魚干物の天日乾燥, 加熱による過酸化と変異活性の変化

(平成3年7月4日受理)

富田 勲^{*1} 下位香代子^{*1} 鈴木正純^{*1}
佐野満昭^{*1} 中村好志^{*1} 木苗直秀^{*2}
Prakai BORIBOON^{*3} 橋爪 崇^{*4}

Changes in the Levels of Lipid Peroxidation and Mutagenicity of Fish after Sun-Drying and Broiling

Isao TOMITA^{*1}, Kayoko SHIMO^{*1}, Masazumi SUZUKI^{*1}, Mitsuaki SANO^{*1},
Yoshiyuki NAKAMURA^{*1}, Naohide KINAE^{*2}, Prakai BORIBOON^{*3},
and Takashi HASHIZUME^{*4}

(University of Shizuoka; ^{*1}School of Pharmaceutical Sciences; ^{*2}School of Food and Nutritional Sciences: 52-1, Yada, Shizuoka, Japan; ^{*3}Food Analysis Division, Department of Medical Science: Yod-Se, Bangkok, 10100, Thailand; ^{*4}Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health: 3-3-45, Sunayama-minami, Wakayama, Japan)

The mutagenicity of the ether extract from sun-dried and broiled saurel (*Trachurus japonicus*) was examined in *S. typhimurium* TA100. The level of lipid peroxidation of the fish was also assayed. Sun-drying and broiling promoted lipid peroxidation and increased the mutagenic activity. Although the mutagenic activity (without S9) was not seen in the ether extract from raw fish, it was produced and increased during the processes of sun-drying and broiling.

The ether extract from sun-dried (12 hr) and broiled saurel induced 409 revertants/20 mg. After fractionation through a Sep-Pak silica cartridge, the ethylacetate (AcOEt) fraction showed the highest mutagenic activity. The activity was decreased by the addition of sodium sulfite in a dose-dependent manner, and the presence of carbonyl compounds including methylglyoxal (MG) was demonstrated. The MG content found by HPLC was 6.16 μ g in the AcOEt fraction from 20 mg of ether extract. MG appears to be formed through the process of peroxidation of fish lipid during sun-drying and broiling.

(Received July 4, 1991)

Key words: 変異原性 mutagenicity; 脂質過酸化 lipid peroxidation; 魚干物 sun-dried fish; メチルグリオキサル methyl glyoxal

緒 言

ヒトにおけるガンの80~90%は、ヒトをとりまく種々の環境因子が原因となっていることが疫学調査から指摘されている。その危険因子として食物、喫煙などの

生活習慣、大気汚染などがあげられ、中でも食物の占める割合が大きいと言われている¹⁾。発ガン物質の第一次短期スクリーニング法として *Salmonella typhimurium* を用いた変異原性試験がAmesによって開発され²⁾、今までに食品中より種々の変異原が検出されている³⁾。著者らは、以前に、実際に摂取する状態に調理した日常食品から変異原を検索する目的で、日常食品をマーケットバスケット方式により13群に分類し、それらの

^{*1} 静岡県立大学薬学部: 静岡市谷田 52-1

^{*2} 静岡県立大学食品栄養科学部: 静岡市谷田 52-1

^{*3} タイ医科学研究所: ヨドセ, バンコック, タイ国

^{*4} 和歌山県衛生公害研究センター: 和歌山市砂山南 3-3-45

Salmonella typhimurium TA100 菌株に対する変異活性について検討し、13 群の食品群のうち X 群の魚介類、XI 群の肉類に S9 mix の添加によらず比較的高い活性を認め、報告した⁴⁾。そしてこれら食品群のうち XI 群について、牛肉、豚肉、鶏肉、鯨肉、羊肉、プレスハム、鶏卵の 7 食品を個別に用い、直接及び亜硝酸処理後の変異活性を検定した結果、加熱羊肉が、特に亜硝酸処理後、変異活性を増大することを認め、前変異原物質として 5-ヒドロキシインドールなどインドール骨格を持つ誘導体 6 種を同定し報告した。また、この際、直接作用性の変異原物質として、グリオキサールなど 3 種のジカルボニル化合物が存在することを明らかにした⁵⁾。

今回、著者らは、X 群の魚介類について、直接作用性の変異原を検出することを目的とし、魚干物中特に消費量の多いアジの干物について、天日乾燥及び加熱による魚肉の脂質過酸化とそれに伴う変異活性の変化について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬

Nutrient broth, Bacto agar (Difco 社製), Glucose (日本薬局方) (第一製薬(株)社製), Tween 40 (小宗薬品(株)社製), methylglyoxal (Sigma 社製), シリカゲル薄層プレート: Kieselgel 60 (20×20 cm, 厚さ 0.2 mm, Merck 社製), Sep-Pak silica cartridge (Waters 社製), その他試薬はすべて特級試薬を用いた。

