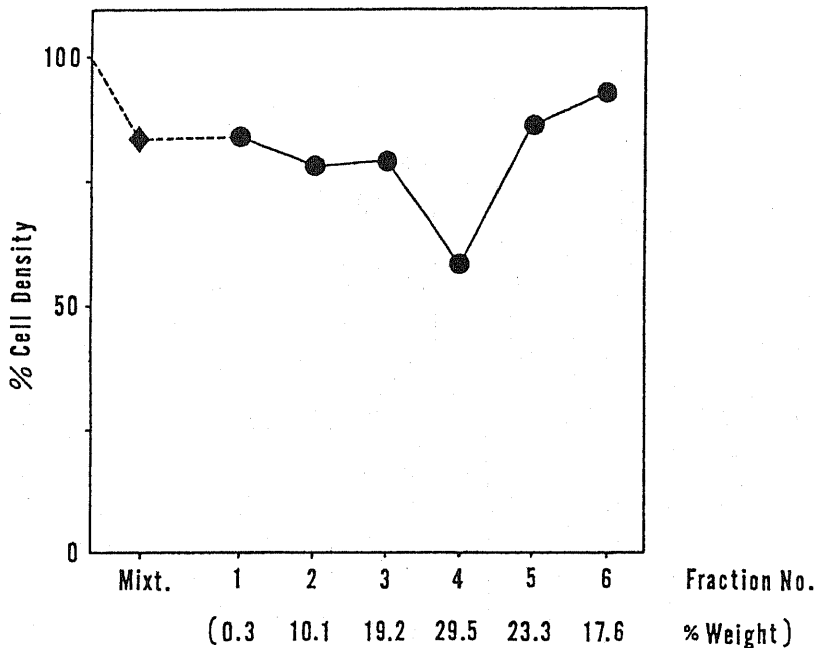


Fig. 51. Lethal effects and relative weights of fractions from silica gel column chromatography of autoxidized linoleic acid.

60:40-100:0-/-10-30-50-, v/v/min) ; 90 ml/hr; 215 nm] を用いて Fig. 5 2 に示すように 9 分画に分けた。その相対重量と細胞生存率を Fig. 5 3 に示した。強い毒性を示した分画 4 - 6 はスペクトルデータからリノール酸ヒドロペルオキシドであることが判明した。分画 4 - 5 も主要成分はリノール酸ヒドロ

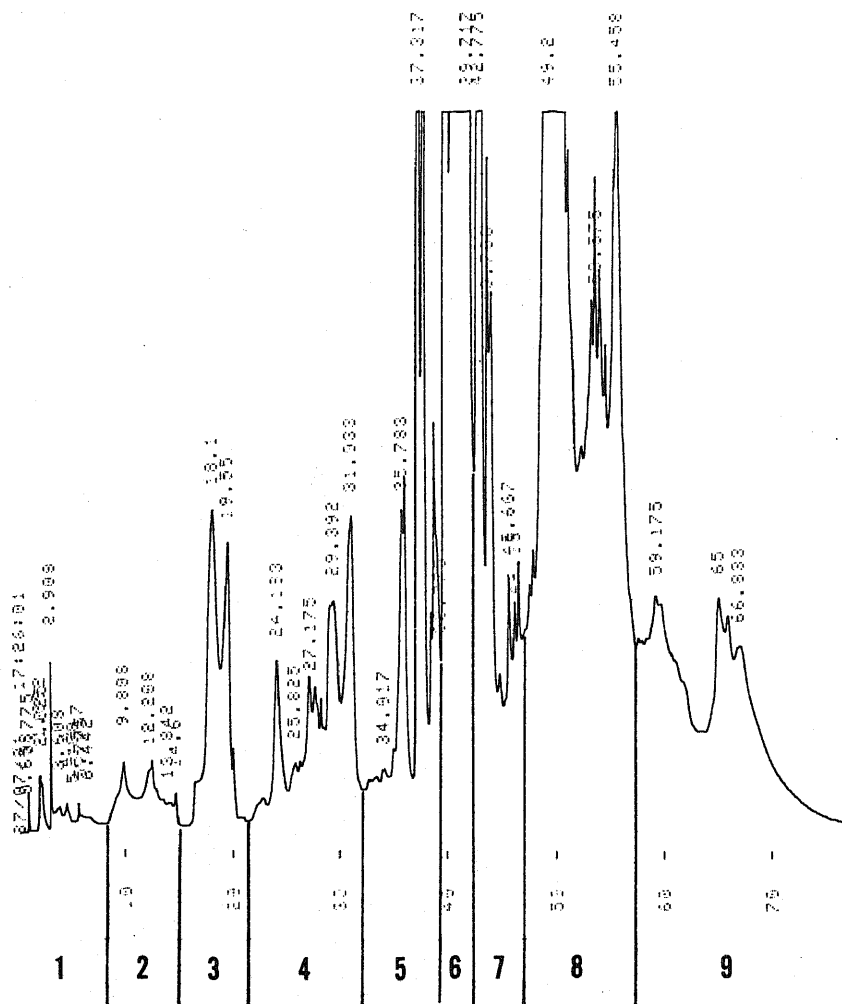


Fig. 52. High performance liquid chromatogram of the fraction 4 of Fig. 51.

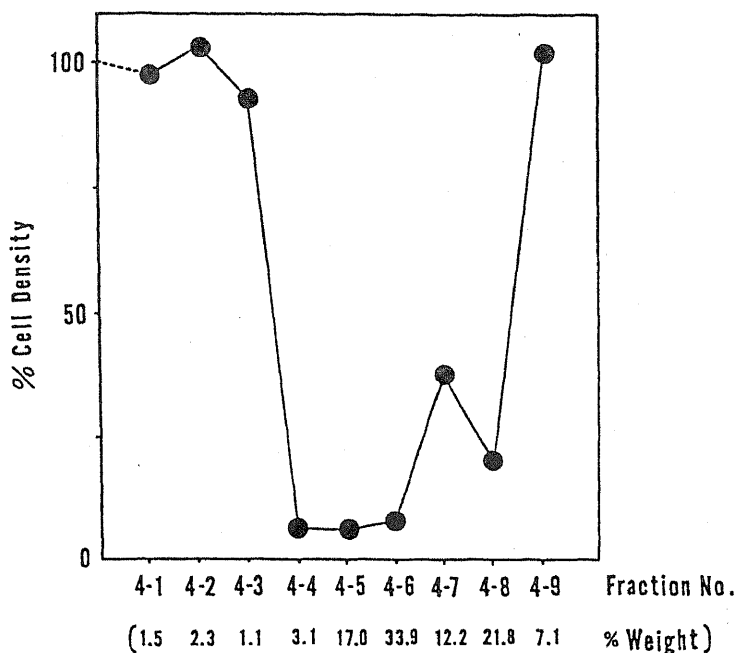


Fig. 53. Lethal effects and relative weights of fractions from high performance liquid chromatography of the fraction 4 of Fig. 51.

ペルオキシドであった。分画 4-4 や 4-8 も毒性を示したが、かなりの混合物であったため毒性成分の確認はできなかった。ただしこれらの分画には前章で見い出した毒性アルデヒドは含まれていなかった。結局、本実験におけるリノール酸酸化混合物の示す毒性は、分画 4 の約半分（分画 4-5 および 4-6）、すなわち全混合物のうち約 15% の収量で生成したリノール酸ヒドロペルオキシドによるものであることが明らかになった。また分画 2 および 3 は原料のリノール酸が主要成分であった。

## アラキドン酸酸化混合物中の毒性化合物の検索

アラキドン酸を3日間自動酸化した混合物を投与したときの細胞生存率は80%であった。この混合物をシリカゲルカラム（ベンゼン/エーテル；90:10~0:100、v/v）で7分画に分けると、分画5のみに毒性が認められた（Fig. 54）。分画3および4は原料のアラキドン酸であった。それ以外の分画はほとんど毒性を示さなかった。分画5をさらにHPLC [Inertsil

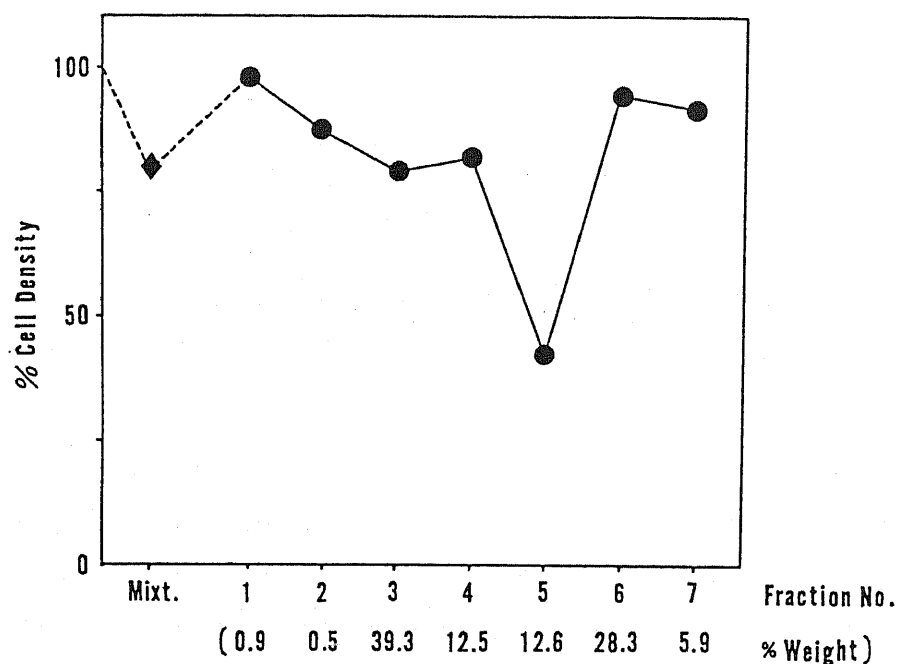


Fig. 54. Lethal effects and relative weights of fractions from silica gel column chromatography of autoxidized arachidonic acid.

