

---

有毒アルデヒド，4-ヒドロキシヘキセナールの  
魚肉貯蔵・加工時における生成機構

---

16580168

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 境 正

宮崎大学農学部教授

---

## はしがき

魚肉の貯蔵・加工過程で脂質過酸化により生じる 4-ヒドロキシヘキサナール (HHE) は強い発ガンおよび細胞毒性を持つと共に、反応性に富み、タンパク質と反応して変性させ、栄養価を低下させる。したがって、その生成機構を解明し、生成を抑制することは水産食品学および衛生学上重要である。そこで、ブリ、マダイ、イワシ、サンマ、カツオを冷蔵・冷凍貯蔵した時の HHE 含量の変動および他の脂質過酸化の指標 (マロンアルデヒド (MA) やカルボニル修飾タンパク質 (CP) 測定し、魚種により HHE の生成機構に差があるかどうかを明らかにするとともに、脂質過酸化の進行との関わり合いを詳細に調べた。さらに、水産加工技術上重要なすり身を考慮して、NaCl 添加が HHE 生成に及ぼす影響を詳細に調べる。NaCl は脂質過酸化を進行するので、他の指標の変動と HHE 生成の変動との関係を検討した。さらに、 $\alpha$ -トコフェロール、カテキン等の抗酸化物質の添加がその生成に及ぼす影響を調べた。以上の結果を元に、HHE を生じない安全で栄養価の低下しない魚肉および加工食品を供給するための貯蔵・加工条件を明らかにした。以上の結果についてのとりまとめたものが、この報告書である。

## 研究組織

研究代表者：境 正 (宮崎大学農学部教授)

研究分担者：河原 聡 (宮崎大学農学部講師)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	3,100,000	0	3,100,000
平成 17 年度	700,000	0	700,000
総計	3,800,000	0	3,800,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. T. Sakai, S. Ohtsubo, T. Minami, and M. Terayama, Effect of bleeding on hemoglobin contents and lipid oxidation in the skipjack muscle. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (4) 1006-1008 (2006).

### (2) 口頭発表

1. 境 正・清水佑季子・桐明沙織・大坪周策. 冷凍貯蔵ブリ筋肉中のカルボニル修飾タンパク質の変動. 日本水産学会大会, 2005 年 4 月 02 日

D. M. S. ムナシンハー・河原 聡・境 正. 冷凍タラ肉中における脂質過酸化に起因するタンパク質酸化におよぼす食塩添加の影響. 日本水産学会大会, 2006 年 3 月 31 日

## 1. 魚肉保存・加工中における 4-ヒドロキシヘキセナールの生成と抑制

食品や生体組織に多く存在する高度不飽和脂肪酸（以下 PUFA）はその構造上、酸化を受けやすい。PUFA の酸化反応によって生成される過酸化脂質は、食品の味、栄養、安全性に悪影響をおよぼす。細胞膜などの生体膜に存在するリン脂質は、生体膜の流動安定性を保つために、リノール酸やアラキドン酸などの PUFA が存在するため、活性酸素種により酸化されやすい。そのため、膜構造が変化し細胞や組織に障害を起こす。また、老化をはじめとするガンや、アルツハイマー病、パーキンソン病、動脈硬化などのいろいろな疾病と過酸化脂質が関連していることを示す結果も数多く報告されている。

過酸化脂質の問題点は、過酸化脂質それ自身に毒性をもつものが多数存在するところにある。このことから、過酸化脂質の生体に与える影響は非常に大きいと考えられる。近年、活性酸素種の研究の発展にはめざましいものがあるが、その成果には生体内脂質過酸化の抑制が疾病の予防につながることを示したものが数多く含まれている。また過酸化脂質は、我々が日々摂取する食物中の脂質の過酸化により生体内で常時生成する点で、生活と密接な関係にあることは非常に重要な問題である。

脂質過酸化に関連する物質としていくつかの化合物が知られているが、特に HHE に注目して研究を行った。HHE は n-3 系脂肪酸の過酸化によって生じる不飽和アルデヒドである。これらの不飽和アルデヒドは多くの種類が存在することが確認されているが、中でもこの HHE は非常に強い細胞毒性を有することが知られており最近特に注目されているアルデヒドである。HHE はまた、さまざまな疾病と密接に関わっていることも明らかになっている。しかしながら、魚肉中の HHE に関する研究はほとんど行われていないのが現状である。魚肉は、日本人にとって馴染みの深い食品であると同時に動物性蛋白質の重要な源である。しかも、魚類を多く摂取するグリーンランド先住民は魚類を摂取しない人々に比べ血清中に n-3 系 PUFA の保有率が低く動脈硬化の発症例が極めて少ない事が知られており、n-3 系由来の成分が動脈硬化や心筋梗塞等の疾病予防に関連するとも報告されている。しかしながら、魚肉は畜肉に比べ味、風味、香り、及び栄養面での劣化が激しく加工処理や貯蔵が困難である。これは畜肉に比べ魚肉の水分含量が多いこと、ミオシン、アクトミオシン等のタンパク質がかなり不安定で変性しやすいこと、酸化されやすい PUFA を豊富に含むためである。酸化された魚油は毒性を持つという報告もあるので、PUFA の酸化を防ぐことは食品安全上重要であり、魚の HHE について研究することは食品衛生の見地から見ても非常に有意義なことである。

## 1. 1. ブリ肉中の 4-ヒドロキシヘキセナール生成

### 1. 1. 1. NaCl 添加冷凍保存実験

#### 目的

出世魚としてもよく知られるブリは、富山県の氷見や新潟県の佐渡、石川県の能登など主に北陸地域で水揚げされ地方に輸送される。刺身としてだけでなく照り焼きや煮物など様々な調理法で食される人気の高い食材であり、地域によっては郷土料理としてブリを食材に用い重宝されている。ブリは栄養の面でも優れており、脂質、タンパク質、ビタミンが豊富である。また、鉄分も多く含むために鉄分不足に陥りやすい人には血合い肉が薦められている。このように、私たち日本人にとって馴染みが深く人気も高いブリ肉の HHE の生成機構についての基本的なデータを得るために本研究を行った。

食品を塩漬けにして保存するという手法は古くから行われてきた。魚類を塩蔵すると食塩によって魚肉中の水分が溶出・除去され肉中の含水量が減少し、防腐効果を発揮する。これは食塩が食品に入り込むことで、有害な微生物の繁殖を抑え、腐るのを防ぎ、浸透圧による脱水作用などの塩の持つ性質を上手く利用したものだと考えられている。<sup>(21)</sup> しながら、NaCl には保存食品中の脂質過酸化を促進することも知られている。そこで、NaCl の添加がブリ肉の HHE の生成に与える影響を明らかにするために、まず最初に冷凍貯蔵したブリ肉中の HHE 含量の変動を測定した。なお、脂質過酸化の指標として MA の含量の変動を測定した。

#### 実験方法

##### 1) 測定用試薬

1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid (以下 DETBA) は、Aldrich Chemicals より購入した。抗酸化剤 Butyl Hydroxy Toluene (以下 BHT) は、東京化成工業より購入した。BAKERBOND speTM Silica Gel Disposable Extraction Column は、A Division of Mallinckrodt Baker, Inc. より購入した。2,4-Dinitrophenyl-hydrazine (以下 DNPH)、高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) 用の溶媒は、すべて、HPLC 用の試薬を用いた。添加物質である NaCl は和光純薬より購入した。他の試薬については、できうる限り特級を用いた。

##### 2) 試料調製

試料 (ブリ) は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.3M NaCl、0.6M NaCl、0.9M NaCl を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックに入れて $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。以上の条件で貯蔵した試料の MA、HHE 含量を 0 日目、4 週目、8 週目、12 週目、16 週目、20 週目に測定した。

##### 3) MA 含量の測定法

試料をテフロンホモジナイザーに1 g ずつ正確に秤量し、0.85% NaCl を19 ml 加えホモジネートを作成した。それを0.5 ml 栓付試験管に採取し、0.125 M リン酸バッファー (pH 3, 0.4% SDS, 10 mM DETBA, 4 mM BHT を含む) を3.5 ml 加えた。100 °Cのヒーターブロックで150 分間反応させた。反応後、氷中で冷却しながら酢酸エチルを4 ml 加え、激しく振盪した。2500 rpm で15 分間遠心分離を行い、その上清0.5 ml を共栓付試験管に採取し、エバポレーターで濃縮乾固した。これを200  $\mu$ l のメタノールで再溶解し、その20  $\mu$ l をHPLC に注入し、測定した。カラムにはInertsil ODS (5  $\mu$ m particle size 250 $\times$ 4.6 mm i. d.; GL Science) を用いた。検出波長は、Ex515 nm-Em555 nm の条件で行い、展開溶媒は、アセトニトリル:0.1 M NaCl 溶液=3:1 (V/V) を用いた。なお溶出量は、1 ml/min とした。MA 含量は、 $\mu$ mol/g tissue で示した。

#### 4) HHE 含量の測定法

試料を三角フラスコに1.5 g ずつ正確に秤量し、試料に対して0.5% BHT を添加した。この三角フラスコに2.5 mM DNPH を含んだ1M-HCl を20 ml 加え、低温(4°C)暗所で2 時間放置し、抽出と誘導化を同時に行った。反応後、濾紙で濾過し3 倍量のジクロロメタンを加えて激しく攪拌、分液漏斗を用いて、HHE -DNPH 誘導体を含む下層を、なす型フラスコに採取した。この操作を2 回繰り返し、そのなす型フラスコをエバポレーターで濃縮乾固した。得られた残渣を2 ml のクロロホルムで溶解し、あらかじめ3 ml のヘキサン:クロロホルム=2:1 (V/V) で洗浄したSilica Gel Disposable Extraction Column に注入した。注入後、ヘキサン:クロロホルム=2:1 (V/V) 混合液3 ml を2 回カラムに注入し試料を展開させHHE-DNPH 誘導体を含むバンドを分離させた。分離したバンドをクロロホルム6 ml で溶解させ、溶出液を10 ml 容共栓付褐色試験管に採取し濃縮乾固した。これを500  $\mu$ l のメタノールで再溶解しHPLC 用プレフィルターで濾過後その20  $\mu$ l をHPLC に注入し測定した。分析用のポンプには、880-PU pump (日本分光工業) を、インジェクターには7725i Injector (島津製作所)、カラムにはUltrasphere C18 (25 cm $\times$ 4.6 mm i. d. Beckman) をそれぞれ用いた。検出波長は365 nm で、検出器にはSPD-M10AVP 紫外可視検出器(島津製作所)を用いた。展開溶媒は、30 mM Sodium citrate/27.7 mM acetate buffer (pH 4.75):methanol=35:65 (V/V) を用いた。なお溶出量は1 ml/min とした。HHE 含量はnmol / g tissue で示した。

#### 5) 統計処理

結果はStudent Test とDuncan-Multiple Range Test にておこなった。すべての実験結果は平均値 $\pm$ SE ( $p < 0.05$ ) で表した。

### 結果

HHE とMA の測定結果をTable 1-1-1. に示した。

NaCl 添加区では、対照区に比べ16 週目にHHE 含量が有意に増加した。中でも0.9M NaCl 添加区では、他のNaCl 添加区と比べ8 週目にHHE 含量が有意に増加した。