2. 実験材料及びエーテル抽出物の調製

静岡市の魚店よりマアジ (*Trachurus japonicus*) を購入し試料とした。一夜塩漬にしたマアジのひらきを 30 分水につけ、塩抜きした後よく水洗いし、水気をとって一定時間 (0, 3, 6, 12 hr) 天日乾燥させ干物にした。都市ガスを用いて 15~25 分、通常摂取する状態にまで焼き、可食部をミキサーで均一に破碎した後、凍結乾燥した。乾燥物 10 g を 100 ml のエーテルで 3 回抽出 (各々 10 分振とう) し、ロータリーエバポレーターを用いて 1/10 量まで減圧濃縮し、ついで窒素ガス下完全に溶媒を留去してエーテル抽出物を得、冷凍庫 (-80°) に保存した。

3. エーテル抽出物の分画

エーテル抽出物 20 mg を 2 ml の *n*-ヘキサンに溶かし、Sep-Pak silica cartridge を用いて *n*-hexane, *n*-hexane-ether (9:1, 1:1), ether, CHCl₃, ethylacetate (AcOEt) 各々 10 ml を用いて順次溶出させた。各溶出液は 2 で示したのと同じ方法で溶媒を留去した。

4. 過酸化脂質試験

POV, COV については薄木らの方法⁶⁾に従った。過酸化脂質量 (LPO) は、各エーテル抽出物を HPTLC により展開させた後、 α -methyl indole と反応させ、その赤色スポットを TLC スキャナー (557 nm, 島津 CS-920) により MDA 量として測定した⁷⁾。

Table 1. Loss of Water Content in Sun-Dried Saurel and Yields of Freeze-Dried or Ether Extracted Edible Part

Sample	Sun-dried		Freeze-dried* (g)	Ether extract* (g)
	Time (hr)	Loss of water (%)		
Non-broiled	0	0	20.6	3.74
"	12	42.9	35.3	4.61
Broiled	0	0	41.9	6.08
"	3	24.5	47.0	7.00
"	6	30.6	45.6	8.00
"	12	42.9	50.6	9.25

*: One hundred g of edible part of sun-dried saurel was used.

5. 変異原性試験

2 及び 3 で調製した抽出物を Tween 40 1% 溶液に懸濁またはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かして、*Salmonella typhimurium* TA100 を用いて、Ames 法を改良した矢作のプレインキュベーション法⁸⁾に基づいて変異原性試験を行った。試験は各々プレート 2 枚ずつで行い、復帰変異コロニー数はその平均値で示した。

6. 脂肪族アルデヒド及びメチルグリオキサール (MG) の定量

3. により調製した AcOEt 溶出物について各々、著者らの開発したシクロヘキサンジオン、オルトフェニレンジアミンを用いるけい光 HPLC 定量法^{9), 10)}により測定した。操作条件を以下に示す。() 内は MG の場合である。

高速液体クロマトグラフ (HPLC): Spectro-physics SP-8750 型 (同じ); ポンプ: Spectro-physics SP-8770 型 (同じ); 検出器: けい光検出器 日立 F-1000 型 Ex 380 nm, Em445 nm (同じ, Ex370 nm, Em405 nm); カラム: エルマ光学 ERC-ODS-12620, 6×10 cm (Lic-hrosorb Si-60 (10 μ m), 0.4×25 cm); 溶出液: 26% tetrahydrofuran (*n*-hexane-ethanol=49:0.6); 流速: 1.0 ml/min (2.0 ml/min)

結果及び考察

まずマアジを天日乾燥する時間を変えて、それぞれよりエーテル抽出物を得、POV, COV, LPO を指標にして、それらの過酸化度と変異活性について検討した。エーテル抽出物の調製過程における天日乾燥による水分損失量、凍結乾燥重量、エーテル抽出物重量を Table 1 に示した。可食部 100 g (3~4 匹) より得られるエーテル抽出物量を比較すると、生よりも加熱した方が、また、天日乾燥時間が長くなるほど重量が増加した。これは水分含量の変化が一因とも考えられる。

Fig. 1 に示したように、生魚、焼魚双方とも天日乾燥時間が長くなるほど POV, COV, LPO のいずれも増加

POV (meq/kg)	COV (meq/kg)	LPO (mM as MDA/kg)	Sample Sun drying time(hr)	Net His ⁺ revertants/plate
18	21	7	Non-broiled 0	121
117	65	11	" 12	409
36	25	4.4	Broiled 0	121
50	31	4.0	" 3	339
144	41	3.7	" 6	223
412	193	7.6	" 12	969

Fig. 1. Levels of lipid peroxidation and mutagenic activity of ether extract from saurel during different times of sun-drying. LPO was determined by α -methyl indole-HPTLC system and expressed as malonal dialdehyde (MDA). Dose of ether extract was 20 mg/plate.