ODS-5；アセトニトリル/水（-30:70-85:15-85:15-100:0-/-5-40-50-75-、v/v/min）；96 ml/hr；215 nm] を用いて11分画に分けた（Fig. 55）。このうち強力な毒性を示したのは



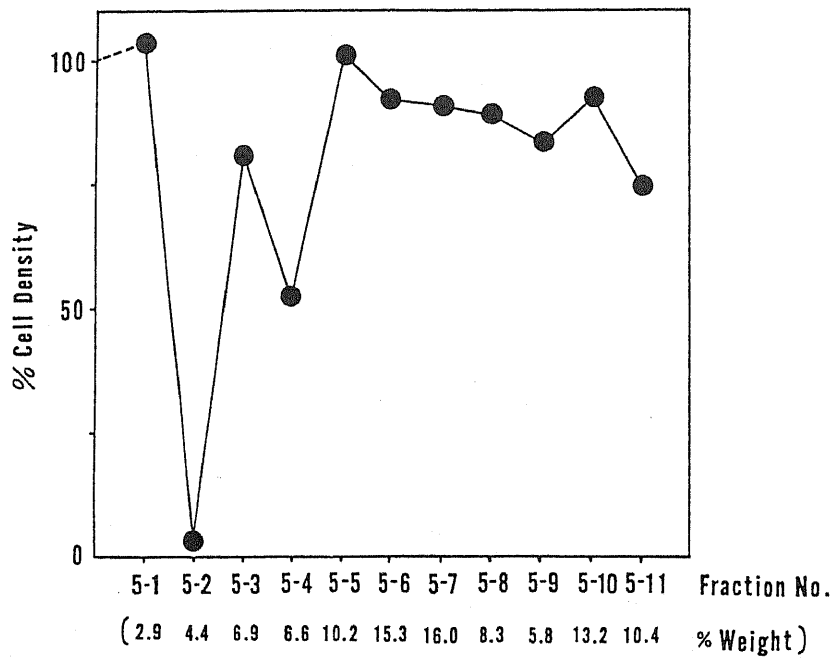


Fig. 56. Lethal effects and weights of fractions from high performance liquid chromatography of the fraction 5 of Fig. 54.

### 第 3 節 考察

異なる高度不飽和脂肪酸を同程度の酸化状態に酸化することは困難であったため、一定条件下（40℃、3日間）で酸化して、その混合物の毒性を検討した。脂肪酸自身の毒性も種類によって異なることが報告されている<sup>104)</sup>ので、酸化物の毒性は原料の脂肪酸と比較しなければならず、単純に他の脂肪酸との比較は出来ない。今回の酸化条件では、脂肪酸酸化物の毒性の強さはリノール酸、アラキドン酸、リノレン酸の順であった。分子中の二重結合が増加すれば当然酸化物の毒性も増加するであろうという予想とは異なる結果であった。

不飽和脂肪酸は二重結合の数が多い程酸化を受けやすい<sup>98)</sup>ので、同一条件下でリノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸を自動酸化した場合、酸化の段階が異なることは予想された。本実験におけるリノール酸の過酸化反応物はヒドロペルオキシドの生成が増加し始めた時点の混合物であり、その主要な毒性成分はリノール酸ヒドロペルオキシドであった。この混合物には毒性アルデヒドは含まれていなかった。二次産物が主要部分になるまで過酸化反応が進行した場合には、その混合物の毒性は二次産物の種類に依存するという予想は、リノレン酸およびアラキドン酸の酸化混合物の毒性実験から支持された。すなわちリノレン酸やアラキドン酸では、初めに生成するヒドロペルオキシドの反応性が高く、それ自身が毒性を示す程度の量蓄積せずに二次産物に変化するものと考えられる。実際、別途合成したアラキドン酸ヒドロペルオキシドは、リノール酸ヒドロペルオキシドと同等の毒性を示した。リノレン酸の酸化混合物は毒性を示さなかったが、アラキドン酸の酸化混合物から毒性成分が分離された。その化合物は前章でヒト血管内皮細胞に対し

て毒性が認められた不飽和アルデヒド、(E)-4-hydroxy-2-nonenal であった。

第3章で示したようにリノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化混合物もアラキドン酸の酸化混合物と同様に毒性を示した。二次産物の毒性がアルデヒド化合物に依るところが大きいと想定すると、リノール酸およびアラキドン酸とリノレン酸との過酸化反応における二次産物の毒性が著しく異なる原因の一つとして、二重結合の位置の違いが考えられる。Fig. 56 に示すようにリノール酸およびアラキドン酸はメチル末端から6個目の炭素( $\omega-6$ )から二重結合が存在するのに対して、リノレン酸は3個目の炭素( $\omega-3$ )から二重結合が存在する。この二重結合の位置の違いは二次産物として生成するアルデヒドの種類に大きな影響を及ぼすと考えられる。実際にリノール酸やアラキドン酸に比べてリノレン酸からは不飽和アルデヒド((E)-4-hydroxy-2-nonenal を含めたアルケナール)の生成が少ないとの報告もあり<sup>17)</sup>、この考えを支持する。実際に本実験においてもリノレン酸の酸化混合物中からは(E)-4-hydroxy-2-nonenal は確認できなかった。

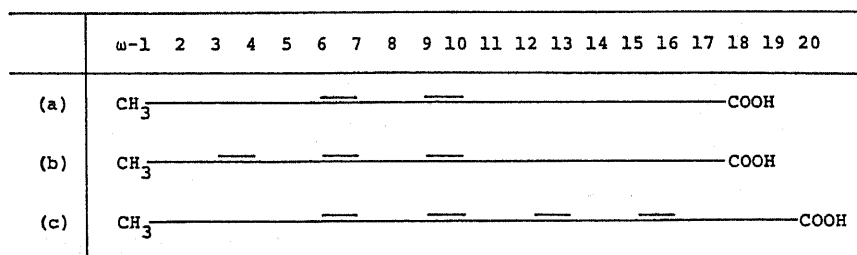


Fig. 57. Structures of linoleic acid (a), linolenic acid (b) and arachidonic acid (c).

結局、高度不飽和脂肪酸の酸化物の毒性は、初めに生成するヒドロペルオキシドの安定性や反応性および二次産物の種類の相違に依存すると考えられる。

## 結 語

最も構造の簡単な過酸化脂質であるリノール酸ヒドロペルオキシドの化学的性質および反応性を検討した。さらにリノール酸などの高度不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドおよびその酸化生成物であるアルデヒドの培養ヒト細胞に対する毒性を検討し、以下のことを明らかにすることができた。

### ① リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化

リノール酸をダイズリポキシゲナーゼ-1を用いて酸化し、主生成ヒドロペルオキシドである(13S)-(9Z,11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid (Z,E-13-L00H)をHPLCで精製し、化学的安定性を調べた。ヒドロペルオキシドの分解や異性化は溶媒および共存ガスにより大きな影響を受けた。酸素が存在するとヒドロペルオキシドは分解と異性化の両反応が促進された。従来、ヒドロペルオキシドは酸素が存在しない場合異性化は起こさないと報告されていた。しかしベンゼンやクロロホルム中ではアルゴンや窒素気流下においても異性化が起こることを見出した。ベンゼン中ではまず異性化が起こり、初期には分解はほとんど起こらなかった。しかしクロロホルム中では分解も異性化も急速に起こった。プロピルエーテルおよびメタノール溶液では、酸素が存在しない場合には異性化は起こらなかった。溶媒の種類によって脂肪酸ヒドロペルオキシドの安定性は複雑な影響を受けることを明らかにした。また細胞毒性の実験の条件下では、異性化は認められなかった。さらにZ,E-13-L00Hをアルゴン雰囲気下で封入して液体窒素中に保存すると、2ヶ月経過してもほとんど分解せず、異性化も

数%しか起こらないことを見出した。

## ② ビタミン E モデル化合物によるリノール酸ヒドロペルオキシドの捕捉反応

精製した Z, E-13-L00H と ビタミン E モデル化合物

(2, 2, 5, 7, 8-penta-methylchroman-6-ol) との反応を試みた。アルゴン気流下 Fe (II) と混合し、ビタミン E モデル化合物がヒドロペルオキシドを直接捕捉した付加生成物として epoxy-(pentamethylchromanoxy)octadecenoic acids (幾何異性体、2 種類; 立体異性体、4 種類) および hydroxymethoxy (pentamethylchromanoxy)octadecenoic acids (位置異性体、3 種類) を単離確認した。エポキシ型付加物におけるクロマノキシ基の付加する方向によるエリスロ体とスレオ体の両立体異性体の生成およびエポキシ環が加溶媒分解を受けた付加物の生成は今回初めて確認されたものである。

酸素の存在下の反応も試みたが、生成物はアルゴン気流下と同様であった。この結果はビタミン E モデル化合物によるリノール酸ヒドロペルオキシド由来ラジカルの捕捉反応が分子状酸素によって影響されないことを示している。この事実は生体内抗酸化剤として知られているチオール化合物のラジカル捕捉性が、酸素の存在下では全く効果を示さないという報告とは著しい相違を示し、生体内におけるビタミン E の抗酸化およびラジカル捕捉剤としての優れた能力を示唆する。

## ③ リノール酸ヒドロペルオキシドおよびその酸化生成物であるアルデヒドの細胞毒性

培養細胞を生体モデルとして用いることにより、過酸化脂質の毒性判定を容易にした。培養細胞としてはヒト線維芽細胞ま

たはヒト血管内皮細胞を用いた。ヒト血管内皮細胞は最近まで継代培養が困難であった。しかし動脈硬化を始めとする血管系疾患への過酸化脂質の関与を研究する場合には、他の動物ではなくヒトの血管内皮細胞を使用することが重要である。著者らはMCD系培地を使用することにより、ヒト血管内皮細胞の継代培養を実現した。培地に血清など種々の成分が含まれている場合、試験化合物がそれらの成分と反応を起こすと、その毒性が過小評価される可能性があることを明らかにした。特に、不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドは血清含有培地中では毒性がかなり減弱化することを確認した。アール液中にヒドロペルオキシドを添加して培養すると、ヒドロペルオキシドは線維芽細胞および血管内皮細胞の両細胞に対して毒性を示した。脂質過酸化反応の二次産物の一つであるアルデヒドについて毒性を調べたところ、いずれの細胞に対してもその分子内に二重結合を含む不飽和アルデヒドが毒性を持つことを見出した。特に、4位にヒドロキシ基が付加した(E)-4-hydroxy-2-nonenal および (E,E)-2,4-decadienal が強い毒性を示した。二重結合を2個含むアルデヒドであるアルカジエナールに毒性があることは、本研究で初めて確認された。

また高度不飽和脂肪酸の酸化混合物のヒト血管内皮細胞に対する毒性を検討した。リノール酸およびアラキドン酸の酸化混合物には毒性が認められたが、リノレン酸の酸化混合物は毒性を示さなかった。この実験条件下、リノール酸の酸化混合物中の主要毒性成分はリノール酸ヒドロペルオキシドであり、アラキドン酸の酸化混合物中の主要毒性成分は(E)-4-hydroxy-2-nonenal であった。これらの結果は高度不飽和脂肪酸の酸化物の毒性は脂肪酸の種類によって異なることを示唆し、その原因は一次産物であるヒドロペルオキシドの安定性や二次産物の相

違によるものと考えられた。

このように著者は培養ヒト血管内皮細胞を生体モデルとして用いる実験系を確立した。この系を用いることにより、従来分子レベルでは不明確なまま扱われてきた過酸化脂質について、分子レベルについての検討を可能にした。