Table 1-1-1 冷凍保存ブリ中の脂質過酸化における NaCl の影響

	0days	4weeks	8weeks	12weeks	16weeks	20weeks
MDA ( $\mu$ mol/g tissue)						
Control	1.84 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.08	1.65 $\pm$ 0.20	2.91 $\pm$ 0.04	2.95 $\pm$ 0.11
	a-x	a-x	a-x	a-x	a-x	a-x
0.3M	0.89 $\pm$ 0.02	2.68 $\pm$ 0.11	2.46 $\pm$ 0.29	3.22 $\pm$ 0.07	5.03 $\pm$ 0.23	5.59 $\pm$ 0.20
	a-y	bc-y	b-yz	c-y	d-y	e-y
0.6M	2.19 $\pm$ 0.03	2.07 $\pm$ 0.11	3.01 $\pm$ 0.42	2.72 $\pm$ 0.09	5.31 $\pm$ 0.30	9.72 $\pm$ 0.41
	ab-z	a-z	b-y	ab-y	c-y	d-z
0.9M	1.08 $\pm$ 0.13	1.57 $\pm$ 0.23	1.86 $\pm$ 0.16	9.40 $\pm$ 0.20	9.04 $\pm$ 0.30	8.42 $\pm$ 0.08
	a-y	ab-w	b-zx	c-y	d-z	e-w
HHE (nmol/g tissue)						
Control	0.62 $\pm$ 0.23	0.09 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$	0.10 $\pm$	0.16 $\pm$ 0.04
	a-x	b-x	c-x	0.01c-x	0.01c-x	c-x
0.3M	0.14 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.17 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.06
	a-y	a-x	a-x	a-x	b-y	b-x
0.6M	0.12 $\pm$ 0.05	0.02 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.38
	a-y	a-x	a-x	a-x	ab-y	b-x
0.9M	0.16 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.17	0.56 $\pm$ 0.17	0.51 $\pm$ 0.31
	ab-y	a-x	ab-y	ab-x	b-y	ab-x

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-e 添加量における有意差、 w-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

#### 考察

NaCl 添加区では、対照区に比べ 16 週目に HHE 含量が有意に増加した。中でも 0.9MNaCl 添加区では、他の NaCl 添加区に比べ 8 週目に HHE 含量が有意に増加した。このことから、NaCl の添加は、冷凍保存条件下でもブリ肉中の脂質過酸化を促進し、その傾向は NaCl 添加量が増加するほど顕著に表れることが明らかになった。今後、添加濃度の条件を変更し、冷凍保存中のブリ肉における NaCl 添加の影響をさらに詳しく検討する必要がある。

MA 含量の変動から見て、NaCl の添加はこれまでに報告されてきた冷蔵保存<sup>(23)</sup>だけでなく、冷凍保存の条件下でもブリ肉の脂質過酸化を促進した。

一般に食品の冷凍保存は食品の寿命、色、味、栄養価の劣化を防ぐと言われている。そのため、冒頭でも述べたように遠隔地への輸送などに頻繁に用いられており、中には半年間保存可能と示されているものも存在する。しかしながら、食品の物理的変性を引き起こす事も知られているために過度の長期保存を危惧する声も多い。今回の結果からブリ肉の

冷凍保存は12週～16週までに留めておくことが望ましいと言える。

## 1. 1. 2. NaCl 添加冷蔵保存実験

### 目的

1. 1. 1 では NaCl 添加後、冷凍保存したブリ肉の脂質過酸化について観察した。ここではブリ肉に NaCl を添加した後、家庭でよく用いられる保存法である冷蔵保存を施し HHE と MDA の変化を測定した。

### 実験方法

#### 1) 測定用試薬

添加物質は 1. 1. 1. と同じ物を使用した。その他の試薬についても 1. 1. 1. と同じ物を使用した。

#### 2) 試料調製

試料（ブリ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0. 3M NaCl、0. 6MNaCl、0. 9MNaCl を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックにいれて 4℃で冷蔵貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料の MDA、HHE 含量を 0 日目、3 日目、7 日目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) 統計処理

1. 1. 1. に述べた方法に従って行った。

### 結果

HHE と MA の測定結果を Table1-1-2. に示した。HHE 含量は対照区に比べ保存 3 日目から有意に増加した。MA 含量も HHE と同じく、対照区に比べ保存 3 日目から有意に増加した。



Table 1-1-2. 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化における NaCl の影響

Days		0	3	7
MDA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	0.34 $\pm$ 0.17 a-x	0.23 $\pm$ 0.11 a-x	0.39 $\pm$ 0.19 a-x
	0.3M	0.33 $\pm$ 0.16 a-x	0.85 $\pm$ 0.42 a-x	0.85 $\pm$ 0.42 a-x
	0.6M	0.22 $\pm$ 0.11 -x	0.90 $\pm$ 0.45 -x	0.71 $\pm$ 0.35 -x
	0.9M	0.24 $\pm$ 0.12 a-x	0.94 $\pm$ 0.47 a-x	0.73 $\pm$ 0.36 a-x
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.04 $\pm$ 0.02 a-x	0.02 $\pm$ 0.01 a-xy	0.03 $\pm$ 0.01 a-x
	0.3M	0.05 $\pm$ 0.02 a-y	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.03 $\pm$ 0.02 a-x
	0.6M	0.08 $\pm$ 0.04 -y	0.00 $\pm$ 0.00 -x	0.00 $\pm$ 0.00 -x
	0.9M	0.10 $\pm$ 0.05 a-y	0.08 $\pm$ 0.04 a-y	0.22 $\pm$ 0.11 a-x

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

### 考察

NaCl 添加区では、特に NaCl 0.9M 添加区において対照区に比べ 3 日目から HHE が有意に増加した。これまでにも報告されている通り、ここでも NaCl の添加がブリ肉の脂質過酸化を促進した。

NaCl の添加は食品を腐敗から守る重要な働きをする。しかしながら、NaCl には食品中の脂質過酸化を濃度に比例して促進する作用もある。これは、NaCl がタンパク質と結合している Fe を遊離させ、Fe イオンが触媒となり、活性酸素種が生成されるためであると考えられている。ブリ肉には鉄分が多く含まれるため、NaCl 添加区において対照区に比べ脂質過酸化の影響が顕著に表れたのだと考えている。

HHE の生成が n-3 系脂肪酸に由来していることはすでに報告されている。<sup>(24)</sup> 多価不飽和脂肪酸である n-3 系脂肪酸、n-6 系脂肪酸には必須脂肪酸が含まれ多くの生理活性物質の原料となるため、身体の維持のために決して欠かすことができない。さらに、近年多価不飽和脂肪酸の生理活性機能に注目が集まり、過剰に摂取する傾向にある。n-3 系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)が魚油に多く存在することは周知の事実で、今後、HHE の生成に関して、ブリ以外の魚類でもさらに検討していく必要がある。

### 1. 1. 3. NaCl-EDTA 添加、冷蔵保存実験

#### 目的

1. 1. 1 および 1. 1. 2 の結果より、NaCl の添加がブリ肉の脂質過酸化を促進することが分かった。ここでは、NaCl の添加によって遊離した Fe イオンを EDTA のキレート作用で取り込み、ブリ肉の脂質過酸化を抑制することができるかどうかについて検討するため、HHE と MA の変化を測定した。EDTA の効果をより明確にするため、NaCl 添加区、NaCl-EDTA 添加区の測定も行った。

#### 実験方法

##### 1) 測定用試薬

添加物質である EDTA は和光純薬より購入した。その他の試薬は 1. 1. 1 と同じ物を使用した。

##### 2) 試料調製

試料（ブリ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0. 6M NaCl、1mMEDTA、0. 6MNaCl と 1mMEDTA の混合物を添加したものとに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックに入れて 4℃で冷蔵貯蔵した。以上の条件で保存した試料の MA、HHE 含量を 0 日目、3 日目、7 日目に測定した。

##### 3) MA 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

##### 4) HHE 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

##### 5) 統計処理

1. 1. 1 に述べた方法に従って行った。

#### 結果

HHE と MA の測定結果を Table1-1-3 に示した。

0. 6MNaCl 添加区、1mMEDTA 添加区、並びに 0. 6MNaCl ・ 1mMEDTA 混合物添加区では対照区と比べ 3 日目に HHE 含量が有意に増加した。0. 6MNaCl 添加区、1mMEDTA 添加区、並びに 0. 6MNaCl ・ 1mMEDTA 混合物添加区間には HHE 含量の有意差が見られなかった。

NaCl 添加区では、対照区と 1mMEDTA 添加区、NaCl ・ 1mMEDTA 添加区に比べ MA 含量が有意に増加し脂質過酸化を促進した。1mMEDTA 添加区、NaCl ・ 1mMEDTA 添加区では対照区、NaCl 添加区と比較して脂質過酸化が抑制された。

Table 1-1-3 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化における EDTA の影響

Days		0	3	7
MDA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	0.53 $\pm$ 0.03 a-x	0.64 $\pm$ 0.03 b-x	0.79 $\pm$ 0.06 c-x
	0.6M NaCl	0.59 $\pm$ 0.02 a-x	1.25 $\pm$ 0.00 b-y	1.65 $\pm$ 0.09 b-x
	1mMEDTA	0.12 $\pm$ 0.00 a-x	0.10 $\pm$ 0.00 b-xy	0.12 $\pm$ 0.00 b-x
	0.6M NaCl+1mMEDTA	0.10 $\pm$ 0.01 a-x	0.09 $\pm$ 0.00 b-y	0.14 $\pm$ 0.01 c-x
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.04 $\pm$ 0.02 a-x	0.03 $\pm$ 0.01 a-x	0.07 $\pm$ 0.03 a-x
	0.6M NaCl	0.06 $\pm$ 0.03 a-x	0.10 $\pm$ 0.05 a-x	0.18 $\pm$ 0.09 a-x
	1mMEDTA	0.10 $\pm$ 0.05 a-x	0.08 $\pm$ 0.04 a-x	0.17 $\pm$ 0.08 a-x
	0.6M NaCl+1mMEDTA	0.07 $\pm$ 0.03 a-x	0.12 $\pm$ 0.06 a-x	0.23 $\pm$ 0.11 a-x

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

### 考察

0.6MNaCl・1mMEDTA 混合物添加区では対照区と比較して3日目にHHE含量が有意に増加した。また、0.6MNaCl 添加区、1mMEDTA 添加区でも同じ傾向が表れた。今回の条件において、EDTAの添加はブリ肉におけるHHEの生成を抑制することが確認できなかった。脂質過酸化が進行した理由として、EDTA添加濃度が高すぎた、EDTAが遊離したFeイオンとうまく錯体を形成できなかったなど様々な理由が考えられるが、現段階ではっきりとした原因を挙げることはできない。

一方、NaCl 添加区では、対照区と1mMEDTA 添加区、NaCl・1mMEDTA 添加区に比べMA含量が有意に増加し脂質過酸化を促進した。1mMEDTA 添加区、NaCl・1mMEDTA 添加区では対照区、NaCl 添加区と比較して脂質過酸化が抑制された。このことから、EDTAの添加がブリ肉におけるMAの生成を抑制することが分かった。HHEの分析ではEDTAの影響を確認することができずMAの分析でのみ確認された理由として、MAが脂肪酸酸化の最終産物であり、安定であることが考えられる。