## 謝 辞

本研究に対し、終始御懇篤なる御指導、御鞭達および本論文の御校閲を賜りました千葉大学薬学部、日野享教授に謹んで感謝致します。

本研究の機会を恵与され、多大の御便宜を賜りました東京都老人総合研究所総合研究部長、松尾光芳博士に深謝致します。

また、本研究を実際に進めるに際し、ヒト線維芽細胞を提供して頂きました本研究所アイソトープ研究室本田修二氏、ヒト臍帯静脈内皮細胞を提供して頂きました同研究室加治和彦博士に心から感謝致します。さらに高度不飽和脂肪酸の自動酸化などに御協力を頂きました同研究室中野俊一郎氏に謝意を表します。

最後に、本研究にあたり御助言を頂きました同研究室浦野四郎博士、松本茂信博士に厚く御礼申し上げます。

## 実験の部

本研究に使用した機器は以下に示すとうりである。

H P L C	Varian	8 5 2 0
	Varian	5 0 2 0
	Waters	PrepLC/System 5 0 0 A
	Shimadzu	L C - 6 A
M S	Shimadzu-LKB	9 0 0 0 B G C - M S
	JEOL	JMS-DX304
N M R	Varian	X L - 2 0 0
U V	Cary	1 1 8 C
	Cary	2 1 9
I R	Jasco	A - 2 0 2
cell counter	Coulter Counter	Z B I

## 第 1 章の実験

### ダイズリボキシゲナーゼ-1 によるリノール酸ヒドロペルオキシドの生成

三頸フラスコにリノール酸 (2.80 g, 10 mmol) を入れ、4 °C に冷却した 0.2 M ほう酸緩衝液 (pH 9.0、380 ml) を加えて攪拌して乳濁液にした。ダイズリボキシゲナーゼ-1 (4.72 mg;  $1.53 \times 10^5$  units/mg) を 0.2 M ほう酸緩衝液 (20 ml) に溶解して添加し、4 °C に冷却しながら酸素を 6 時間通じた。次に希塩酸を加えて酸性 (pH 3.0) にし、クロロホルム/メタノール (2:1、v/v; 200 ml  $\times$  3) で抽出した。抽出液を一緒にして水洗 (200 ml  $\times$  3) し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を除いた後、減圧下でエーテルを留去すると淡黄色油状物 (3.04 g) が得られた。その油状物をシリカゲルカラム (Mallinckrodt、SilicAR CC-7、100 g ; ヘキサン/エーテル、100:0~50:50、v/v) によって溶離するとリノール酸ヒドロペルオキシド 1.45 g (46.3 %) が得られ、原料のリノール酸 1.19 g (42.7 %) が回収された。このヒドロペルオキシドを H P L C (Varian 5020、MicroPak Si-10; ヘキサン/エタノール/酢酸、98.5:1.45:0.05、v/v) を用いて精製し (13S)-(9Z,11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid (Z,E-13-L00H) を得た。

### リノール酸の自動酸化

丸底フラスコにリノール酸 (2.0 g、7.1 mmol) を入れ、室温 (24~28 °C)、暗所で 3 日間攪拌した。酵素を用いた実験と同様

に処理して反応混合物からヒドロペルオキシド分画 (499.0 g、22.1 %) を得た。この分画をさらに H P L C で分離すると Z,E-13-LOOH (134.0 g)、(9E,11E)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid (E,E-13-LOOH; 77.2 g)、(10E,12Z)-と(10E,12E)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid (E,Z-9-LOOHとE,E-9-LOOH) との混合物 (240.6 g) が得られた。NMR は trimethylsilane (TMS) を内部標準として測定した。 $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルデータのうち C-4 ~ 7 の帰属は文献を参考にして推定した<sup>105-108</sup>)。

Z,E-13-LOOH:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 6 Hz, H-18), 1.32 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.60 (m, 4H, H-4 and 14), 2.19 (m, 2H, H-8), 2.26 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 4.28 (m, 1H, H-13), 5.45 (dt, 1H, J = 8 and 10 Hz, H-9), 5.57 (dd, 1H, J = 8 and 16 Hz, H-12), 6.01 (dd, 1H, J = 10 and 11 Hz, H-10), 6.54 (dd, 1H, J = 11 and 16 Hz, H-11); ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 7 Hz, H-18), 1.34 (m, 8H, H-4, 5, 6, and 7), 1.65 (m, 4H, H-3 and 14), 2.21 (m, 2H, H-8), 2.37 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 4.41 (q, 1H, J = 7 Hz, H-13), 5.52 (dt, 1H, J = 8 and 11 Hz, H-9), 5.60 (dd, 1H, J = 7 and 15 Hz, H-12), 6.04 (t, 1H, J = 11 Hz, H-10), 6.60 (dd, 1H, J = 11 and 15 Hz, H-11); ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  0.86 (t, 3H, J = 6 Hz, H-18), 1.11 and 1.21 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.49 (m, 2H, H-3), 1.70 (m, 2H, H-14), 2.10 (m, 4H, H-2 and 8), 4.42 (m, 1H, H-13), 5.57 (m, 1H, H-9), 5.62 (dd, 1H, J = 8 and 15 Hz, H-12), 6.12 (t, 1H, J = 11 Hz, H-10), 6.73 (dd, 1H, J = 11 and 15 Hz, H-11).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14.3 (C-18), 23.4 (C-17), 25.8 (C-3 and 15), 28.4 (C-8), 29.8 (C-

4), 30.0 (C-5 and 6), 30.4 (C-7), 32.7 (C-16), 33.6 (C-14), 34.8 (C-2), 86.9 (C-13), 129.1 (C-10), 129.4 (C-11), 133.3 (C-9), 133.5 (C-12), 177.2 (C-1). (CDCl<sub>3</sub>) δ 14.0 (C-18), 22.9 (C-17), 24.7 (C-15), 24.9 (C-3), 27.7 (C-8), 29.0 (C-4, 5 and 7), 29.4 (C-6), 31.8 (C-16), 32.6 (C-14), 34.1 (C-2), 86.7 (C-13), 127.7 (C-10), 129.7 (C-11), 131.5 (C-12), 133.6 (C-9), 179.2 (C-1); (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ 14.2 (C-18), 22.9 (C-17), 25.1 (C-15), 25.4 (C-3), 28.0 (C-8), 29.2 (C-4), 29.3 (C-5 and 6), 29.8 (C-7), 32.2 (C-16), 33.2 (C-14), 34.2 (C-2), 86.6 (C-13), 128.3 (C-10), 129.1 (C-11), 132.9 (C-9), 133.2 (C-12), 178.7 (C-1). UV λ<sub>max</sub> 234 nm (ε, 2.63 x 10<sup>4</sup>).

E, E-13-LOOH: <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 0.91 (t, 3H, J = 6 Hz, H-18), 1.34 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.61 (m, 4H, H-3 and 14), 2.11 (m, 2H, H-8), 2.29 (t, 2H, J = 8 Hz, H-2), 4.25 (m, 1H, H-13), 5.50 (dd, 1H, J = 8 and 15 Hz, H-12), 5.76 (dt, 1H, J = 7 and 15 Hz, H-9), 6.12 (dd, 1H, J = 10 and 15 Hz, H-10), 6.20 (dd, 1H, J = 10 and 15 Hz, H-11); (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.90 (t, 3H, J = 6 Hz, H-18), 1.32 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.65 (m, 4H, H-3 and 14), 2.10 (m, 2H, H-8), 2.37 (t, 2H, J = 6 Hz, H-2), 4.26 (m, 1H, H-13), 5.50 (dd, 1H, J = 8 and 16 Hz, H-12), 5.77 (dt, 1H, J = 8 and 15 Hz, H-9), 6.08 (dd, 1H, J = 9 and 15 Hz, H-10), 6.30 (dd, 1H, J = 9 and 16 Hz, H-11); (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) δ 0.85 (t, 3H, J = 6 Hz, H-18), 1.10 and 1.21 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.48 (m, 2H, H-3), 1.70 (m, 2H, H-14), 2.00 (m, 2H, H-8), 2.09 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 4.36 (t, 1H, J = 7 Hz, H-13), 5.50 (dd, 1H, J = 7 and 15 Hz, H-12), 5.63 (dt, 1H, J = 7 and 15 Hz,

H-9), 6.08 (dd, 1H, J = 11 and 15 Hz, H-10), 6.30 (dd, 1H, J = 11 and 15 Hz, H-11).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.0 (C-18), 22.8 (C-17), 24.7 (C-15), 25.0 (C-3), 29.0 (C-4, 5, 6, 7 and 8), 31.8 (C-16), 32.6 (C-14), 34.0 (C-2), 86.8 (C-13), 129.1 (C-12), 129.3 (C-10), 135.2 (C-11), 136.5 (C-9), 179.9 (C-1); ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  14.2 (C-18), 24.9 (C-17), 25.4 (C-3 and 15), 29.2 (C-6), 29.3 (C-4 and 5), 29.4 (C-7), 32.1 (C-8), 32.9 (C-16), 33.1 (C-14), 34.1 (C-2), 86.6 (C-13), 130.2 (C-12), 130.3 (C-10), 134.7 (C-11), 135.8 (C-9), 180.3 (C-1).

9-LOOH:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 7 Hz, H-18), 1.31 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.60 (m, 4H, H-3 and 14), 2.08~2.20 (m, 2H, H-8), 2.27 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 4.25 (m, 1H, H-9), 5.45 (m, H-13), 5.47 (dd, J = 8 and 14 Hz, H-10), 5.57 (dd, J = 8 and 15 Hz, H-10), 5.72 (dt, J = 7 and 14 Hz, H-13), 6.01 (t, J = 10 Hz, H-12), 6.06 (t, J = 10 Hz, H-12), 6.18 (dd, J = 10 and 15 Hz, H-11), 6.54 (dd, J = 11 and 15 Hz, H-11); ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 7 Hz, H-18), 1.31 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.64 (m, 4H, H-3 and 14), 2.16 (m, 2H, H-8), 2.36 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 4.38 (m, 1H, H-9), 5.56 (m, H-10 and 13), 5.78 (dt, J = 7 and 15 Hz, H-13), 6.05 (m, H-12), 6.29 (dd, J = 10 and 15 Hz, H-11), 6.60 (dd, J = 10 and 15 Hz, H-11). 但し、   は E, Z-9-LOOH、   は E, E-9-LOOH によるシグナルである。  $^{13}\text{C-NMR}$

( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14.3, 23.5, 26.0, 26.3, 30.1, 30.2, 30.5, 32.5, 33.6, 33.8, 34.9, 87.2, 131.0, 131.3, 135.0, 136.4, 177.5.  
linoleic acid:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.92 (t, 3H, J = 7 Hz, H-18), 1.35 (m, 14H, H-4, 5, 6, 7, 15, 16 and 17), 1.65 (m,

2H, H-3), 2.09 (m, 4H, H-8 and 14), 2.38 (t, 2H, J = 7 Hz, H-2), 2.81 (m, 2H, H-11), 5.40 (m, 4H, H-9, 10, 12 and 13).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14.4 (C-18), 23.6 (C-17), 26.1 (C-3), 26.6 (C-11), 28.2 (C-8 and 14), 30.2 (C-4, 5 and 6), 30.5 (C-7), 30.7 (C-15), 32.7 (C-16), 35.0 (C-2), 129.1 (C-10 and 12), 131.0 (C-9 and 13), 177.6 (C-1); ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  14.2, 23.0, 25.0, 26.2, 27.6, 29.3, 29.4, 29.5, 29.8, 30.0, 31.9, 34.2, 130.3, 130.4, 180.6.

### リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化

Z, E-13- または E, E-13-LOOH (7.8 mg、25  $\mu\text{mol}$ ) を 1 ml ミニバイアルに入れ、ミニナートバルブ S C - 1 3 (Pierce Chemical) を装着したふたをゆるく付け、三方コックを付けたビニール袋に入れた。三方コックの一方を真空ポンプにつなぎ、他方をアルゴン (高千穂商事、リサーチグレード; 酸素、5 ppm 以下) (または窒素や酸素) ポンベにつないだ。脱気とガス導入を 4 回繰り返して、アルゴンを導入した段階でふたをきつく締めて袋から出した。アルゴンで十分に飽和した溶媒 (0.5 ml) をシリンジで注入してリノール酸ヒドロペルオキシドを溶解した。バイアルを水浴で 50  $^{\circ}\text{C}$  に温めながら、経時的に反応混合物を採取して、HPLC および吸光度 (234 nm; ジェン吸収) を測定し、リノール酸ヒドロペルオキシドの異性化と分解を観察した。

### 脱気下におけるリノール酸ヒドロペルオキシドの異性化

アンプルにZ,E-13-L00Hの50mMベンゼン溶液を入れ、液体窒素で凍結して、水銀拡散ポンプで脱気( $5.0 \times 10^{-4}$  mmHg)した。室温に戻して、ベンゼン溶液を融解し、再び凍結して脱気した。この操作を5回繰り返して、凍結脱気した状態でアンプルを封じ、50℃に温めた。反応中アンプルを順次開封してヒドロペルオキシドの異性化と分解を上述と同様にして経時的に調べた。

## 第2章の実験

### 原料合成

リノール酸ヒドロペルオキシド(Z,E-13-L00H)の合成は第1章と同様にして行った。HPLCによる精製には、Waters社の大量分取用HPLC(PrepLC/System 500A)を用い、PrePak-500/Silicaカラムにヘキサン/エタノール/酢酸(98.7:1.25:0.05, v/v)を溶離液として用いて単離した。ビタミンEモデル化合物(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol)はNilsson<sup>109)</sup>の方法によって合成した。

### ビタミンEモデル化合物(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol)によるリノール酸ヒドロペルオキシド(Z,E-13-L00H)の捕捉反応

Z,E-13-L00H(1.12 g、3.6 mmol)および2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol(0.80 g、3.7 mmol)をメタノール(65 ml)に溶解し、アルゴンを通じながら氷浴で4℃に冷却した。その溶

液にアルゴン飽和メタノールに溶解した過塩素酸第一鉄

[ $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1.34 g, 3.7 mmol] を滴下し、さらに 20 分間冷却しながらアルゴンを通じた。次に減圧下で溶媒を留去し、容量を約 1 / 10 に濃縮した。残留物にエーテル (40 ml) および水 (20 ml) を加えて、振盪した。エーテル層を分離して無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、乾燥剤を除去してエーテルを留去した。残留物をシリカゲルカラムに掛け、ヘキサン/エーテル (5:1~1:2, v/v) で溶離した。さらに各分画を HPLC (Varian 5020、MicroPak Si-5; ヘキサン/エタノール/酢酸、98.5:1.45:0.05, v/v) で精製し、epoxy(pentamethylchromanoxo)octadecenoic acids (メチルエステルに誘導して精製) [(I a), 86.4 mg (4.6%); (I b), 22.4 mg (1.2%); (I c), 38.8 mg (2.1%)], hydroxymethoxy(pentamethylchromanoxo)-octadecenoic acids [(II a), 88.1 mg (4.5%); (II b), 101.7 mg (5.2%); (II c), 45.1 mg (2.3%)], [(III a), 82.3 mg (4.2%); (III b), 74.4 mg (3.8%); (III c), 28.6 mg (1.5%)] and [(IV), 21.1 mg (1.1%)], 13-hydroxyoctadecadienoic acid [(V), 16.0 mg (1.5%)], 13-oxo-octadecadienoic acid [(VI), 92.0 mg (8.8%)], 2-(3-hydroxy-3-methylbut-1-yl)-3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinone [(VII), 41.8 mg (7.1%)] and 5-methoxy-2,2,7,8-tetramethylchroman-6-ol [(VIII), 12.4 mg (2.0%)] を得た。原料の Z,E-13-LOOH は全て反応して残っていなかったが、2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol は 30.8% 回収された。MS はメチルエステルまたはその TMS 誘導体に変換して測定した。

(I a): MS m/e 528( $\text{M}^+$ ), 497( $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$ ), 441, 428[ $\text{M}^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$ ], 415[ $\text{M}^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{O})\text{CH}$ ], 303, 220

(chromanol<sup>+</sup>), 219, 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88, 1.28, 1.60, 1.78, [2.06, 2.12 and 2.16] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.29 (t, 2H, H-2), 2.56 (t, 2H, H-4'), 2.69 (m, 1H, H-13), 2.93 (dd, 1H, J = 2.2 and 4.9 Hz, H-12), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.87 (dd, 0.25H, J = 5.6 and 5.8 Hz, E-olefinic H-11), 4.40 (dd, 0.75H, J = 4.9 and 8.3 Hz, Z-olefinic H-11), 5.58 (m, 2H, H-9 and 10). UV λ<sub>max</sub> nm (ε) 283sh (2460), 289 (2770). IR (CCl<sub>4</sub>) cm<sup>-1</sup> 2935, 2860, 1745, 1460, 1265, 1190, 1170, 970 (E-olefin), 900 (trans-epoxide).

(I b): MS m/e 528(M<sup>+</sup>), 498(M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>O), 441, 428[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 415[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(O)CH], 303, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 219, 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.89, 1.27, 1.56, 1.76, [2.05, 2.12 and 2.16] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.29 (t, 2H, H-2), 2.56 (t, 2H, H-4'), 2.80 (dt, 1H, J = 2.2 and 5.6 Hz, H-13), 3.05 (dd, 1H, J = 2.2 and 6.3 Hz, H-12), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.25 (dd, 1H, J = 6.3 and 8.7 Hz, H-11), 5.53 (m, 2H, H-9 and 10). UV λ<sub>max</sub> nm (ε) 283sh (2270), 289 (2640). IR (CCl<sub>4</sub>) cm<sup>-1</sup> 2935, 2860, 1745, 1460, 1260, 1170, 895 (trans-epoxide).

(I c): MS m/e 528(M<sup>+</sup>), 497(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>O), 441, 428[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 415[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(O)CH], 303, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 219, 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.89, 1.27, 1.57, 1.77, [2.05, 2.11 and 2.14] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.30 (t, 2H, H-2), 2.56 (t, 2H, H-4'), 2.79 (dt, 1H, J = 2.2 and 5.7 Hz, H-13), 3.04 (dd, 1H, J = 2.2 and 6.2 Hz, H-12), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.81 (dd, 0.25H, J = 6.2 and 6.4 Hz, H-11), 5.52 (m, 2H, H-9 and

10). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2420), 289 (2700). IR (CCl<sub>4</sub>)  $\text{cm}^{-1}$  2935, 2860, 1745, 1460, 1265, 1190, 1170, 970 (E-olefin), 895 (trans-epoxide).

(II a): MS  $m/e$  560 ( $M^+$ ), 529 ( $M^+ - \text{CH}_3\text{O}$ ), 460 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$ ], 429 (460-OCH<sub>3</sub>), 415 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ], 340 ( $M^+$ -chromanol), 323 (340-OH), 309 (340-OCH<sub>3</sub>), 240 (460-chromanol), 220 (chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.)  $m/e$  632 ( $M^+$ ), 617 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ), 602 ( $M^+ - \text{CH}_2\text{O}$ ), 575 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ ], 517 [ $M^+ - (\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{CH}_3$ ], 501, 473, 455, 439, 415 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ], 312, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 173 [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHOTMS}$ ], 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.92, 1.15, 1.26, 1.28, 1.58, 1.77, 1.86, [2.05, 2.10 and 2.14] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.32 (t, 2H, H-2), 2.55 (t, 2H, H-4'), 3.30 (dd, 1H, J = 1.7 and 6.7 Hz, H-12), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.74 (m, 1H, H-13), 4.32 (dd, 1H, J = 6.7 and 9.2 Hz, H-11), 5.23 (dt, 1H, J = 6.4 and 15.3 Hz, H-9), 5.45 (dd, 1H, J = 9.2 and 15.3 Hz, H-10). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 282.5 (2630), 288.5 (3020). IR (CCl<sub>4</sub>)  $\text{cm}^{-1}$  3590 (OH), 2935, 2860, 1715, 1460, 1410, 1265, 1190, 1170, 1125, 1110, 1090, 970 (E-olefin).

(II b): MS  $m/e$  560 ( $M^+$ ), 529 ( $M^+ - \text{CH}_3\text{O}$ ), 460 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$ ], 429 (460-OCH<sub>3</sub>), 415 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ], 340 ( $M^+$ -chromanol), 323 (340-OH), 309 (340-OCH<sub>3</sub>), 240 (460-chromanol), 220 (chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.)  $m/e$  632 ( $M^+$ ), 617 ( $M^+ - \text{CH}_3$ ), 602 ( $M^+ - \text{CH}_2\text{O}$ ), 517 [ $M^+ - (\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{CH}_3$ ], 501, 415 [ $M^+ - \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OCH}_3)$ ], 412 ( $M^+$ -chromanol), 312, 292, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 173 [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHOTMS}$ ], 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.92, 1.15, 1.27, 1.29, 1.34, 1.61, 1.80, 1.90, [2.06, 2.09 and 2.13] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.36

(t, 2H, H-2), 2.58 (t, 2H, H-4'), 3.45 (dd, 1H, J = 3.9 and 6.9 Hz, H-12), 3.59 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.70 (m, 1H, H-13), 4.31 (dd, 1H, J = 3.9 and 9.4 Hz, H-11), 5.22 (dt, 1H, J = 5.9 and 15.5 Hz, H-9), 5.61 (dd, 1H, J = 9.4 and 15.5 Hz, H-10). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{OH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2340), 289.5 (2770). IR (CCl<sub>4</sub>) cm<sup>-1</sup> 3545 (OH), 2935, 2860, 1715, 1460, 1410, 1265, 1170, 1125, 1115, 1090, 975 (E-olefin).

(II c): MS m/e 560 (M<sup>+</sup>), 460 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 429 (460-OCH<sub>3</sub>), 415 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OH)CH(OCH<sub>3</sub>)], 341 (M<sup>+</sup>-chromanoxy group), 309 (341-CH<sub>3</sub>OH), 240 (460-chromanol), 220 (chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.) m/e 632 (M<sup>+</sup>), 575 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>], 474, 455, 440, 415 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OH)CH(OCH<sub>3</sub>)], 413 (M<sup>+</sup>-chromanoxy group), 220 (chromanol<sup>+</sup>), 173 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHOTMS], 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.89, 1.14, 1.26, 1.29, 1.58, 1.78, 1.87, [2.05, 2.08 and 2.12] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.33 (t, 2H, H-2), 2.56 (t, 2H, H-4'), 3.45 (dd, 1H, J = 3.2 and 5.5 Hz, H-12), 3.68 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.68 (overlapped with OCH<sub>3</sub> signal, 1H, H-13), 4.19 (dd, 1H, J = 3.2 and 9.5 Hz, H-11), 5.16 (dt, 1H, J = 3.2 and 15.5 Hz, H-9), 5.60 (dd, 1H, J = 9.5 and 15.5 Hz, H-10). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{OH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2480), 289 (2790). IR (CCl<sub>4</sub>) cm<sup>-1</sup> 3590, 2935, 2865, 1715, 1460, 1410, 1265, 1170, 1125, 1090, 970 (E-olefin).

(III a): MS m/e 560 (M<sup>+</sup>), 546, 529 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>O), 460 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 429 (460-OCH<sub>3</sub>), 415 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OH)CH(OCH<sub>3</sub>)], 401, 341 (M<sup>+</sup>-chromanoxy group), 323 (340-OH), 309 (341-CH<sub>3</sub>OH), 240 [340-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 220 (chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.) m/e 632 (M<sup>+</sup>), 617 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 602 (M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>O),

501, 471, 455, 439, 415 [ $M^+$ - $CH_3(CH_2)_4CH(OH)CH(OCH_3)$ ], 413 ( $M^+$ -chromanoxo group), 371, 312, 292, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 173 [ $CH_3(CH_2)_4CHOTMS$ ], 164.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88, 1.27, 1.34, 1.62, 1.76, [2.05, 2.08 and 2.12] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'- $CH_3$ ), 2.33 (t, 2H, H-2), 2.55 (t, 2H, H-4'), 3.22 (s, 3H,  $COOCH_3$ ), 3.36 (dd, 1H,  $J = 4.2$  and  $8.0$  Hz, H-12), 3.42 (m, 1H, H-13), 4.17 (dt, 1H,  $J = 5.5$  and  $8.3$  Hz, H-11), 5.26 (dd, 1H,  $J = 8.0$  and  $15.5$  Hz, H-9), 5.68 (dd, 1H,  $J = 8.3$  and  $15.5$  Hz, H-10). UV  $\lambda_{max}^{OH}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2340), 289.5 (2670). IR ( $CCl_4$ )  $cm^{-1}$  3570, 2940, 2865, 1715, 1460, 1415, 1265, 1170, 1125, 1100, 1090, 980 (E-olefin).

(III b): MS  $m/e$  560 ( $M^+$ ), 546, 529 ( $M^+$ - $CH_3O$ ), 513 (529- $CH_3$ ), 460 [ $M^+$ - $CH_3(CH_2)_4CHO$ ], 446, 429 (460- $OCH_3$ ), 415 [ $M^+$ - $CH_3(CH_2)_4CH(OH)CH(OCH_3)$ ], 341 ( $M^+$ -chromanoxo group), 323 (340-OH), 309 (341- $CH_3OH$ ), 220 (chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.)  $m/e$  632 ( $M^+$ ), 617 ( $M^+$ - $CH_3$ ), 602 ( $M^+$ - $CH_2O$ ), 575 [ $M^+$ - $CH_3(CH_2)_3$ ], 501, 471, 455, 439, 415 [ $M^+$ - $CH_3(CH_2)_4CH(OH)CH(OCH_3)$ ], 413 ( $M^+$ -chromanoxo group), 371, 292, 220 (chromanol<sup>+</sup>), 173 [ $CH_3(CH_2)_4CHOTMS$ ], 164.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88, 1.25, 1.27, 1.34, 1.64, 1.75, [2.02, 2.09 and 2.13] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'- $CH_3$ ), 2.34 (t, 2H, H-2), 2.52 (t, 2H, H-4'), 2.92 (s, 3H,  $COOCH_3$ ), 3.39 (dd, 1H,  $J = 3.6$  and  $8.4$  Hz, H-12), 3.60 (m, 1H, H-13), 4.19 (dt, 1H,  $J = 5.8$  and  $8.8$  Hz, H-11), 5.26 (dd, 1H,  $J = 8.4$  and  $15.5$  Hz, H-9), 5.65 (dd, 1H,  $J = 8.8$  and  $15.5$  Hz, H-10). UV  $\lambda_{max}^{OH}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2310), 289 (2610). IR ( $CCl_4$ )  $cm^{-1}$  3600, 2940, 2865, 1715, 1460, 1410, 1265, 1170, 1125, 1100,

1090, 980 (E-olefin).

(III c): MS m/e 560(M<sup>+</sup>), 546, 529(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>O), 460[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 429, 415[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OH)CH(OCH<sub>3</sub>)], 401, 390, 368, 341(M<sup>+</sup>-chromanoxy group), 323(340-OH), 309, 240 [340-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHO], 220(chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.) m/e 632(M<sup>+</sup>), 617(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>), 602(M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>O), 575[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>], 501, 471, 455, 439, 415[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OH)CH(OCH<sub>3</sub>)], 413 (M<sup>+</sup>-chromanoxy group), 371, 292, 220(chromanol<sup>+</sup>), 173 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHOTMS], 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88, 1.27, 1.34, 1.63, 1.77, [2.04, 2.08 and 2.12] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.34 (t, 2H, H-2), 2.55 (t, 2H, H-4'), 3.22 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.28 (dd, 1H, J = 5.4 and 7.7 Hz, H-12), 3.32 (m, 1H, H-13), 4.18 (dt, 1H, J = 7.7 and 8.7 Hz, H-11), 5.17 (dd, 1H, J = 7.7 and 15.4 Hz, H-9), 5.70 (dd, 1H, J = 8.7 and 15.4 Hz, H-10). UV λ<sub>max</sub> nm (ε) 283sh (2350), 289 (2700). IR (CCl<sub>4</sub>) cm<sup>-1</sup> 3600, 2940, 2865, 1715, 1460, 1415, 1265, 1170, 1125, 1095, 1090, 980

(E-olefin).

(IV): MS m/e 560(M<sup>+</sup>), 546, 529(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>O), 514, 428, 392, 220(chromanol<sup>+</sup>), 164; MS (TMS deriv.) m/e 632(M<sup>+</sup>), 601(M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 558, 470, 455, 439, 381, 292, 284, 243[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OTMS)CH=CHCH(OCH<sub>3</sub>)], 220(chromanol<sup>+</sup>), 199[M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(OTMS)CH=CH], 173[CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHOTMS], 164. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.86, 1.21, 1.26, 1.28, 1.33, 1.49, 1.62, 1.77, [2.05, 2.09 and 2.13] (each s, each 3H, 5', 7' and 8'-CH<sub>3</sub>), 2.35 (t, 2H, H-2), 2.55 (t, 2H, H-4'), 3.58 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H, H-9), 3.98 (dd, 1H, J = 5.8 and 6.4 Hz, H-10), 4.07 (m, 1H, H-13), 5.27 (dd, 1H, J = 6.4 and 15.6 Hz,

H-11), 5.82 (dd, 1H, J = 9.4 and 15.6 Hz, H-12). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 283sh (2300), 289 (2590). IR (CCl<sub>4</sub>)  $\text{cm}^{-1}$  3590, 2935, 2865, 1715, 1460, 1410, 1265, 1170, 1125, 1095, 1090, 980 (E-olefin).

(V): <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz, H-18), 1.33 (m, 8H, H-4, 5, 6 and 7), 1.59 (m, 4H, H-3 and 14), 2.17 (dt, 2H, J = 7.1 and 7.3 Hz, H-8), 2.34 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H-2), 4.17 (dt, 1H, J = 6.1 and 6.2 Hz, H-13), 5.44 (dt, 1H, J = 7.3 and 10.9, H-9), 5.66 (dd, 1H, J = 6.2 and 15.1 Hz, H-12), 5.97 (t, 1H, J = 10.9 Hz, H-10), 6.49 (dd, 1H, J = 10.9 and 15.1 Hz, H-11). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.0 (C-18), 22.6 (C-17), 24.7 (C-3), 25.1 (C-15), 27.6 (C-8), 28.9 (C-4, 5 and 6), 29.4 (C-7), 31.8 (C-16), 34.0 (C-2), 37.3 (C-14), 73.0 (C-13), 125.9 (C-11), 127.9 (C-10), 132.8 (C-9), 135.8 (C-12), 179.2 (C-1). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm 234. IR (CCl<sub>4</sub>)  $\text{cm}^{-1}$  3625, 2935, 2860, 1715, 1460, 1410, 1285, 1260, 985, 950 (E, Z-conjugated diene).

(VI): MS m/e 308 (M<sup>+</sup>), 294 (M<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 238 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>], 223, 209 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C=O], 177, 151 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(=O)CH=CHCH=CH<sup>+</sup>], 135, 111, 99 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C=O<sup>+</sup>], 83, 71 [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>].

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.92 (t, 3H, J = 7 Hz, H-18), 1.35 (m, 12H, H-4, 5, 6, 7, 16 and 17), 1.66 (t, 4H, H-3 and 15), 2.32 (t, 2H, H-8), 2.38 (t, 2H, J = 8 Hz, H-14), 2.58 (t, 2H, J = 8 Hz, H-2), 5.93 (dt, 1H, J = 8 and 11 Hz, H-9), 6.16 (dd, 1H, J = 11 and 11 Hz, H-10), 6.22 (d, 1H, J = 15 Hz, H-12), 7.53 (dd, 1H, J = 11 and 15 Hz, H-11). UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm 222, 278. IR (CCl<sub>4</sub>)  $\text{cm}^{-1}$  2935, 2860, 1715, 1675, 1625, 1590, 1460, 1410, 1285, 1260, 995, 955 (E, Z-

conjugated diene).

(VII): MS  $m/e$  236 ( $M^+$ ), 221 ( $M^+ - CH_3$ ), 203 (221 -  $H_2O$ ), 178 [ $m^+ - CH_2 = C(CH_3)OH$ ], 163 [ $M^+ - CH_2C(CH_3)_2OH$ ] 150, 149 [ $M^+ - (CH_2)_2C(CH_3)OH$ ], 135 (150 -  $CH_3$ ), 59 [ $CH_3CH(CH_3)OH^+$ ].  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.29 (s, 6H,  $CH_3$ ), 1.53 (dd, 2H,  $J = 5.1$  and  $6.3$  Hz), 2.01 and 2.04 (each s, 6H and 3H,  $CH_3$ ), 2.56 (dd, 2H,  $J = 5.1$  and  $6.3$  Hz). UV  $\lambda_{max}^{OH}$  nm 262, 268. IR ( $CCl_4$ )  $cm^{-1}$  3630, 2980, 2860, 1685, 1645, 1460, 1375, 1310, 1275, 1265, 1225.