EDTAの抗酸化作用に関する研究は多く行われており、食品中の成分を取り込むのに有用な報告がされている。そのため、今後も添加濃度を変え、同様の実験を繰り返し、EDTAの添加が魚肉に与える影響を検討する必要がある。

#### 1. 1. 4. 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化に対する $\alpha$ -トコフェロールの影響

##### 目的

脂質過酸化を抑制することが知られている $\alpha$ -トコフェロール添加がブリ肉貯蔵中における脂質過酸化に及ぼす影響を調べた。

##### 実験方法

###### 1) 試薬

$\alpha$ -トコフェロールは和光純薬製のものを用いた。他の試薬は 1. 1. 1. で用いたものを使用した。

###### 2) 試料

試料（ブリ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.01, 0.05, 0.1% $\alpha$ -トコフェロール（和光純薬）を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した後ポリエチレンバックに入れて4°Cで貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料の MA, HNE および CP 含量を 0, 2, 4, 6 日目に測定した。

###### 3) MA 含量の測定方法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

###### 4) CP 含量の測定方法

試料をテフロンホモジナイザーに 1 g ずつ正確に秤量し、50mM Tris-HCl (1mM EDTA を含む) を 20ml 加えホモジネートを作成し、4°C、10000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。上清を栓付試験管 2 本に 3.5ml ずつ採取し、10%トリクロロ酢酸を 3.5ml 加え、2000rpm で 15 分間遠心分離を行い、蛋白質を沈殿させ上清を除去した。一方の栓付試験管には、2N-HCl のみを、もう一方には 10mM DNPH を含んだ 2N-HCl を 5ml ずつ加え、15°C に調整した恒温槽で 5~10 分おきに攪拌しながら 1 時間反応させた。反応後、2000rpm で 15 分間遠心分離を行い、上清を除去した。その沈殿物にエタノール-酢酸エチル(1:1)混合液を 5ml 加え洗浄し、2000rpm で分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返して行った。沈殿した蛋白質に 8M 尿素を 3.5ml 加え、再溶解させた。吸光度は UV-1200 分光光度計(島津製作所)で測定した。カルボニル残基含量は、ガラスセルを用いて 360nm で測定した。そし

て、 $22000^{-1}$  のモル吸光度係数を用いて、nmol/mg protein で算出した。Protein 量はプラスチックセルを用い、595nm で PAK を使用して測定した。

#### 5) HHE 含量の測定方法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 結果

結果を Table 1-1-4 に示した。MDA の測定結果は 0.1%  $\alpha$ -トコフェロールを添加したものが 2, 4, 6 日目において control と比較して有意に高い値を示した。CP の測定結果はどれも有意差が見られなかった。HHE の測定結果は 0.05%  $\alpha$ -トコフェロールを添加したものが 2 日目、0.1%  $\alpha$ -トコフェロールを添加したものが 2, 4 日目に control と比較して有意に高い値を示した。さらに、MDA は 2 日目以降、HHE は 4 日目以降減少傾向が見られた。

Table 1-1-4 冷蔵保存ブリの脂質酸化における  $\alpha$ -トコフェロールの影響

	Days	0	2	4	6
MA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	5.14 $\pm$ 0.11 <sup>a,x</sup>	6.55 $\pm$ 0.64 <sup>a,y</sup>	4.81 $\pm$ 0.14 <sup>a,x</sup>	4.54 $\pm$ 0.35 <sup>a,x</sup>
	0.01%	5.14 $\pm$ 0.11 <sup>a,x</sup>	7.30 $\pm$ 0.26 <sup>a,y</sup>	4.54 $\pm$ 0.58 <sup>a,x</sup>	4.66 $\pm$ 0.21 <sup>ab,x</sup>
	0.05%	5.14 $\pm$ 0.11 <sup>a,x</sup>	7.48 $\pm$ 0.11 <sup>a,y</sup>	5.73 $\pm$ 0.50 <sup>ab,x</sup>	3.96 $\pm$ 0.40 <sup>a,z</sup>
	0.1%	5.14 $\pm$ 0.11 <sup>a,x</sup>	11.81 $\pm$ 0.34 <sup>b,y</sup>	6.85 $\pm$ 0.20 <sup>b,z</sup>	5.65 $\pm$ 0.31 <sup>b,x</sup>
CP (nmol/mg protein)	Control	1.08 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>	1.36 $\pm$ 0.15 <sup>a,x</sup>	1.32 $\pm$ 0.06 <sup>ab,x</sup>	1.64 $\pm$ 0.34 <sup>a,x</sup>
	0.01%	1.08 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>	1.39 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>	1.13 $\pm$ 0.31 <sup>a,x</sup>	1.07 $\pm$ 0.24 <sup>a,x</sup>
	0.05%	1.08 $\pm$ 0.04 <sup>a,xy</sup>	1.97 $\pm$ 0.34 <sup>a,x</sup>	2.16 $\pm$ 0.43 <sup>b,x</sup>	0.79 $\pm$ 0.33 <sup>a,y</sup>
	0.1%	1.08 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>	1.38 $\pm$ 0.12 <sup>a,x</sup>	1.80 $\pm$ 0.20 <sup>ab,x</sup>	1.82 $\pm$ 0.85 <sup>a,x</sup>
HHE (nmol/g tissue)	Control	ND <sup>a,x</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a,x</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a,x</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a,y</sup>
	0.01%	ND <sup>a,x</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a,y</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a,z</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>ab,z</sup>
	0.05%	ND <sup>a,x</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>b,y</sup>	0.15 $\pm$ 0.03 <sup>a,y</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>b,xy</sup>
	0.1%	ND <sup>a,x</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>c,yz</sup>	0.28 $\pm$ 0.06 <sup>b,y</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>ab,z</sup>

平均値 $\pm$ SE (n=3), a-d 添加量における有意差, x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

#### 考察

$\alpha$ -トコフェロールは生体内で脂質過酸化を予防し、動脈硬化や細胞膜の酸化を防いでいるビタミンである。したがって、本研究においてもそのような結果が見られると思われたが、実際には MA および HHE の測定結果からみて、脂質過酸化を促進した。生体内で  $\alpha$ -トコフェロールは自身が酸化されて安定なラジカルになることで脂質過酸化を抑えている。

さらに酸化された $\alpha$ -トコフェロールラジカルをアスコルビン酸が還元することで脂質過酸化を抑制するサイクルを形成している。したがって、安定な $\alpha$ -トコフェロールラジカルが何らかの理由で活性化されて脂質過酸化が進行したと考えられる。今後は $\alpha$ -トコフェロールとアスコルビン酸両方を添加した実験系で脂質過酸化を抑えるかどうかを検証する必要がある。

MA および HHE が一度増加してその後減少したことについては、時間の経過により分解されて減少したためと考えられる。

## 1. 1. 5. 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化に及ぼす NaCl および天然塩の影響

### 目的

食品加工や保存においてなくてはならない NaCl および天然塩を添加したブリ肉を保存したときの脂質過酸化の変動について明らかにする。

### 実験方法

#### 1) 試薬

1.1.1. と同様の試薬を用いた。

#### 2) 試料

試料（ブリ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.6M NaCl (和光純薬) と 0.6M 天然塩を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した後ポリエチレンバックにいれて 4°C で貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料の MA, HNE および CP 含量を 0, 3, 7, 10 日目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定方法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) CP 含量の測定方法

1.1.4 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) HHE 含量の測定方法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

### 結果

結果を Table 1-1-5 に示した。MA の測定結果は 0.6M NaCl を添加したものが 10 日目、0.6M 天然塩を添加したものでは 3, 7, 10 日目において control と比較して有意に高い値を示した。また 0.6M 天然塩を添加したものは 0.6M NaCl を添加したものよりも有意に高い値を示した。CP の測定結果は 0.6M NaCl を添加したものが 10 日目、0.6M 天然塩を添加したものでは 7, 10 日目において control と比較して有意に高い値を示した。また、10 日目において 0.6M 天然塩を添加したものは 0.6M NaCl を添加したものよりも有意に高い値を

示した。HHE の測定結果は 0.6M NaCl を添加したものが 10 日目、0.6M 天然塩を添加した  
ものでは 7, 10 日目において control と比較して有意に高い値を示した。また、7, 10 日目  
において 0.6M 天然塩を添加したものは 0.6M NaCl を添加したものよりも有意に高い値を  
示した。

## 考察

NaCl による脂質過酸化の増加は以前からよく報告されていることであり、ヘムタンパク  
質などの金属を含む生体内物質から金属イオンを遊離させることでその金属イオンが脂質  
過酸化を促進する。本研究で天然塩が脂質過酸化を促進した。この天然塩には硫化イオウ、  
カルシウム、マグネシウム、カリウムがふくまれている。KCl は脂質過酸化を促進する報告  
があるため NaCl よりも天然塩のほうが脂質過酸化を促進したのではないかと考えられる。

Table 1-1-5. 冷蔵保存ブリの脂質酸化における NaCl の影響

Days		0	3	7	10
MA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	1.56 $\pm$ 0.02 <sup>a,x</sup>	2.20 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>	1.58 $\pm$ 0.12 <sup>a,x</sup>	2.40 $\pm$ 0.04 <sup>a,y</sup>
	0.6M NaCl	1.42 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>	1.97 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>	1.79 $\pm$ 0.02 <sup>ab,y</sup>	2.81 $\pm$ 0.07 <sup>a,z</sup>
	0.6M 天然塩	1.81 $\pm$ 0.05 <sup>a,x</sup>	2.69 $\pm$ 0.07 <sup>b,y</sup>	2.06 $\pm$ 0.14 <sup>a,x</sup>	3.62 $\pm$ 0.10 <sup>c,z</sup>
CP (nmol/mg protein)	Control	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>	0.89 $\pm$ 0.05 <sup>a,y</sup>	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>a,x</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>a,x</sup>
	0.6M NaCl	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>a,x</sup>	0.80 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>ab,x</sup>	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>
	0.6M 天然塩	0.63 $\pm$ 0.01 <sup>b,x</sup>	0.81 $\pm$ 0.12 <sup>a,x</sup>	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>b,y</sup>	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>c,x</sup>
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.20 $\pm$ 0.09 <sup>a,x</sup>	0.69 $\pm$ 0.13 <sup>a,y</sup>	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>	0.62 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>
	0.6M NaCl	0.79 $\pm$ 0.12 <sup>b,x</sup>	0.86 $\pm$ 0.09 <sup>a,x</sup>	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>a,x</sup>	1.20 $\pm$ 0.10 <sup>b,y</sup>
	0.6M 天然塩	0.93 $\pm$ 0.11 <sup>b,x,y</sup>	0.72 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>	1.05 $\pm$ 0.07 <sup>b,y</sup>	1.70 $\pm$ 0.06 <sup>c,z</sup>

平均値 $\pm$ SE (n=3), a-d 添加量における有意差, w-z 保存日数における有意差 (P<0.05)



## 1. 1. 6. カテキン添加、冷蔵保存実験

### 目的

ポリフェノールとは植物が光合成を行うときに作られる物質の総称で、これまでにおよそ 5,000 種類が知られている。ほとんどの植物に含まれておりカテキン(catechin)もポリフェノールの一種である。カテキンの研究も多く行われており、抗酸化作用やなど多くの機能を持つことが知られている。さらに近年ではカテキンが動脈硬化の防止にもつながることが報告されている。