(VIII): MS  $m/e$  250 ( $M^+$ ), 218 ( $M^+ - CH_3OH$ ), 203 (218 -  $CH_3$ ), 179, 163, 149 and 135 (クロマノールの特性フラグメントイオン).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.29 (s, 6H,  $CH_3$ ), 1.79 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-3), 2.12 (s, 3H, 7- $CH_3$ ), 2.24 (s, 3H, 8- $CH_3$ ), 2.62 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 3.32 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 4.54 (s, 2H,  $CH_2OCH_3$ ). UV  $\lambda_{max}^{OH}$  nm ( $\epsilon$ ) 298 (4200). IR ( $CCl_4$ )  $cm^{-1}$  3630 (OH), 2980, 2930, 1450, 1370, 1270 (aryl ether), 1170 (alkyl ether), 1100, 900.

### 第3章の実験

#### 試薬

リノール酸およびダイズリポキシゲナーゼ-1はSigma Chemical Co.から、pentanalは和光純薬から、hexanalおよび(E)-2-hexenalはAldrich Chemical Co.から、(E)-2-heptenal、(E)-2-octenal、(E)-2-nonenal、(E,E)-2,4-nonadienalおよび(E,E)-2,4-decadienalはAlfa Productsから購入した。リノール

酸ヒドロペルオキシド (Z,E-13-LOOH) は第1章と同様にリノール酸をダイズリポキシゲナーゼ-1処理して合成した。分取用HPLCカラムとしてSSC-Silica-5251N(千秋科学、5 $\mu$ mシリカゲル、径20mm、長さ250mm)を用いた(溶離液;ヘキサン/エタノール/酢酸、97.5:2.45:0.05、v/v、流速;10.0 ml/min)。(E)-4-hydroxy-2-nonenalはacroleinから6行程の操作によって合成した(通算収率、10.5%)<sup>110,111)</sup>。9-oxononanoic acidはオレイン酸のオゾン分解により作製した<sup>112)</sup>。リノール酸ヒドロキシド(Z,E-13-LOH)は相当するヒドロペルオキシドをtriphenylphosphineで還元して得た<sup>113)</sup>。

#### ヒト二倍体線維芽細胞の培養

ヒト二倍体線維芽細胞(TIG-1)は本研究所において胎児肺より樹立されたもので<sup>64)</sup>、70PDL(集団倍加数)程の寿命を持つ。実験には16~26PDLの細胞を用いた。10%ウシ胎児血清[FBS; Grand Island Biological Co. (GIBCO)]を添加したイーグル基礎培地(BME; GIBCO)を加えた径3.5 cmプラスチックディッシュ(Lux Scientific Co.)中に細胞を播種して、CO<sub>2</sub>培養器(5%CO<sub>2</sub>-95%空気)中に静置して37°Cで培養した。継代培養は週一回0.25%トリプシン(Difco Laboratories)により37°Cで10分間処理し、2~4 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/容器に播種して行った。培地の交換は播種後3日目に行った。

#### ヒト二倍体線維芽細胞へのリノール酸ヒドロペルオキシドおよび

## 関連アルデヒドの毒性実験

リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシド (Z,E-13-LOOH)、リノール酸ヒドロキシド (Z,E-13-LOH)、リノール酸ヒドロペルオキシド自動酸化混合物または関連アルデヒドの 50 mM エタノール溶液を調整した。自動酸化混合物は平均分子量が明らかでなかったためヒドロペルオキシドと同一と仮定して希釈した。これらのエタノール溶液を 0.1 % または 10 % FBS 添加 BME で希釈して、実験用培地とした。培地中のエタノールの最終濃度は 0.1 % 以下であった。継代培養で播種して 2 日後、培地を 0.1 % または 10 % FBS 添加 BME と交換し、1 日培養した後、試験化合物を含む実験用培地と交換してさらに 1 日培養した。生存細胞数は下記のようにして決定した。

## 細胞生存率の定義

ディッシュから培地を除き、りん酸緩衝液 (2 ml) で 2 回洗浄し、0.25% トリプシン溶液 (1 ml) を加えて 37 °C で 10 分間処理した。次に 10 % FBS 添加 BME (1 ml) を添加して、ピペットを用いて懸濁液にした。その細胞懸濁液をイソトン II (Coulter Electronics, 8 ml) で希釈して Coulter Counter ZBI を用いて計測してディッシュの底に付着していた細胞数を算定した。

細胞懸濁液の一部を採り、等量の 0.4 % トリパンプルー溶液を加えて室温で 3 分間静置した<sup>65)</sup>。血球算定板を用いて、少なくとも 300 個の細胞を調べて染色細胞と非染色細胞の数を求めた。細胞の染色排除能は計測された全細胞数に対する非染色細胞の比

率として得られた。従って、試験化合物の添加実験後の細胞生存率はディッシュの底に付着していた細胞数に非染色率を乗ずることにより算出される。相対生存率は対照実験における生存細胞数と試験化合物添加実験における細胞数とを比較することによって求めた。

### 乳酸脱水素酵素活性の検定

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は NADH 酸化法によって検定した<sup>66)</sup>。LDH を測定する場合は、ファルコンマルチウェルプレート (2 cm<sup>2</sup> × 24、Becton Dickinson Co.) を用いた。培地を試験管に移し、細胞をアール液 (グルコースを含む緩衝液; 0.5 ml) で 3 回洗浄し、各洗浄液を別々の試験管に保管した。次にディッシュの底に付着している細胞に 0.1 % トリトン X-100 / りん酸緩衝液 (0.5 ml) を加え、細胞を溶解した<sup>114)</sup>。培地、洗浄液または細胞溶解液 (50 μl) を UV キュベットに入れ、0.17 mM NADH / トリス-E D T A 緩衝液 (pH 7.4、2 ml) を添加して混合し、37 °C で 5 分間加熱した。次に 13.5 mM ピルビン酸ナトリウム溶液 (200 μl) を添加し、340 nm の吸光度の減少速度 (ΔA / min) を測定した。得られた吸光減少速度と NADH の 340 nm における分子吸光度 (6220 / mol / cm) を用いて、下式から LDH 活性を算出した。培地と洗浄液との LDH 活性の合計は、死亡した細胞から細胞外に放出された LDH 量を表わす。0.1 % トリトン X-100 / りん酸緩衝液中の LDH 活性は細胞内 LDH 量を表す。また 0.1 % および 10 % FBS 添加 BME の LDH のバックグラウンド活性は、それぞれ 1.4 および 105 U LDH / l であり、アール液には LDH 活性は認めら

れなかった。

$$\begin{aligned} \text{LDH} &= \frac{\Delta \text{Amin}^{-1}}{6220} \times \frac{2250}{50} \times 10^6 \\ &= 7235 \times (\Delta \text{Amin}^{-1}) \text{ U} / 1 (37^\circ\text{C}) \end{aligned}$$

リノール酸ヒドロペルオキシドの自動酸化および生成するアルデヒドの2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン体への誘導

リノール酸ヒドロペルオキシド (Z,E-13-LOOH; 285 mg、0.91 mmol) のエタノール (10 ml) 溶液を室温、酸素気流下で48時間攪拌した。またはZ,E-13-LOOH (190 mg、0.68 mmol) のエタノール (5 ml) 溶液をBME (95 ml) に懸濁させ、5% CO<sub>2</sub>-95% 空気下、37°Cで3日間静置した。反応混合物をイソオクタンで抽出し、抽出液に2,4-dinitrophenylhydrazine 試薬を添加した<sup>115)</sup>。混合物を室温で1時間攪拌した後、有機層を分離し、水層を再度イソオクタンで抽出した。抽出液を一緒にして水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を除いた後、溶媒を真空下で留去した。ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体はHPLC [Shimadzu LC-6A; Inertsil ODS-5; アセトニトリル/水 (70:30~80:20、v/v、210 ml/hr、350 nm)] を用いて分離した。各ヒドラゾンのカラム保持時間は以下の通りであった: pentanal, 16.6; hexanal, 20.7; (E)-2-hexenal, 19.3; (E)-2-heptenal, 24.0; (E)-2-octenal, 29.8; (E)-2-nonenal, 36.9; (E,E)-2,4-nonadienal, 31.5; (E,E)-2,4-decadienal, 39.4; 9-oxo-

nonanoic acid, 8.0; (E)-4-hydroxy-2-nonenal, 14.0 min. これらのヒドラゾン は MS および標準品との共クロマトグラフィーによって同定された。

hexanal: MS m/z 280 ( $M^+$ ), 206.

(E)-2-hexenal: MS m/z 278 ( $M^+$ ), 235.

(E)-2-octenal: MS m/z 306 ( $M^+$ ), 235.

(E)-4-hydroxy-2-nonenal: MS m/z 336 ( $M^+$ ), 237.

(E,E)-2,4-nonadienal: MS m/z 318 ( $M^+$ ), 261.

(E,E)-2,4-decadienal: MS m/z 332 ( $M^+$ ), 261.