そこで、カテキンの添加がブリ肉の脂質過酸化に与える影響を明らかにするために HHE と MA の変化を測定した。カテキン混合物を添加した時の結果と、カテキンの成分でもあるエピガロカテキンガレート添加した時の結果から、その効果を比較した。

### 実験方法

#### 1) 測定用試薬

添加物質は和光純薬より購入した。その他の試薬は 1.1.1 と同じ物を使用した。

カテキン混合物の内容量は下記の通りである。

エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート混合物で 85%以上を占め、混合物の内訳はエピガロカテキンガレート 70.4%、エピカテキンガレート 21.9%、エピカテキン 5.6%、エピガロカテキン 1.1%である。

#### 2) 試料調製

試料（ブリ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.1%添加区、0.2%添加区、0.5%添加区とに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックにいれて 4℃で冷蔵貯蔵した。以上の条件で保存した試料の MDA, HHE 含量を 0 日目、3 日目、7 日目に測定した。

エピガロカテキンガレートを添加したときは、試料をフードプロセッサーで細かく刻んだあと、Control 区と 0.5%添加区に分けあとは同様に行った。

#### 3) MA 含量の測定法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE 含量の測定法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) 統計処理

1.1.1 に述べた方法に従って行った。

## 結果

カテキン混合物を添加したときの HHE と MA の測定結果を Table1-1-6 に示した。HHE 含量は各試験区で有意差が認められなかった。0.2%カテキン添加区では、対照区、0.1%添加区、0.5%添加区と比較して3日目に MA 含量が有意に低下した。

Table 1-1-6. 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化におけるカテキン混合物の影響

	Days	0	3	7
MA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	0.45 $\pm$ 0.05 a-x	0.70 $\pm$ 0.07 b-x	0.88 $\pm$ 0.03 b-x
	0.1%	0.68 $\pm$ 0.04 a-y	0.62 $\pm$ 0.03 a-x	0.90 $\pm$ 0.05 b-x
	0.2%	0.59 $\pm$ 0.06 a-y	0.37 $\pm$ 0.07 b-y	0.40 $\pm$ 0.02 ab-y
	0.5%	0.74 $\pm$ 0.06 ab-y	0.58 $\pm$ 0.02 a-x	0.85 $\pm$ 0.06 b-x
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.02 $\pm$ 0.01 a-x	0.21 $\pm$ 0.10 a-x	0.08 $\pm$ 0.04 a-x
	0.1%	0.06 $\pm$ 0.03 a-x	0.13 $\pm$ 0.06 a-x	0.05 $\pm$ 0.02 a-x
	0.2%	0.19 $\pm$ 0.09 a-x	0.07 $\pm$ 0.03 a-x	0.08 $\pm$ 0.04 a-x
	0.5%	0.14 $\pm$ 0.07 a-x	0.08 $\pm$ 0.04 a-x	0.04 $\pm$ 0.02 a-x

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

エピガロカテキンガレート添加したときの HHE と MA の測定結果を Table1-1-7. に示した。対照区と比べてエピガロカテキンガレート添加区の HHE 含量が7日目に有意に低下した。対照区と比べてエピガロカテキンガレート添加区の MA 含量が7日目に有意に低下した。

Table 1-1-7. 冷蔵保存ブリ中の脂質過酸化におけるエピガロカテキンガレート標品の影響

	Days	0	3	7
MA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	3.71 $\pm$ 1.85 a	3.12 $\pm$ 1.56 a	12.5 $\pm$ 6.26 a
	0.5%	3.71 $\pm$ 1.85 a	3.48 $\pm$ 1.74 a	3.71 $\pm$ 1.85 a
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.01 $\pm$ 0.00 a	0.20 $\pm$ 0.01 b
	0.5%	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.12 $\pm$ 0.06 b

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差 (P<0.05)

## 考察

合成酸化剤の毒性が認められ使用禁止となったために、これらの抗酸化剤に代わる、優れた天然抗酸化剤の研究が多く行われている。カテキン類もその一種で、抗酸化作用など多くの機能を持つことが既に知られている。

今回、カテキン混合物の添加では脂質過酸化に与える影響を観察することができなかった。しかし一方で、エピガロカテキンガレートの添加では脂質過酸化を抑制することが分

かった。カテキン類には多くの種類が存在し、隣あう3つのフェノール性水酸基からなるトリオール構造を有する化合物の方が、*o*-位に存在する2つのフェノール性水酸基からなる*o*-ジオール構造を有する化合物より抗酸化作用が強いことが知られている。今回用いたエピガロカテキンガレートは化合物内にトリオール構造を2つ有しており、その強い抗酸化力で脂質過酸化を抑制し、カテキン混合物の添加では見られなかった効果を示したと考えられる。

## 1. 2. タイ肉中の 4-ヒドロキシヘキサナール生成

### 1. 2. 1. NaCl 添加冷蔵保存実験

#### 目的

タイは鮮やかな体色、見た目のよさ、上品な味などどれをとっても他の魚より優れているため、日本では古く江戸時代から高級魚として大切にされてきた。脂質が少ないうえにアミノ酸がバランスよく含まれており、分解されにくいイノシン酸を含むため鮮度が落ちても味は変わりにくいのが特徴である。タイの調理はその美しい色と姿形を生かした調理法が多いのが有名だが、それだけでなく煮物、焼き物、蒸し物、鍋物、など多彩な料理に使われている。このように私たち日本人にとって馴染みが深く人気も高いタイ肉 HHE 生成機構について基本的なデータを得るために本研究を行った。

ここでは 1.1.1 と同じように NaCl の添加がタイ肉の HHE 生成に与える影響を明らかにするために HHE 含量の変動を経時的に測定した。なお、脂質過酸化の指標として MA 含量の変化も測定した。

#### 実験方法

##### 1) 試薬

試薬は 1.1.1 と同じ物を使用した。

##### 2) 試料調製

試料（タイ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.3M NaCl、0.6MNaCl、0.9MNaCl を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックにいれて 4°C で冷蔵保存した。以上の条件で貯蔵した試料の MA、HHE 含量を 0 日目、3 日目、7 日目に測定した。

##### 3) MA 含量の測定法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

##### 4) HHE 含量の測定法

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

##### 5) 統計処理

1.1.1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 結果

HHE と MA の測定結果を Table1-2-1. に示した。いずれの NaCl 添加区も対照区に比べ有意差は見られなかった。

Table 1-2-1. 冷蔵保存タイ中の脂質過酸化における NaCl の影響

	Days	0	3	7
MA ( $\mu$ mol/g tissue)	Control	3.92 $\pm$ 1.96 a-x	5.03 $\pm$ 2.51 a-x	6.41 $\pm$ 3.20 a-x
	0.3M	3.83 $\pm$ 1.91 a-x	7.72 $\pm$ 3.86 a-x	6.27 $\pm$ 3.13 a-x
	0.6M	6.14 $\pm$ 3.07 a-x	4.91 $\pm$ 2.45 a-x	6.05 $\pm$ 3.02 a-x
	0.9M	6.81 $\pm$ 3.40 a-x	4.69 $\pm$ 2.34 a-x	6.01 $\pm$ 3.05 a-x
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.08 $\pm$ 0.04 a-x	0.07 $\pm$ 0.04 a-x
	0.3M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.13 $\pm$ 0.06 a-x	0.14 $\pm$ 0.06 a-x
	0.6M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.36 $\pm$ 0.18 a-x	0.29 $\pm$ 0.10 a-x
	0.9M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.27 $\pm$ 0.13 a-x	0.23 $\pm$ 0.09 a-x

平均値 $\pm$ SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

#### 考察

今回、タイ肉における NaCl 添加の影響を確認することができなかった。これはタイ肉に脂質が少ないことが原因ではないかと考えており、今後、添加濃度を変えてさらに分析を行う必要がある。

## 1. 2. 2. NaCl 添加冷凍保存実験

### 目的

NaCl の添加によって食肉中の脂質過酸化が促進されることは良く知られている。Kanner らは七面鳥筋肉組織への NaCl 添加実験の結果から、NaCl がタンパク質とキレート結合している Fe を遊離させ、Fe イオンが生じ、これが触媒となって、ラジカルが生成すると報告している。また、魚肉組織においても NaCl を加えると脂質過酸化が促進され、Fe を加えた場合にも同様の結果が得られることが確認されている。そこで、NaCl を添加した加工食品に多く利用されるタイについて、NaCl が脂質過酸化に与える影響を調査することを目的として本実験を行なった。

### 実験方法

#### 1) 試薬

試薬は 1.1.1. と同じ物を使用した。

#### 2) 試料

試料 (タイ) は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と NaCl (和光純薬) を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した後ポリエチレンバックに入れて冷凍保存した。以上の条件で保存した試料の MDA および HHE 含量を 0, 4, 8, 12, 16, 20 週目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE 含量の測定法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

### 結果

結果を Table 1-2-2 に示した。

0.6 および 0.9M 添加区において、MA 含量は 12, 16 週目に増加し、20 週目に減少した。HHE 含量は 8 週目で減少したが 0.6 および 0.9M 添加区において、20 週目に再び増加した。

Table 1-2-2. 冷凍保存タイ中の脂質過酸化における NaCl の影響

	Weeks	0	4	8	12	16	20
MA	control	0.40±0.23	0.07±0.02	0.04±0.02	0.88±0.44	0.31±0.15	0.41±0.21
	0.3M						
	NaCl	0.08±0.04	0.16±0.08	0.17±0.08	0.50±0.25	0.20±0.10	0.23±0.12
	0.6M						
	NaCl	0.31±0.17	0.18±0.09	0.22±0.11	0.75±0.38	0.59±0.29	0.22±0.11
	0.9M						
	NaCl	0.33±0.19	0.03±0.02	0.08±0.04	0.28±0.14	0.30±0.15	0.69±0.34
HHE	control	0.10±0.05	0.44±0.02	0.03±0.01	n.d.	n.d.	0.07±0.02
	0.3M						
	NaCl	0.42±0.01	0.34±0.04	0.0±0.01	n.d.	0.01±0.01	0.03±0.02
	0.6M						
	NaCl	0.23±0.03	0.49±0.10	0.03±0.01	n.d.	0.01±0.01	0.25±0.01
	0.9M						
	NaCl	0.55±0.03	0.54±0.13	0.03±0.02	n.d.	0.01±0.01	0.34±0.13

### 考察

以上の結果により、0.6 および 0.9M 添加区では MA、HHE および CP の生成に影響を与えていると考えられる。NaCl は鉄イオンをミオグロビンなどの鉄と結合しているタンパク質から解離させることで脂質過酸化を促進するという研究が報告されている。イワシやカツオなどの赤身魚が普通肉に占めるヘム色素の含量は 100g あたり 140mg-170mg であるのに対し、タイが普通肉に占めるヘム色素の含量は 100g あたり 6mg であった。ヘム色素の活性のためには鉄が必要である。タイはヘム色素をあまりもたない白身魚であると同時に、不安定な脂質である不飽和脂肪酸も少ないので、NaCl 添加による脂質過酸化がみられなかったのだろう。

HHE は 8 週目に著しい減少がみられたが、20 週目には再び増加した。これは HHE が非常に不安定で反応性が高い物質であるために、酸化が進み、他のアルデヒドに変化し減少し、さらに MDA、CP がふたたび HHE に変化したため増加したと考えられる。