#### 培地中のアルデヒドの直接的定量分析

0.1 % および 10 % FBS 添加 BME 中のアルデヒドをジニトロフェニルヒドラゾンに誘導せずに直接 ODS 逆相カラムを用いた HPLC で定量した。(E)-4-hydroxy-2-nonenal の定量にはアセトニトリル/水 (55:45、v/v)、(E,E)-2,4-decadienal の定量には同混合液 (75:25、v/v) を溶離液として用い、流速 42 ml/hr で流し、235 nm の波長で検出した。培地を前処理することなく直接 HPLC に注入して、データ処理装置 (島津、Chromatopac C-R3A) を用いてアルデヒドのピーク面積から定量した。

#### 第 4 章の実験

##### 試薬

ゼラチンおよびヘパリンは Sigma Chemical Co. から、上皮細

胞増殖因子 (EGF) は Collaborative Research から購入した。内皮細胞増殖因子 (ECGF) はウシ新生児の脳から単離した<sup>116)</sup>。アルデヒドをはじめ他の物質は第3章と同様にして入手した。

### ヒト臍帯静脈内皮細胞の単離および培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞は Jaffeらの方法<sup>117)</sup>を若干変更して単離した。すなわち新鮮なヒト臍帯静脈に0.1%トリプシンおよび0.02% EDTAを含むりん酸緩衝液を注入し、37°Cで15分間処理した。このトリプシン溶液を取り出し、等量の10% FBS 添加MCDB-104培地を加えた。この操作を数回繰り返して、得られた各液を10分間遠心分離 ( $1.0 \times 10^3$  rpm) し、沈降した細胞を10% FBS、ECGF (69 ng/ml)、EGF (10 ng/ml)、ヘパリン (100  $\mu$ g/ml) 添加MCDB-104 (以降MCDB系と略称) を入れたゼラチンコート済みプラスチックディッシュ (5 cm) に播種した。CO<sub>2</sub> 培養器で1日培養した後、再度MCDB系に交換して初代培養とした。細胞は週一回、0.025%トリプシン処理 (37°C、3 min) によってディッシュから剝し、1:4に分割して継代した。本細胞は約60 PDLの寿命を示した。実験には7~16 PDLの細胞を用いた。内皮細胞の確認は形態および血液凝固第VIII因子抗原への蛍光抗体法によって細胞膜表面に存在する抗体を検出することによって行った。

## リノール酸ヒドロペルオキシドおよび関連アルデヒドのヒト臍帯 静脈内皮細胞に対する毒性

リノール酸、リノール酸ヒドロペルオキシドおよびその関連アルデヒドの100 mMエタノール溶液を作製した。この溶液をアール液で希釈して5、10、25および50  $\mu$ M溶液を調整した。エタノールの最終濃度は0.1 %以下であった。細胞をゼラチンコートしたファルコンマルチウェルプレート(2 cm<sup>2</sup>)に4  $\times$  10<sup>3</sup>細胞/ウェルの密度で播種した。5% CO<sub>2</sub>-95% 空气中、37℃で3~4日培養した後、培地の交換を行い、さらに3~4日培養すると、細胞は2~4  $\times$  10<sup>4</sup>細胞/ウェルに増殖した。培地を試験化合物を含有するアール液に交換して3時間培養した。培地を除いた後、細胞をりん酸緩衝液で洗浄し、生存細胞数を第3章に記述した Coulter Counterおよびトリパンプルー排除試験によって算出した。

## 第5章の実験

### 高度不飽和脂肪酸の自動酸化

高度不飽和脂肪酸(1.0 g)をベンゼンに溶解して0.1 M溶液に調整して三頸フラスコに入れた。酢酸コバルト(5 mg)を添加して40℃に温めながら酸素を100 ml/minの流速で3日間通じた。排気は2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を通じた。反応中、過酸化物価(POV)およびカルボニル価(COV)を測定し、同時にHPLC(Shimadzu、LC-6A)を用いて反応の進行程度を調べた。カラムはInertsil ODS-5を用い、溶離液としてアセト

ニトリル／水（30:70～100:0、v/v）を用い、流速90 ml/hrで流し、波長210および235 nmで分析した。反応終了時には、POV、COVの他に thiobarbituric acid (TBA) 反応物量、ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の重量および細胞毒性を測定した。反応混合物中のアルデヒド化合物の種類はヒドラゾン誘導体に変換してから、第3章と同様の条件のHPLCを用いて分析した。細胞毒性は第4章と同様にヒト血管内皮細胞を用い、アール液中で3時間培養して調べた。細胞に投与する脂肪酸酸化混合物の重量は、原料の脂肪酸が25  $\mu$ Mになる重量と同じにした。例えば、リノール酸とその酸化混合物の場合は7.0  $\mu$ g/ml、リノレン酸とその酸化混合物の場合は6.9  $\mu$ g/ml、アラキドン酸とその酸化混合物の場合は7.6  $\mu$ g/mlに調整して投与した。

#### 過酸化価（POV）の測定

[日本油化学協会法] 100)

可溶性デンプン（1 g）と塩化ナトリウム（20 g）を水（100 ml）に溶解してデンプン溶液を作製した。試料約B mg（10～50 mg）をクロロホルム／氷酢酸（40:60、v/v；35 ml）に溶解し、窒素を通じて空気を除去し、窒素気流下でヨウ化カリウム飽和水溶液（1 ml）を加え、窒素を止めて直ちに激しく振盪し、室温暗所に5分間静置した。次に水（75 ml）を加えて激しく振盪し、デンプン溶液（1 ml）を添加し、0.01 Nチオ硫酸ナトリウムで適定し、デンプンによる着色が消失する時点の使用量（A）を求めた。同時に空試験を行い、その時のチオ硫酸ナトリウムの使用量を（a）とした。POVは次式から求められる。

$$P O V = \frac{(A - a) \times F}{B} \times 10^4 (\mu e q / g)$$

F: 0.01N チオ硫酸ナトリウムの力価 (この場合は 1)

[塩化アルミニウムを用いる比色法]<sup>101)</sup>

無水塩化アルミニウム (2 g) および ortho-phenanthroline (0.02 g) をエタノール (100 ml) に溶解して塩化アルミニウム溶液を作製した。試料 B mg (約 0.2 mg) に 2% ヨウ化カリウム / エタノール溶液 (0.5 ml)、塩化アルミニウム溶液 (0.5 ml) およびヘキサン (1 ml) を加えて激しく振盪した後、3000 rpm で 3 分間遠心して水層 (下層) を 560 nm で比色定量した。空試験を並行して行い、比色測定 of 対照に用いた。得られた吸光度をヨウ素酸カリウム標準液を用いて作製した検量線に適用して、活性酸素量 ( $\mu\text{mol O}_2 / \text{g}$ ) として算出する。

### カルボニル価の測定

[フェニルヒドラゾン誘導体を用いる比色法]

2,4-dinitrophenylhydrazine (0.25 g) を 6 N 塩酸 (100 ml) に溶解して、フェニルヒドラジン溶液を作製した<sup>114)</sup>。試料 B mg (約 1 mg) をベンゼン / イソオクタン (1:15, v/v; 16 ml) に溶解し、フェニルヒドラジン溶液 (5 ml) を添加して室温で 3 時間激しく攪拌した。有機層 (上層) を 337 nm において比色定量した。空試験を並行して行い、得られた液を対照として使用し、次式より COV を求めた。定数 0.864 は生成が予想されるアルデヒドの標準品の  $1 \mu\text{mol} / 16 \text{ ml}$  溶液による 337 nm の吸光

度の平均値である。

$$\text{COV} = \frac{E_{337}}{0.864 \times B} \times 10^3 (\mu\text{eq/g})$$

[フェニルヒドラゾン誘導体の塩基性条件下の比色法]<sup>102)</sup>

試料 B mg (約 1 mg) をベンゼン (5 ml) に溶解し、0.05% 2,4-dinitrophenylhydrazine / ベンゼン溶液 (5 ml)、4.3% トリクロル酢酸 / ベンゼン溶液 (3 ml) を加え、30 分間約 60 °C に加熱した。室温まで放冷した後 4% 水酸化カリウム / 無水エタノール溶液 (10 ml) を添加して発色させ、10 分後 440 nm で比色定量した。空試験を同時に行い、得られた液を対照として使用し、次式より COV を求めた。定数 0.854 は生成が予想されるアルデヒドの標準品の 1 μmol / 5 ml 溶液による 440 nm の吸光度の平均値である。

$$\text{COV} = \frac{E_{440}}{0.854 \times B} \times 10^3 (\mu\text{eq/g})$$

TBA 値の測定<sup>103)</sup>

試験管に B mg (約 1 mg) の試料と水 (0.3 ml) を入れ、0.05 N 塩酸 (3 ml) を加え、次に 0.67% thiobarbituric acid (TBA) 水溶液 (1 ml) を添加して混合した。試験管にふたをして、95 °C で 30 分間加熱した後、流水により速やかに室温まで冷却した。15% メタノール含有ブタノール (8 ml) を加えて振盪し、遠心分離 (2500 rpm、10 分間) した後、ブタノール層を取り、535 nm で比色定量 (f) した。10 nmol/mg tetraethoxy-

propane / メタノール溶液 (0.3 ml) の標準試料を用いて同様の操作を行い吸光度 (F) を求めた。過酸化物の濃度 (T B A 値) は次式より得られた。

$$T B A = \frac{f}{F} \times 10 \times \frac{1}{B} \quad (n m o l / m g)$$

## 参 考 文 献

1. D. Chiu, B. Lubin and S.B. Sholet, "Free Radicals in Biology," Vol. V, ed. by W.A. Pryor, Academic Press, New York, p.115 (1982).
2. Y. Sasaguri, T. Nakashima, M. Morimatsu and K. Yagi, J. Appl. Biochem., 6, 144 (1984).
3. Y. Sato, N. Hotta, N. Sakamoto, S. Matsuoka, N. Ohishi and K. Yagi, Biochem. Med., 21, 104 (1979).
4. T. Ichinose, A.K. Suzuki, T. Tsubone and M. Sagai, Life Sci., 31, 1963 (1982).
5. N.H. Stacey, H. Ottenwälder and H. Kappus, Toxicol. Appl. Pharmacol., 62, 421 (1982).
6. D. Harman, "Free Radicals in Biology," Vol. V, ed. by W.A. Pryor, Academic Press, New York, p.225 (1982).
7. T. Yamaguchi and Y. Yamaguchi, Agric. Biol. Chem., 43, 2225 (1979); 44, 1675 (1980).
8. E.N. Frankel, "Autoxidation in Food and Biological systems," ed. by M.G. Simic and M. Karel, Plenum Press, New York, P. 141 (1979).
9. N.A. Porter, B.A. Weber, H. Weenen and J.A. Khan, J. Am. Chem. Soc., 102, 5597 (1980).
10. E.N. Frankel, W.E. Neff, E. Selke and D. Weisleder, Lipids, 17, 11 (1982).
11. J.F.G. Vliegenthart and G.A. Veldink, "Free Radicals in Biology," Vol. V, ed. by W.A. Pryor, Academic Press, New York, P.29 (1982).

12. R.W. Bryant, J.M. Bailey, T. Schewe and S.M. Rapoport, *J. Biol. Chem.*, 257, 6050 (1982).
13. M.R. Egmond, J.F.G. Vliegenthart and J. Boldingh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1055 (1972).
14. B. Samuelsson, *Science*, 220, 568 (1983); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 22, 805 (1983).
15. T.C. Pederson and S.D. Aust, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 1071 (1973).
16. P. Hochstein and L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12, 388 (1963).
17. H. Esterbauer, "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer," ed. by D.C.H. McBrien and T.F. Slater, Academic Press, London, p.101 (1982).
18. H.W.-S. Chan and G. Levett, *Lipids*, 12, 99 (1977).
19. H.E. Pattee and J.A. Singleton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 183 (1977).
20. H.W.-S. Chan, G. Levett and J.A. Matthew, *Chem. Phys. Lipids*, 24, 245 (1979).
21. T. Kaneko and M. Matsuo, *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 332 (1984).
22. H.W. Gardner, R. Kleiman and D. Weisleder, *Lipids*, 9, 696 (1974).
23. H.W. Gardner, R. Kleiman, D. Weisleder and G.E. Inglett, *Lipids*, 12, 655 (1977).
24. H.W. Gardner and P.A. Jursinic, *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 100 (1981).
25. H.W. Gardner, K. Eskins, G.W. Grams and G.E. Inglett, *Lipids*, 7, 324 (1972).