## 1. 2. 3. タイ肉の脂質過酸化に及ぼす $\alpha$ -トコフェロール添加の影響

### 目的

食品中における脂質過酸化は味、栄養、安全性に悪影響を与える。ビタミンEが食用油の過酸化による変敗を防ぐことは古くから知られており、また生体内においても脂質、特に膜脂質の抗酸化が第1義的な作用とされている。タイ肉の脂質過酸化に及ぼす抗酸化物質である $\alpha$ -トコフェロール添加の影響を明らかにするために、貯蔵中のマロンジアルデヒド (MDA)、4-ヒドロキシ2-ヘキセナール (HHE) およびカルボニル修飾プロテイン (CP) 含量を経時的に測定した。

### 実験方法

#### 1) 試薬

$\alpha$ -トコフェロールは和光純薬製のものを用いた。その他の試薬は 1.1.1. と同じ物を使用した。

#### 2) 試料

試料 (タイ) は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と  $\alpha$ -トコフェロール (和光純薬) を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した後ポリエチレンバックにいれて 4°C で貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料の MDA, HHE および CP 含量を 0, 3, 7 日目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定方法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) CP 含量の測定方法

1.1.4. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) HHE 含量の測定方法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

### 結果

#### 1) MA

各サンプルを保存日数ごとで比較すると、保存 0 日目はそれぞればらついた値を示した。



保存3日目では0.03%、0.05% $\alpha$ -トコフェロール添加区がコントロール区、0.1% $\alpha$ -トコフェロール添加区に対して有意に低い値を示した。保存7日目には有意な差は見られなかった。次に $\alpha$ -トコ添加濃度ごとに比較すると0.1% $\alpha$ -トコフェロール添加区ではMDA含量が低下しているが、有意差は見られなかった。0.03% $\alpha$ -トコフェロール添加区では7日目にMDA含量の有意な増加は見られたが、その他添加区ではMDA含量の有意な増減は見られなかった。

保存0日目では各区間に有意な差は見られなかった、保存3、7日目では0.1% $\alpha$ -トコフェロール添加区がコントロール区、0.03% $\alpha$ -トコフェロール添加区に比べ、有意に低い値を示した。また0.1% $\alpha$ -トコフェロール添加区ではHHE含量の有意な増減は見られなかったが、control、0.03% $\alpha$ -トコフェロール添加区、0.05% $\alpha$ -トコフェロール添加区では保存7日目が保存0、3日目に比べHHE含量の有意な増加が見られた。

### 3)CP

保存0日目のCP含量を比較するとそれぞれ大きなばらつきが見られた。コントロール区では保存0、7日目に有意差はないが、保存3日目は保存0、7日目に対して有意な減少が見られた。0.03%、0.1% $\alpha$ -トコフェロール添加区では保存0、3日目に対して保存7日目はCP含量の有意な増加が見られた。0.05% $\alpha$ -トコフェロール添加区では保存0日目から保存7日目まで有意なCP含量の増加が見られた。

### 考察

コントロール区と各 $\alpha$ -トコフェロール添加区でMDA含量の有意な増減は見られないことから、 $\alpha$ -トコフェロール添加は保存中のタイ肉のMDA生成に大きな影響を与えないと考えられる。

低濃度(0.03%、0.05%)の $\alpha$ -トコフェロール添加はHHEの生成を有意に抑制しなかったが、高濃度(0.1%)の $\alpha$ -トコフェロール添加によりHHEの生成は抑制された。他の指標の生成には有意な抑制は見られなかった。CPはコントロール区でCP含量の有意な増減が見られ、保存中にCPの分解と生成が行われていると考えられる。しかし $\alpha$ -トコ添加区ではCP含量の有意な増加は見られるが、有意な低下は見られないことから、CPの分解は抑制されるが、CPの生成は抑制されていない、またはCPの分解は抑制されていないが、CPの生成が促進されていると考えられる。

タイはもともと脂質の少ない魚である。そのため $\alpha$ -トコフェロール添加はタイ肉の脂質過酸化に及ぼす影響が小さいと考えられる。そのため $\alpha$ -トコフェロール添加がタイ肉の脂質過酸化に及ぼす影響についてより詳細な研究が必要と考えられた。

Table 1-2-3. 冷蔵保存タイ中の脂質過酸化における $\alpha$ -トコフェロール添加の影響

Day	0	3	7
<b>MA</b>			
control	1.00±	1.01±0.04	1.11±0.03
0.03%	0.90±	0.87±0.03	1.08±0.03
0.05%	0.73±0.09	0.81±0.04	0.91±0.13
0.10%	1.17±0.03	1.05±0.03	1.03±0.07
<b>HHE</b>			
control	0.09±0.07	0.07±0.02	0.14±0.05
0.03%	nd.	0.16±0.05	0.02±0.01
0.05%	nd.	0.72±0.35	0.50±0.27
0.10%	nd	0.63±0.23	0.10±0.03
<b>CP</b>			
control	0.60±0.20	0.68±0.28	0.81±0.08
0.03%	0.54±0.20	0.78±0.20	4.07±2.14
0.05%	0.62±0.04	1.00±0.40	1.52±0.39
0.10%	0.49±0.15	0.54±0.09	0.79±0.13

## 1. 3. サンマ肉中の 4-ヒドロキシヘキサナール生成

### 1. 3. 1. NaCl 添加冷蔵保存実験

#### 目的

秋の味覚として人気が高いサンマは、EPA や DHA の脂肪分を多く含むことでもまた知られている。それだけでなくタンパク質やビタミンも豊富に存在するため、旬の季節になると多くの方が口にする人気の食材である。サンマもまた刺身やタタキなどさまざまな調理法が存在するが、最も有名なのはやはり塩焼きである。最近では、直接市場で食材を手にすることができない消費者のためにあらかじめ調理されたサンマを提供するサービスも存在する。このように私たちにとって馴染みが深く人気も高いサンマ肉の HHE 生成機構について基本的なデータを得るために本研究を行った。

ここでは第 1 章・第 1 節と同じように、HHE 生成に与える影響を明らかにするために HHE 含量の変動を経時的に測定した。なお、脂質過酸化の指標として MA 含量の変化も測定した。

#### 実験方法

##### 1) 測定用試薬

試薬は 1.1.1. と同じ物を使用した。

##### 2) 試料調製

試料（サンマ）は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と 0.3M NaCl、0.6MNaCl、0.9MNaCl を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した。その後ポリエチレンバックにいれて 4℃で冷蔵保存した。以上の条件で貯蔵した試料の MA、HHE 含量を 0 日目、3 日目、7 日目に測定した。

##### 3) MA 含量の測定法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

##### 4) HHE 含量の測定法

1.1.1. に述べた方法に従って実験を行った。

##### 5) 統計処理

1.1.1. に述べた方法に従って分析した。

#### 結果

HHE と MA の測定結果を Table1-3. に示した。いずれの NaCl も対照区に比べ有意差は見られなかった。

Table 1-3. 冷蔵保存サンマ中の脂質過酸化における NaCl の影響

Days		0	3	7
MDA ( $\mu\text{mol/g tissue}$ )	Control	0.24 $\pm$ 0.12 a-x	0.26 $\pm$ 0.13 a-x	0.44 $\pm$ 0.22 a-x
	0.3M	0.26 $\pm$ 0.13 a-x	0.43 $\pm$ 0.21 a-x	1.18 $\pm$ 0.59 a-x
	0.6M	0.17 $\pm$ 0.08 a-x	0.37 $\pm$ 0.18 a-x	0.72 $\pm$ 0.36 a-x
	0.9M	0.28 $\pm$ 0.14 a-x	0.54 $\pm$ 0.27 a-x	0.74 $\pm$ 0.37 a-x
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.01 $\pm$ 0.00 b-x	0.00 $\pm$ 0.00 a-x
	0.3M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.01 $\pm$ 0.00 a-x	0.01 $\pm$ 0.00 a-xy
	0.6M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.00 $\pm$ 0.00 ab-x	0.02 $\pm$ 0.01 a-xy
	0.9M	0.00 $\pm$ 0.00 a-x	0.00 $\pm$ 0.00 ab-x	0.05 $\pm$ 0.02 b-y

平均値 $\pm$ SE (n=4)、a-c 添加量における有意差、x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

#### 考察

サンマにおいても NaCl 添加の影響は明らかではなかった。

今回はいずれも秋頃に実験を行った。旬のサンマは、脂肪が約16%と他の魚よりも多く、酸化されやすい。また、取れた時期、場所、群れによって脂肪の含有量が異なり、味に差が出る。そのため、今回安定した結果を得る事ができなかったのはこうした不安定な要因が原因ではないかと考えている。また、サンマは8月頃から水揚げが解禁され餌を食べながら南下するため、主要な水揚げ漁港は北海道口花咲(根室)、釧路、厚岸、三陸など北国が多い。そのため、宮崎の漁港には一度冷凍し輸送されている。近年、冷凍保存技術が向上していると言われるが、第1章第1節でも述べた通り、魚類の冷凍保存は脂質過酸化に影響を与えることが示唆されている。サンマに関しても冷凍保存条件が与える影響を検討する必要がある。

#### 1. 4. 総括

魚肉は、その栄養価の高さと相まって様々な加工を施され日本人の食生活に密着してきた。また、冷凍技術や輸送技術が向上し、遠隔地で水揚げされた魚でもよい状態で口にすることが可能となり、海沿い、内陸を問わず日本全国であらゆる魚が流通するようになった。これまで、魚の入手が難しかった地域では、食塩を用いる塩蔵法が食品の保存法として伝統的に重宝されてきた。輸送技術の向上により内陸の地域でも新鮮な魚を入手することができるようになったが、食品を腐敗から守る塩蔵法は今でも身近な食品の保存法として利用されている。しかしながら、塩蔵法は、腐敗を防ぐ一方で、食塩の主成分である NaCl が脂質過酸化を促進するということが報告されている。

ブリ肉に NaCl を添加したところ、冷凍条件下でも冷蔵条件下でも HHE の生成と MA の生成が確認され、NaCl の添加がブリ肉の脂質過酸化を促進することが分かった。冷凍保存条件下では NaCl 添加区で、対照区に比べ 16 週目に HHE 含量が有意に増加した。中でも 0.9MNaCl 添加区では、他の NaCl 添加区に比べ 8 週目に HHE 含量が有意に増加し、添加量の増加により脂質過酸化が促進されることが分かった。今回の結果から、ブリ肉の脂質過酸化は保存期間と添加量の増加に比例し促進すると考えられる。今後、添加濃度の条件を変更し、冷凍保存中のブリ肉における NaCl 添加の影響をさらに詳しく検討する必要がある。

冷蔵保存条件下では NaCl 添加区で、特に NaCl0.9M 添加区において対照区に比べ 3 日目から HHE が有意に増加した。これまでも報告されている通り、冷蔵保存条件下でも NaCl の添加がブリ肉の脂質過酸化を促進した。冷凍保存条件のときと同じく、ブリ肉の脂質過酸化は保存期間と添加量の増加に比例し促進すると考えられる。

NaCl の添加によって遊離した Fe イオンを EDTA のキレート作用で取り込み、ブリ肉の脂質過酸化を抑制することができるかどうかについて検討するため、HHE と MA の変化を測定した結果、今回の条件では EDTA の添加がブリ肉における HHE の生成を抑制することが確認できなかった。しかしながら、EDTA の添加は MA の生成を抑制することが確認された。HHE の生成が促進された理由として、EDTA 添加濃度が高すぎた、EDTA が遊離した Fe イオンとうまく錯体を形成できなかったなど様々な理由が考えられるが、現段階ではっきりとした原因を挙げることはできない。HHE の分析では EDTA の影響を確認することができず MA の分析でのみ確認された理由として、MA が脂肪酸酸化の最終産物であり、安定であることが考えられる。EDTA の抗酸化作用に関する研究は魚肉以外の食品を用いて多く行われており、強い作用があるという報告がされている。そのため、魚肉に関しても同様の効果がある可能性は充分考えられる。今後も添加濃度を変え、同様の実験を繰り返し、EDTA の添加が魚肉に与える影響を検討する必要がある。

強い抗酸化活性を持っている  $\alpha$ -トコフェロールをブリおよびタイ肉に  $\alpha$ -トコフェロールを添加した実験において、その添加はタイ肉の脂質過酸化に添加した実験において、そ

の添加は両魚種の筋肉の MA および HHE 生成を促進する傾向が認められたが、明確ではなかった。 $\alpha$ -トコフェロールを添加した餌料により飼育した動物の肉において、 $\alpha$ -トコフェロールは強い抗酸化活性をもつが、屠殺後に添加しても抗酸化活性があまり期待出来ないことが知られている。したがって、今回の実験結果、すなわち $\alpha$ -トコフェロール添加が貯蔵中の両魚種筋肉の脂質過酸化をほとんど抑制しなかったことは、屠殺後に添加したことによると考えられる。しかしながら、屠殺後に $\alpha$ -トコフェロールを添加しても脂質過酸化の進行を抑制するとの報告があるので、 $\alpha$ -トコフェロールの添加量等を変化させたさらなる詳細な実験を行う必要がある。

強い抗酸化力を持つことで知られるカテキン類の一種、エピガロカテキンガレート (EGCg) はブリ肉の脂質過酸化を抑制した。しかし、カテキン混合物の添加では脂質過酸化に与える影響を観察することができなかった。エピガロカテキンガレートは、既に強い抗酸化作用が報告されているトリオール構造を 2 つ有している。そのため、強い抗酸化力で脂質過酸化を抑制し、カテキン混合物の添加では見られなかった効果を示したと考えられる。しかしながら、高濃度の EGCg の添加が食品に与える影響はいまだ不明である。今後は、EGCg の添加濃度の条件を変え、さらに詳しく見ていく必要がある。また、EGCg 以外のカテキン類が与える影響も検討する必要がある。

今回、タイ肉、サンマ肉における NaCl 添加が及ぼす HHE 生成および脂質過酸化への影響を確認することはできなかった。これまでに行ってきた実験結果により、HHE は脂質過酸化の進行する条件下でその生成が抑制される可能性があるということが示唆されている。そのことと今回得られた結果とを考え合わせると、魚肉中の HHE 生成に関しては、条件を変え、同様の実験を繰り返し、詳細に検討する必要がある。HHE の毒性は 4-ヒドロキシノネナール（畜肉、特にブタ肉中の脂質に多く含まれているリノール酸等の n-6 脂肪酸より生じる）よりも強いことが明らかになっている。したがって、魚肉の食品としての安全性を考慮すると、今回調べた魚種だけではなく、それ以外の魚肉中の HHE の生成機構についても詳細に検討する必要がある。

## 2. 水産練り製品中の脂質過酸化に関する研究

### 2. 1. 市販練り製品中の脂質過酸化

#### 目的

一般に、魚肉に食塩を加えて練り、加熱により凝固させた製品を「水産練り製品」と称している。食品は加熱により脂質過酸化が促進されるといわれている。これは、細胞が熱により破壊されるので脂質と酸素とが接触しやすくなり酸化反応が急速に進行してしまうためであり、水産練り製品は加工や貯蔵中に脂質過酸化物や各種酸化生成物が混在していることが推測される。さらに、市販されている水産練り製品には、弾力を形成するためにも、ほとんどすべての商品に NaCl が加えられている。NaCl は食品を保存する上でも重要な成分ではあるが、脂質過酸化を促進する要因であると考えられている。

現在、食品の加工は保存性を増し、さらに利用価値を高め、調理の手間を省くという目的まで加味されたものになっている。しかし、食品保存・加工の主たる意義は食品の生産から消費に至る間における品質の制御にあるといえる。そこで、市販されている水産練り製品の脂質過酸化の程度を明らかにするために、MDA および HHE 含量を測定した。

#### 実験方法

##### 1) 試薬

1. 1. 1. と試薬はじ物を使用した。

##### 2) 試料調整

蒸しかまぼこ、鯛入り高級かまぼこ、はんぺん、焼きちくわ、飴肥天（プレーン）、飴肥天（エビ入り）の6種類の練り製品を一般市場で購入した。それぞれの試料を1分間フードプロセッサーで細かく刻み、MA および HHE 含量を測定した。

試料として用いた市販練り製品の原材料をそれぞれ下記に示す。

##### <蒸しかまぼこ>

魚肉（いとより、かます）、砂糖、でん粉（ばれいしょ、小麦）、食塩、イソマルトオリゴ糖、みりん、調味料（アミノ酸、核酸）

##### <鯛入り高級かまぼこ（鯛かまぼこ）>

魚肉（たら、いとより、れんこだい、その他）、塩、大豆たん白、砂糖、でん粉、発酵調味料、酒、乳糖、調味料（アミノ酸等、小麦、牛肉、豚肉、ゼラチンを含む）、貝カルシウム

##### <はんぺん>

魚肉、卵白、でん粉（ばれいしょ、とうもろこし）、発酵調味料、植物油（なたね油、コーン油）、砂糖、食塩、やまいも、えびエキス、ソルビット、調味料（アミノ酸等）、増粘多糖類、（原材料の一部に小麦、大豆を含む）

##### <焼きちくわ>

魚肉（たら、いとよりだい、その他）、大豆油、でん粉、食塩、砂糖、魚肉エキス、ソルビット、調味料（アミノ酸等）、乳化剤

< 飴肥天 >

魚、トーフ、豆腐用凝固剤、卵、調味料（アミノ酸）、保存料（ソルビン酸）

3) MA 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

4) HHE 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

5) 統計処理

1. 1. 1. に述べた方法に従って分析した。

結果および考察

MA と HHE の測定結果は、Table 2-1 に示した。

MA 含量にかんしてはんぺん、ちくわ、蒸しかまぼこ、鯛かまぼこの間に有意差は見られなかった。ちくわ、飴肥天（エビ入り）の間にも有意差は見られなかった。飴肥天（プレーン）は 6 種類の中では最も MDA 含量が多かった。続いて飴肥天（エビ入り）が多かった。

HHE 含量について、はんぺん、蒸しかまぼこ、鯛かまぼこ、飴肥天（プレーン）、飴肥天（エビ入り）の間に有意差は見られなかった。ちくわは 6 種類の中で最も HHE 含量が有意に多かった。

Table.2-1. 水産練り製品中の MA と HHE 含量

	はんぺん	ちくわ	蒸しかまぼこ	鯛かまぼこ	飴肥天（プレーン）	飴肥天（エビ入り）
MA	1.70 ± 0.66 a	3.84 ± 0.88 ac	1.20 ± 0.15 a	2.14 ± 0.79 a	9.62 ± 1.90 b	8.24 ± 3.22 bc
HHE	n.d. a	0.13 ± 0.09 b	0.03 ± 0.03 ab	0.06 ± 0.03 ab	n.d. a	n.d. a

平均値 ± SE (n=6), a-c 各製品ごとの有意差 (p<0.05)

n. d. : 検出限界以下

一般的に市販のはんぺん、ちくわ、蒸しかまぼこは 90℃□95℃で、飴肥天は約 180℃で加熱が行われている。本実験においてプレーンとエビ入りの飴肥天は共に MDA 含量が最も多かったことから、高温で加熱すると脂質過酸化が促進されることが確認された。自身魚を原料としているはんぺん、ちくわ、蒸しかまぼこ、鯛かまぼこは、脂質の含量が低いうえに脂質の酸化触媒であるヘム色素をほとんど含まないので、脂質酸化が起こりにくいと考えられる。一方、イワシなどの赤身魚を主原料とした飴肥天は脂質含量が比較的高い。さらに、製造過程において揚げ油として用いる植物油の吸収、酸化などにより脂質過酸化が促進されたものと考えられる。



## 2. 2. 1. イワシの脂質過酸化に対する NaCl の影響について (1)

### 目的

NaCl の添加によって食肉中の脂質過酸化が促進されることは良く知られている。Kanner らは七面鳥筋肉組織への NaCl 添加実験の結果から、NaCl がタンパク質とキレート結合している Fe を遊離させ、Fe イオンが生じ、これが触媒となって、ラジカルが生成すると報告している。また、魚肉組織においても NaCl を加えると脂質過酸化が促進され、Fe を加えた場合にも同様の結果が得られることが確認されている。そこで、幅広い方法で食されているが、保存期間が短いことから NaCl の添加が免れないイワシについて、NaCl が脂質過酸化に与える影響を調査することを目的として本実験を行なった。

### 実験方法

#### 1) 試薬

試薬は 1. 1. 1. と同じものを使用した。

#### 2) 試料

試料 (イワシ) は、魚市場で購入した。皮および血合筋は取り除き、筋肉組織のみをフードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を Control と NaCl (和光純薬) を添加したものに分け、それぞれをサランラップに包みアルミホイルで遮光した後ポリエチレンバックに入れて 4°C で貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料の MA, HHE および CP 含量を 0, 2, 4 日目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) CP 含量の測定方法

1. 1. 4. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) HHE 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 6) 統計処理

1. 1. 1 に述べた方法に従って分析を行った。

## 結果

MA, CP および HHE 含量の変動の結果を Table 2-2-1 に示した。MA 含量は、0 日目のコントロール区と 1%、2%区にはなんら変わりはないが、1 日目□ 2 日目になると 2%区のもの有意に高く、3 日目には 1%区のものも、コントロール区よりも有意に高い値を示した。CP 含量は 1%区のもの 1 日目に減って、また高くなっている。他区は有意な差は見られなかった。HHE 含量は 0 日目□ 2 日目では 1%□2%添加のものがコントロールよりも有意に高い値を示した。2 日目、3 日目ではコントロール区と 1%区が増加し、三つの区に差がなくなった。