26. T. Kaneko and M. Matsuo, Chem. Pharm. Bull., 33, 1899 (1985).
27. L.R. Tovar G and T. Kaneda, Yukagaku, 26, 169 (1977).
28. K. Yagi, H. Ohkawa, N. Ohishi, M. Yamashita and T. Nakashima, J. Appl. Biochem., 3, 58 (1981).
29. T. Kaneko, S. Honda, S. Nakano and M. Matsuo, Chem.-Biol. Interact., 63, 127 (1987).
30. T. Kaneko, K. Kaji and M. Matsuo, Chem.-Biol. Interact., in press (1988).
31. H.W.-S. Chan and F.A.A. Prescott, Biochim. Biophys. Acta, 380, 141 (1975).
32. M. Hamberg, Anal. Biochem., 43, 515 (1971).
33. M.R. Egmond and R.J.P. Williams, Biochim. Biophys. Acta, 531, 141 (1978).
34. J.B. Morton, R.C. Long, P.J.L. Daniels, R.W. Tkach and J.H. Goldstein, J. Am. Chem. Soc., 95, 7464 (1973).
35. B. Birdsall, N.J.M. Birdsall and J. Feeney, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1972, 316.
36. W.A. Pryor, "Free Radicals in Biology," Vol. I, ed. by W.A. Pryor, Academic Press, New York, p.1 (1976).
37. H.W.-S. Chan, C.T. Costaras, F.A.A. Prescott and P.A.T. Swoboda, Biochim. Biophys. Acta, 398, 347 (1975).
38. J.A. Singleton, H.E. Pattee and M.S. Nelson, J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 387 (1978).

39. N.A. Porter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 262 (1986).
40. N.A. Porter and D.G. Wujek, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2626 (1984).
41. B. Maillard, K.U. Ingold and J.C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5095 (1983).
42. A.G. Davies, D. Griller, K.U. Ingold, D.A. Lindsay and J.C. Walton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1981, 633.
43. T.F. Slater, "Free Radical Mechanisms in Tissue Injury," Pion Limited, London, p.91 (1972).
44. K. Yagi, "Lipid Peroxides in Biology and Medicine," Academic Press, New York, p.1 (1982).
45. A.S. Csallany, M. Chin and H.H. Drapers, *Lipids*, 5, 63 (1970).
46. E.H. Gruger Jr. and A.L. Tappel, *Lipids*, 5, 326 (1970).
47. W.L. Porter, L.A. Levasseur and A.S. Henick, *Lipids*, 6, 1 (1971).
48. A.L. Tappel, "Free Radicals in Biology," Vol. IV, ed. by W.A. Porter, Academic Press, New York, p.1 (1980).
49. R.T. Aplin and L. Coles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1967, 858.
50. J. Mercier and B. Agoh, *Chem. Phys. Lipids*, 12, 239 (1974).
51. Y. Yamamoto, H. Yatagai and K. Maruyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3229 (1981).
52. M. Hamberg, *Lipids*, 10, 87 (1975).

53. H.W. Gardner and R. Kleiman, *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 113 (1981).
54. H.W. Gardner and C.G. Grawford, *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 126 (1981).
55. T. Doba, G.W. Burton, K.U. Ingold and M. Matsuo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1984, 461.
56. H.W. Gardner, D. Weisleder and R. Kleiman, *Lipids*, 11, 127 (1976).
57. 金田尚志、石井清之助、*日水誌*、19, 171 (1953).
58. T. Miyazawa, A. Nagaoka and T. Kaneda, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1333 (1983).
59. T. Ohfuji and T. Kaneda, *Lipids*, 8, 353 (1973).
60. M.U. Dianzani, "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer," ed. by D.C.H. McBrien and T.F. Slater, Academic Press, London, p.129 (1982).
61. F.W. Summerfield and A.L. Tappel, *Biochim. Biophys. Acta*, 740, 185 (1983).
62. 吉岡倭子、金田尚志、*油化学*、23, 321, (1974).
63. T. Imagawa, S. Kasai, K. Matsui and T. Nakashima, *J. Biochem.*, 94, 87 (1983).
64. M. Ohashi, S. Aizawa, H. Ooka, T. Ohsawa, K. Kaji, H. Kondo, T. Kobayashi, T. Noumura, M. Matsuo, Y. Mitsui, S. Murota, K. Yamamoto, H. Ito, H. Shimada and T. Utakoji, *Exp. Gerontol.*, 15, 121 (1980).
65. S.I. Schlager and A.C. Adams, "Methods in Enzymology," Vol. 93, ed. by J.L. Langone and H.V. Vunakis, Academic Press, New York, p.233 (1983).

66. Scand. Soc. Clin. Chem. Clin. Phys., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 33, 291 (1974).
67. E. Schauenstein, H. Esterbauer and H. Zollner, "Aldehydes in Biological Systems," Pion Limited, London, p. 9 (1977).
68. J.F. Koster, R.G. Slee, C.C.M.R. Beysterveld and A. Montfoort, Biochim. Biophys. Acta, 754, 238 (1983).
69. J.F. Scaife, Naturwissenschaften, 57, 251 (1970).
70. E. Schauenstein and H. Esterbauer, Ciba Foundation Symp., 67, 225 (1978).
71. H. Esterbauer, A. Ertl and N. Scholz, Tetrahedron, 32, 285 (1976).
72. J. Glavind, S. Hartmann, J. Clemmensen, K.E. Jessen and H. Dam, Acta Pathol., 30, 1 (1952).
73. S. Moncada, R. Gryglewski, S. Bunting and J.R. Vane, Nature, 263, 663 (1976).
74. A. Szczeklik and R.L. Gryglewski, Artery, 7, 488 (1980).
75. M.A. Valentovic, C. Gairola and W.C. Lubawy, Prostaglandins, 24, 215 (1982).
76. S. Moncada, R.J. Gryglewski, S. Bunting and J.R. Vane, Prostaglandins, 12, 715 (1976).
77. I. Nishigaki, M. Hagihara, M. Maseki, Y. Tomoda, K. Nagayama, T. Nakashima and K. Yagi, Biochem. Int., 8, 501 (1984).
78. R.G. Gerrity, Am. J. Pathol., 103, 181 (1981).
79. A. Faggiotto, R. Ross and L. Harker,

- Arteriosclerosis, 4, 323 (1984).
80. M.E. Haberland, C.L. Olch and A.M. Folgelman, J. Biol. Chem., 259, 11305 (1984).
81. M.G. Cutler and R. Schneider, Atherosclerosis, 20, 383 (1974).
82. A.W. Sedar, M.J. Silver, J.J. Kocsis and J.B. Smith, 30, 273 (1978).
83. K. Yagi, BioEssays, 1, 58 (1984).
84. 三井洋司、組織培養、8, 397 (1982).
85. J. Paul, "Cell and Tissue Culture," Churchill Livingstone, London, p.86 (1973).
86. Y. Sasaguri, M. Morimatsu, T. Kinoshita, T. Nakashima, T. Inagaki and K. Yagi, J. Appl. Biochem., 7, 70 (1985).
87. R. Ross, Mech. Ageing Dev., 9, 435 (1979).
88. B. Hennig, C. Enoch and C.K. Chow, Arch. Biochem. Biophys., 248, 353 (1986).
89. D.N. Slater and J.M. Sloan, Atherosclerosis, 21, 259 (1975).
90. Y. Mitsui, M. Yamamoto and K. Yamamoto, "Progress in Microcirculation Research II," ed. by F.C. Courtice, D.G. Garlick and M.A. Perry, The University of New South Wales, p.37 (1984).
91. S.N. Mueller, E.M. Rosen and E.M. Levine, Science, 207, 889 (1980).
92. M. Kan, M. Kato and I. Yamane, In Vitro, 21, 181 (1985).
93. S.C. Thornton, S.N. Mueller and E.M. Levine,

- Science, 222, 623 (1983).
94. C.T. Bishop, Z. Mirza, J.D. Crapo and B.A. Freeman, *In Vitro*, 21, 229 (1985).
95. H. Grunicke, F. Hirsch, H. Wolf, U. Bauer and G. Kiefer, *Exptl. Cell Res.*, 90, 357 (1975).
96. A. Benedetti, L. Barbieri, M. Feroli, A.F. Casini, R. Fulceri and M. Comporti, *Chem.-Biol. Interact.*, 35, 331 (1981).
97. S. Hauptlorenz, H. Esterbauer, W. Moll, R. Pümpel, E. Schauenstein and B. Puschendorf, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 3803 (1985).
98. J.A. Howard and K.U. Ingold, *Can. J. Chem.*, 45, 793 (1967).
99. E.N. Frankel, R.F. Garwood, J.R. Vinson and C.L. Weedon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1982, 2707.
100. 日本油化学協会編、基準油脂分析試験法、2.4.12-86.
101. T. Asakawa and S. Matsushita, *Lipids*, 15, 965 (1980).
102. 熊沢恒、大山保、油化学、14, 167 (1965).
103. 内藤周幸、山中健、日本老年医学会雑誌、15, 187 (1978).
104. N. Morisaki, H. Sprecher, G.E. Milo and D.G. Cornwell, *Lipids*, 17, 893 (1982).
105. J. Bus, I. Sies and M.S.F. Lie Ken Jie, *Chem. Phys. Lipids*, 17, 501 (1976).
106. F.D. Gunstone, M.R. Pollard, C.M. Scrimgeour and H.S. Vedanayagam, *Chem. Phys. Lipids*, 18, 115 (1977).

107. J. Bus, I. Sies and M.S.F. Lie Ken Jie, Chem. Phys. Lipids, 18, 130 (1977).
108. H. Rakoff, D. Weisleder and E.A. Emken, Lipids, 14, 81 (1979).
109. J.L.G. Nilsson, H. Sievertsson and H. Selander, Acta Chem. Scand., 22, 3160 (1968).
110. J.P. Ward and D.A. van Dorp, Rec. Trav. Chim., 85, 117 (1966).
111. H. Esterbauer and W. Weger, Monatsh. Chem., 98, 1994 (1967).
112. R.A. Stein and N. Nicolaides, J. Lipid Res., 3, 476 (1962).
113. N.A. Porter, J. Logan and V. Kontoyiannidou, J. Org. Chem., 44, 3177 (1979).
114. H.O. Jauregui, N.T. Hayner, J.L. Driscoll, R. Williams-Holland, M.H. Lipsky and P.M. Galletti, In Vitro, 17, 1100 (1981).
115. S. Selim, J. Chromatogr., 136, 271 (1977).
116. R.R. Lobb and J.W. Fett, Biochemistry, 23, 6295 (1984).
117. E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Minick, J. Clin. Invest., 52, 2745 (1973).