Table 2-2-1 イワシの脂質過酸化に対する NaCl の影響

日数		0	1	2	3
MA ( $\mu$ mol/g tissue)	Control	4.77 $\pm$ 0.82 <sup>a,x</sup>	3.86 $\pm$ 0.32 <sup>a,□</sup>	3.72 $\pm$ 0.37 <sup>a,x</sup>	3.86 $\pm$ 0.65 <sup>a,□</sup>
	1%	5.51 $\pm$ 1.08 <sup>a,x□</sup>	4.97 $\pm$ 0.34 <sup>a,□□</sup>	3.72 $\pm$ 0.32 <sup>a,x</sup>	6.89 $\pm$ 0.67 <sup>□,□</sup>
	2%	6.47 $\pm$ 0.84 <sup>a,x</sup>	6.49 $\pm$ 0.50 <sup>□,□</sup>	6.01 $\pm$ 0.41 <sup>□,x</sup>	6.94 $\pm$ 0.22 <sup>□,□</sup>
CP (nmol/mg protein)	Control	1.33 $\pm$ 0.18 <sup>a,x</sup>	1.23 $\pm$ 0.15 <sup>a,x</sup>	0.91 $\pm$ 0.31 <sup>a,x</sup>	1.26 $\pm$ 0.15 <sup>a,x</sup>
	1%	1.53 $\pm$ 0.16 <sup>a,x</sup>	1.34 $\pm$ 0.09 <sup>a,x□</sup>	1.06 $\pm$ 0.09 <sup>a,y</sup>	1.43 $\pm$ 0.13 <sup>a,xy</sup>
	2%	1.68 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>	1.57 $\pm$ 0.26 <sup>a,x</sup>	1.19 $\pm$ 0.18 <sup>a,x</sup>	1.22 $\pm$ 0.18 <sup>a,x</sup>
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>a,x</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a,x</sup>	0.42 $\pm$ 0.06 <sup>a,y</sup>	0.74 $\pm$ 0.04 <sup>a,z</sup>
	1%	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>ab,xy</sup>	0.15 $\pm$ 0.07 <sup>ab,x</sup>	0.55 $\pm$ 0.12 <sup>a,yz</sup>	0.75 $\pm$ 0.15 <sup>a,y</sup>
	2%	0.29 $\pm$ 0.08 <sup>b,x</sup>	0.22 $\pm$ 0.07 <sup>b,x</sup>	0.61 $\pm$ 0.08 <sup>a,x</sup>	0.40 $\pm$ 0.21 <sup>a,x</sup>

平均値 $\pm$ SE (n=4), a-b 添加量における有意差, x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

## 2. 2. 2. イワシの脂質過酸化に対する NaCl の影響について (2)

### 目的

前節での実験では、NaCl 添加によるMAの増加、つまり脂質過酸化の促進が見られた。また、過酸化生成物のHHEについてもわずかながら増加が見られ、C□は変化がなかった。そこで、再び同様の結果が得られるかを確かめるために、前節と同様の条件下で、C□、MA、HHE 含量の変動を測定した。

### 実験方法

#### 1) 試薬

試薬は 1. 1. 1. と同じものを使用した。

#### 2) 試料

試料は 2. 1. 1. 同じものを使用した。

#### 3) MA 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) CP 含量の測定方法

1. 1. 4. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) HHE 含量の測定法

1. 1. 1 に述べた方法に従って実験を行った。

#### 6) 統計処理

1. 1. 1 に述べた方法に従って分析を行った。

### 結果

MA , CP および HHE 含量の変動の結果を Table2-2-2 に示した。MA 含量は 0 日目、1 日目では 1 %、2 %区がコントロール区よりも値が高い。2 日目には 2 %区が減少し、3 日目に再び増加している。1 %区は 1 日目から減少しており、コントロール区においては日による変動は見られなかった。CP 含量は 1 日目に 1 %、2 %区のものがコントロール区よりも値が低いこと以外、変化はなかった。HHE 含量は 2 %区が 1 日目にわずかに増加し、2 日目に減少、3 日目に再び増加した。1 日目では 2 %区が有意に高かったが、0 日目、2 日目、3 日目ではそれぞれの区の差は見られなかった。

Table 2-2-2 イワシの脂質過酸化に対する NaCl の影響

日数		0	1	2	3
MDA ( $\mu$ mol/g tissue)	Control	5.42 $\pm$ 0.35 <sup>a,x</sup>	4.51 $\pm$ 0.49 <sup>a,□</sup>	3.60 $\pm$ 0.73 <sup>a,□,x</sup>	4.59 $\pm$ 0.70 <sup>a,□</sup>
	1%	8.15 $\pm$ 0.45 <sup>□,x</sup>	7.01 $\pm$ 1.23 <sup>a,□,□□</sup>	5.37 $\pm$ 0.65 <sup>a,□</sup>	5.17 $\pm$ 0.35 <sup>a,□</sup>
	2%	7.76 $\pm$ 0.25 <sup>□,x</sup>	9.23 $\pm$ 1.04 <sup>□,□</sup>	3.31 $\pm$ 0.37 <sup>□,□</sup>	8.40 $\pm$ 0.54 <sup>□,□</sup>
CP (nmol/mg protein)	Control	1.75 $\pm$ 0.20 <sup>a,xy</sup>	2.55 $\pm$ 0.28 <sup>a,x</sup>	1.42 $\pm$ 0.27 <sup>a,y</sup>	2.23 $\pm$ 0.46 <sup>a,xy</sup>
	1%	2.07 $\pm$ 0.15 <sup>a,x</sup>	1.77 $\pm$ 0.08 <sup>□,x□</sup>	1.55 $\pm$ 0.30 <sup>a,xy</sup>	1.29 $\pm$ 0.28 <sup>a,y</sup>
	2%	1.61 $\pm$ 0.16 <sup>a,x</sup>	1.45 $\pm$ 0.08 <sup>b,x</sup>	1.27 $\pm$ 0.32 <sup>a,x</sup>	1.49 $\pm$ 0.13 <sup>a,x</sup>
HHE (nmol/g tissue)	Control	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>a,x</sup>	0.22 $\pm$ 0.11 <sup>a,y</sup>	0.08 $\pm$ 0.05 <sup>a,y</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>
	1%	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a,x</sup>	0.46 $\pm$ 0.23 <sup>a,x</sup>	0.30 $\pm$ 0.06 <sup>a,x</sup>	0.64 $\pm$ 0.07 <sup>a,x</sup>
	2%	0.69 $\pm$ 0.20 <sup>a,xy</sup>	1.08 $\pm$ 0.10 <sup>b,x</sup>	0.32 $\pm$ 0.15 <sup>a,y</sup>	0.59 $\pm$ 0.07 <sup>a,xy</sup>

平均値 $\pm$ SE (n=4), a-b 添加量における有意差, x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

## 2. 2. 1. および 2. 2. 2. の総合考察

2.2.1.の結果より、脂質過酸化の指標であるMA含量はコントロール区に比べ1%、2%区の方が経時的に有意に増加していることから NaCl が脂質の酸化を促進していることが分かる。また、HHE含量においては0日目からコントロール区に比べ、1%、2%区が有意に高く、NaCl 添加直後からHHEの生成が始まった可能性がある。C□含量においては変動が見られないことから、C□はアルデヒド類とよりも生成速度が遅いため、4日目以降に含量が増加するかもしれない。

2.2.1.同様に 2.2.2.においても、MA含量はコントロール区よりも1%、2%区が有意に高い。MAは脂質酸化の指標であることから、□□C□添加によって脂質の酸化は促進されたことが確認できた。HHE含量は2%区のものが1日目に増加して、2日目に減少している。MAでもその傾向は見られることから2%区のこれらアルデヒドはタンパク質などと反応して他の物質になった可能性も考えられる。CP含量は2.2.1.と同様に、変動は見られなかった。CPの生成はアルデヒドより遅れておこるため、2.2.1.と同様に、これから増加する可能性が高い。しかし、4日目には生イワシは腐敗臭を発生し、食品としての価値

がなくなっていたために、3日目以降の実験は行なわなかった。NaCl 添加により、MA、HHEおよびC□含量が増加することは食品の安全上ばかりでなく栄養学的にも大きな問題である。

## 2. 3. 1. いわしのさつま揚げ貯蔵実験 (1)

### 目的

2. 1. 1. の実験で、飴肥天の MDA 含量がほかの練り製品と比較して多かったことから、高温で加熱することのほかに、植物油の吸収、酸化も加工における脂質過酸化を促進するのではないかと考えられる。そこで、飴肥天の貯蔵実験を行い、MDA および HHE 含量の変動を測定する必要がある。しかし市販の水産練り製品には調味料や配合材料が含まれていたり、一つの製品に複数の魚肉が使用されていたり、加工条件が統一されていないので正確な判断が不可能である。そこで、飴肥天の材料にも用いられているいわしを使って、日常的に簡単に作ることができるいわしのさつま揚げを作成することにした。いわしは血合肉の割合が大きく、この部分にエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸および鉄イオンを多く含むといわれていることから、脂質過酸化が著しく促進されるのではないかと考えられる。そこで 1%NaCl をすり身に添加し、いわしのさつま揚げの MDA および HHE 含量の変動を測定した。

### 実験方法

#### 1) 試薬

試薬は 1. 1. 1. と同じものを使用した。

#### 2) 試料調整、貯蔵条件

試料 (いわし) は、一般の市場で購入した。頭と骨、内臓はあらかじめ市場で除去してもらった。その後でき得る限り皮を取り除き、血合肉と普通肉を 1 分間フードプロセッサで細かく刻んだ。その試料に 1%になるように NaCl を添加し、すり鉢でよく混合した後、同じ重量の団子をつくった。0 日目に、油で揚げる前の試料、揚げた後の試料をそれぞれ測定した。(180°C のサラダ油で 1 分 30 秒間揚げる) 油で揚げた試料はラップおよびアルミホイルで包み、ポリエチレンパックに入れて 4°C で貯蔵した。それぞれ測定する直前に包丁で細かく刻み MDA、HHE 含量を 1, 2, 3 日目に測定した。

#### 3) MA 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE 含量の測定法

1. 1. 1. に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) 統計処理

1. 1. 1. に述べた方法に従って分析した。

### 結果および考察

MA と HHE の測定結果は、Table 2-3-1 に示した。

MA 含量は 0 日目の揚げる前、揚げた後の HHE 含量を比較すると変動は見られなかった。

1日目に有意に増加後、さらに3日目に有意に増加した。HHE含量は0日目の揚げる前と比較して、揚げた後は減少の傾向があった。そして、揚げた後から3日目まで増加する傾向があった。

貯蔵日数が経過するにつれてHHE生成を促進する傾向を示し、MA生成を顕著に促進したことから、1%NaCl添加のいわしさつま揚げの中では、経時的に脂質過酸化が促進することが確認された。食品へのNaCl添加が脂質過酸化の進行に影響を及ぼすという報告もされていることから、NaClを添加しない試料を用いて対照実験を行う必要がある。

Table. 2-3-1 4℃貯蔵中におけるフライしたイワシ肉中のMAおよびHHE含量の変動

	Days	0 (before frying)		0 (after frying)		1		2		3						
MA	1%NaCl	4.18	± 0.3	a	5.93	± 0.54	a	17.17	± 1.58	b	17.18	± 3.03	b	42.84	± 3.06	c
HHE	1%NaCl	0.06	± 0.03	ac	0.01	± 0.01	a	0.06	± 0.01	ac	0.14	± 0.06	bc	0.18	± 0.02	b

平均値±SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

## 2. 3. 2. いわしのさつま揚げ貯蔵実験 (2)

### 目的

2.3.1.の実験で1%NaCl添加のいわしさつま揚げは、経時的に脂質過酸化を促進することが確認された。前述の通り、一般的にNaClは脂質過酸化を促進するとされている。そこで、いわしのさつま揚げの脂質過酸化に及ぼすNaClの影響を明らかにするため、1%NaClを添加したものと添加しないものを試験区として調整し、前回と同様の条件で経時的にMDAおよびHHE含量の変動を測定した。

### 実験方法

#### 1) 試薬

試薬は1.1.1.と同じものを使用した。

#### 2) 試料調整、貯蔵条件

試料(いわし)は、一般の市場で購入した。頭と骨、内臓はあらかじめ市場で除去してもらった。その後でき得る限り皮を取り除き、血合肉と普通肉を1分間フードプロセッサーで細かく刻んだ。その試料を二等分し、何も加えないControl(Control区)と1%になるようにNaClを添加した区(1%区)の計2試験区に調整し、すり鉢でよく混合した後、それぞれの区で、同じ重量の団子をつくった。0日目に、油で揚げる前の試料、揚げた後の試料をそれぞれ測定した。(180℃のサラダ油で1分30秒間揚げる)油で揚げた試料はラップおよびアルミホイルで包み、ポリエチレンパックに入れて4℃で貯蔵した。それぞれ測定する直前に包丁で細かく刻みMDA、HHE含量を1, 2, 3日目に測定した。

#### 3) MA含量の測定法

1.1.1.に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE含量の測定法

1.1.1.に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) 統計処理

1.1.1.に述べた方法に従って分析した。

### 結果および考察

MAとHHEの測定結果は、Table 2-3-2に示した。

MA含量はControl区においては、1日目から3日目までに有意に増加した。1%区においては、1日目と2日目に有意に増加した。0日目の揚げる前において、Control区と比較して、1%区は有意に多かった。HHE含量はControl区においては、1日目と3日目に有意に増加した。1%区においては、1日目と2日目に有意に増加した。1日目から3日目において、Control区と比較して、1%区は有意に多かった。

MAおよびHHE含量において1%区はControl区より有意に増加したことから、1%



NaCl 添加によりいわしのさつま揚げの脂質過酸化を促進することが確認された。NaCl はたんぱく質中の鉄イオンを遊離するという報告がある。鉄イオンのような遷移金属イオンは脂質の自動酸化反応を進行させるため、MA および HHE 生成が促進された可能性がある。

Table. 2-3-2 4°C貯蔵中におけるフライしたイワシ肉中の MA および HHE 含量の変動

	Days	0 (before frying)	0 (after frying)	1	2
	<b>control</b>	12.71±1.24 a,x	14.86±1.49 a,,x	40.90±1.14 b,,x	52.34±4.93 c,,x
<b>MA</b>	<b>1%NaCl</b>	26.08±2.26 a,y	21.08±2.32 a,,x	39.61±2.89 b,,x	65.00±2.10 c,x
	<b>control</b>	0.16±0.08 a,,x	0.15±0.02 a,,x	0.38±0.07 b,,x	0.28±0.07 ab,,x
<b>HHE</b>	<b>1%NaCl</b>	0.24±0.04 a,,x	0.16±0.05 a,,x	0.80±0.06 b,,y	1.01±0.12 bc,,y

平均値±SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

n. d. : 検出限界以下

## 2. 3, 3, いわしのさつま揚げ貯蔵実験 (3)

### 目的

魚類筋肉の脂質含量は畜肉等とは異なり栄養状態、年齢、季節などによって著しく変動する。一般的にいわしの脂質含量は1月が最も高く(18%)、5月が最も低い(2%)とされている。<sup>47</sup> また、飢肥天の原材料には一年中新鮮ないわしが使用されている。第3章は1月に実験を行った。そこで、今回は5月に前回と同様の条件下で経時的にMDAおよびHHE含量の変動を測定してみた。

### 実験方法

#### 1) 試薬

##### 1) 試薬

試薬は1.1.1.と同じものを使用した。

#### 2) 試料調整、貯蔵条件

試料(いわし)は、魚市場で購入した。0℃で運搬後、すばやく頭と骨、内臓を取り除いた。その後でき得る限り皮を取り除き、血合肉と普通肉を1分間フードプロセッサで細かく刻んだ。その試料を三等分し、何も加えないものをControl(Control区)とし、残りの試料に濃度が1%NaCl添加区(1%区)と2%NaCl添加区(2%区)になるようにNaClを添加した。1%、2%NaCl添加区をすり鉢でよく混合した後、それぞれの区で、同じ重量の団子をつくった。0日目に、油で揚げる前の試料、揚げた後の試料をそれぞれ測定した。(180℃のサラダ油で1分30秒間揚げる)油で揚げた試料はラップおよびアルミホイルで包み、ポリエチレンパックに入れて4℃で貯蔵した。それぞれ測定する直前に包丁で細かく刻みMDA、HHE含量を1, 2, 3日目に測定した。

#### 3) MA含量の測定法

1.1.1.に述べた方法に従って実験を行った。

#### 4) HHE含量の測定法

1.1.1.に述べた方法に従って実験を行った。

#### 5) 統計処理

1.1.1.に述べた方法に従って分析した。

### 結果および考察

MAとHHEの測定結果をTable 2-3-3に示した。

MDA含量はControl区と1%区において、2日目に有意に増加した。2%区においては、0日目の揚げる前と比較すると、揚げた後は有意に減少した。その後、2日目に有意に増加した。2日目と3日目に、Control区と比較して、1%区と2%区は有意に多かった。HHE含量はControl区においては、1日目と2日目に有意に増加し、3日目に有意に減少し

た。1%区においては、1日目に有意に増加し、3日目に有意に減少した。2%区においては、0日目の揚げた後のものは揚げる前のものに比べて減少の傾向があった。その後、1日目と2日目に有意に増加し、3日目に有意に減少した。0日目の揚げた後と2日目において、Control区と比較して、1%区と2%区は有意に多かった。

MAおよびHHE含量において1%および2%区はControl区より有意に減少したことから、1%および2%NaCl添加によりいわしのさつま揚げの脂質過酸化を抑制することが確認された。NaClの添加により脂質過酸化が抑制されたという報告はあまりない。今後、サンプルであるいわしの脂肪酸組成、油で揚げることによる脂肪酸組成・NaCl含量・FeおよびCu含量<sup>48</sup>の変化等を詳細に分析し、この原因を解明する必要がある。

Table. 2-3-3 4℃貯蔵中におけるフライしたイワシ肉中のMAおよびHHE含量の変動

Days	0 (before frying)	0 (after frying)	1	2	3
<b>control</b>	12.09±0.84 a,,x	10.85±2.21 a, x	19.21±4.81 a,,x	37.55±3.23 b,,x	40.77±2.98 b,,x
<b>MA</b>					
<b>1%NaCl</b>	11.31±0.81 a, x	6.66±0.22 a, x	9.49±1.3 a, x	22.15±1.54 b, y	21.13±2.50 b, y
<b>2%NaCl</b>	13.16±1.11 a, x	8.67±0.4 b, x	10.33±1.63 ab, x	22.45±2.02 c, y	20.55±0.87 c, y
<b>control</b>	0.15±0.07 a, x	0.03±0.00 a, x	0.38±0.05 b, x	0.61±0.06 c, x	0.02±0.02 a, x
<b>HHE</b>					
<b>1%NaCl</b>	0.05±0.02 a, x	n.d, a, x	0.31±0.03 b, x	0.31±0.09 b, y	0.02±0.01 a, x
<b>2%NaCl</b>	0.05±0.02 ab, x	n.d, a, x	0.17±0.09 b, x	0.34±0.06 c, y	n.d, a, x

平均値±SE (n=4)、 a-c 添加量における有意差、 x-z 保存日数における有意差 (P<0.05)

n. d. : 検出限界以下

## 参考文献

- G. Spiteller. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mech. Ageing Dev.* 122: 617-657 (2001)
- E. R. Stadtman. Protein oxidation and aging. *Science.* 257: 1220-1224 (1992)
- A. Yoritaka, N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E. R. Stadtman, Y. Mizuno. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2696-2701, April (1996)
- N. Y. Calingasan, K. Uchida, G. E. Gibson. Protein-Bound Acrolein: A Novel Marker of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* 72: 751-756 (1999)
- L. J. Marnett. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage *Toxicology* 181: 219-222 (2002)
- O. Miro, J. Casademont, E. Casals, M. Perea , A. Urbano, S. Marquez, P. Rustin, F. Cardellach. Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc. Res.* 47: 624-631 (2000)
- C. D. Morris, and S. Carson. Routine Vitamin Supplementation to Prevent Cardiovascular Disease: A Summary of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 139: 56-70 (2003)
- D. H. Emmert, J. T. Kirchner. The Role of Vitamin E in the Prevention of Heart Disease. *Arch Fam Med* 8: 537-542 (1999)
- H. Y. Huang, L. J. Appel, K. D. Croft, E. R. Miller III, T. A. Mori, and I. B. Puddey. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am. J. Clin.*

*Nutr.* 76: 549–555 (2002)

J. Chen, J. He, L. Hamm, V. Batuman, P. K. Whelton. Serum Antioxidant Vitamins and Blood Pressure in the United States Population. *Hypertension*. 40: 810–816 (2002)

K. K. Grobusch, J. M. Geleijnse, J. H. Breeijen, H. Boeing, A. Hofman, D. E. Grobbee, and J. C.M. Witteman. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 261–266 (1999)

水上茂樹、五十嵐脩：活性酸素と栄養；光生館（1995）

H.Esterbauer, R.J.Schaur, H.Zollner. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 81–128(1991)

A.Khayat, D.Schwal. Lipid Oxidation in seafood . *Food technology*.130–139(1983)

T.sakai, S.Kuwazuru. A lipid peroxidation-derived Aldehyde, 4-Hydroxy-2-nonenal, Contents in Several Fish Meats. *Fisheries Science* 61(3), 527–528(1995)

T. Sakai, K. Sugamoto, N. Eto. Cytotoxicity of 4-Hydroxy-2E-hexenal, a Lipid Peroxidation-derived Aldehyde, and Changes of Its Content in Frozen Yellowtail Meat. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 41(6): 368–370 (2000)

Lee JY, Je JH, Kim DH, Chung SW, Zou Y, Kim ND, Ae Yoo M, Suck Baik H, Yu BP, Chung HY. Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal. *Eur J Biochem.* Apr;271(7):1339–47(2004)

Shibata N, Yamada S, Uchida K, Hirano A, Sakoda S, Fujimura H, Sasaki S, Iwata M, Toi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M. Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res. Sep*

3;1019(1-2):170-7(2004)

Dyerberg.J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acid and prevention of atherosclerosis. *Nutr Rev.* 1986 Apr ; 44(4) : 125-134

五十嵐脩、金田尚志、福場博保、美濃真；過酸化脂質と栄養；光生館(1986)

五十嵐脩：食品化学；弘学出版(1996)

食品製造化学；露木英男、越後多喜志他共著；建帛社

Tadashi S. Yoh-ichi M. Kazuhiro S. Koji U. Lipid peroxidation-derived Hepatotoxic Aldehyde, 4-Hydroxy-2-hexenal in Fish . *Biosci.Biotech.Biochem.*, 61(8), 1399-1400(1997)

Van Kuijk FJ, Holte LL, Dratz EA. 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosaheptaenoic acid. *Biochim Biophys Acta.* Mar 12;1043(1):116-8(1990)

Meredith C Fidler, Lena Davidsson, Thomas Walczyk and Richard F Hurrell. Iron absorption from fish sauce and soy sauce fortified with sodium iron EDTA. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 78, No. 2, 274-278, August (2003)

Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. Dec;32(6):613-22.(1986)

Kyoji Y, Yuka S, Chie S, Masae H. Determination of Antioxidant Activities and Quantitative Analysis of Various Phenolic . *J. Technology and Education*, Vol.11, No.2, 59-70(2004)

Dianzani, M. U., Lipid oxidation and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 15, 125-147 (1993).