Fig. 2. Mutagenic activity and TLC pattern of each fraction obtained through Sep-Pak silica cartridge of ether extract from sun-dried (12 hr) and broiled saurel (a) Mutagenicity test: 20 mg of ether extract was used. (b) Thin layer chromatography, plate: Kiesel-gel 60 (Merck); solvent: (I) CHCl_3 -MeOH- H_2O (65 : 30 : 5) (II): n -hexane- Et_2O -HOAc (80:20:1.5); detection: 50% H_2SO_4 and I_2 vapor

し、脂質の過酸化の進行が認められた。また、天日乾燥 12 時間の場合、生と加熱した場合を比較すると、加熱した方がより過酸化が進行していた。変異活性も過酸化が進行するほど増加した。生魚を通常の条件下で加熱した場合は、エーテル抽出物 20 mg についてプレートあたり 10 revertants で、変異原物質はほとんど生成されていなかったが、天日乾燥、加熱操作を行うと 409 revertants となり、これらの過程を通して変異原物質が生成することが明らかとなった。

次に最も高い変異活性を示したエーテル抽出物（天日乾燥 12 時間、加熱）について Sep-Pak silica cartridge を用いて、 n -hexane-ether (9 : 1)、同 (1 : 1)、ether、

Fig. 3. Inhibitory dose effect of sulfite on mutagenicity of AcOEt fraction. Various amount of sulfite were added to the preincubation mixture with *S. typhimurium* TA100.

Table 2. Content of Aliphatic Aldehydes and Methyl Glyoxal in AcOEt Fraction obtained through Sep-Pak Silica Cartridge of Ether Extract from Sun-dried and Broiled Saurel

Sample	Sun-drying time (hr)	Content of	
		Aliphatic aldehyde (ng)	MG (μg)
Non-broiled	0		ND
"	12		1.33
Broiled	0		ND
"	3		0.61
"	6		2.14
"	12	9.69 ^{*1}	6.16
		22.3 ^{*2}	
		33.9 ^{*3}	

AcOEt fraction was obtained from 20 mg of the ether extract.

*¹: n -pentanal; *²: n -hexanal; *³: 4-hydroxy 2- t -nonenal

CHCl_3 , AcOEt の順に溶出させ、各溶出画分を得、それぞれの画分の TLC パターンを Fig. 2 に示した。対照にはトリグリセリドとしてトリオレイン、脂肪酸としてオレイン酸を用いた。各画分の変異活性を Net revertant 数で図中に示したが、これはエーテル抽出物 20 mg を分画したものについて調べたものである。AcOEt 画分に最も高い変異活性が認められた。分画する前のエーテル抽出物 20 mg の Net revertant 数 409 と比較すると 121 と約 30% の寄与率であった。

そこで、AcOEt 画分中の変異原物質の性質を検討する目的で、Sep-Pak NH_2 cartridge 処理や Na_2SO_3 処理による変異活性の変化を調べたところ、前者により変異

活性は約 1/10 に減少し、後者については、Fig. 3 に示したように、濃度に依存して減少し、 Na_2SO_3 が 300 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度においては完全に不活性化された。したがって、アルデヒドやカルボニル化合物の存在が示唆されたので、著者らの開発したシクロヘキサジオンを用いるけい光 HPLC 法⁸⁾により、脂肪族アルデヒドの定量を行った (Table 2)。n-ペンタナール、n-ヘキサナールの存在が確認されたが、いずれも量的には少なかった。また、それらの変異活性を TA100 を用いて検討したが、いずれも変異活性は認められず、文献的にもその変異活性は一般に弱いこともあり¹¹⁾、AcOEt 画分中の変異原物質としてその他のアルデヒド、特に MG の存在が考えられた。

そこで、AcOEt 画分に o-フェニレンジアミン (OPD) を反応させ、反応生成物について GC/MS による検索を行ったところ、マスキロマトグラムに MG の OPD 誘導体である 2-メチルキノキサリンの m/z 144 の分子イオンピークを認めたので、MG について HPLC による定量を行った。天日乾燥時間を変えたもの、生と加熱したもの、および各々のエーテル抽出物の AcOEt 画分における MG 量を測定した。Table 2 に示すように、天日乾燥時間が長くなるほど、すなわち過酸化が進行するほど MG 量は増加した。天日乾燥 12 時間で加熱した試料のエーテル抽出物 20 mg より得た AcOEt 画分中の MG 量は 6.16 μg であった。また、12 時間天日乾燥したものについて生と加熱した場合を比べると、それぞれ 1.33, 6.16 μg であり、加熱操作によってさらに増加していることが分かった。

以上の結果より、エーテル抽出物中の変異原物質として MG の存在が認められたが、AcOEt 画分の変異活性はエーテル抽出物全体のその約 30% であり、また、Fig. 2 から明らかなように、変異原物質は各画分に分散しており、エーテル抽出物中には多数の変異原物質が存在していると思われる。

MG などグリオキサール類は、酒類、コーヒー、味噌、しょう油などの食品から検出されており^{12), 13)}、糖類の分解により生成すると言われている¹⁴⁾。一方、リノレン酸メチルやイワシ油などの食用油脂の過酸化によっても生成するという報告もある¹⁵⁾。エーテル抽出物中に認められた MG の起源は明らかではないが、魚肉の脂質が天日乾燥、加熱操作などの過程をへて過酸化されて生成したのではないかと推察される。MG はそれを皮下注射した部位にのみ腫瘍を発生したと報告されており¹²⁾、胃に対するガン原性は認められていないが、ラット腺胃粘膜においてオルニチン脱炭酸酵素 (ODC)、不定期 DNA 合成、定期 DNA 合成をいずれも誘発したと報告されている¹⁶⁾。MG は一日に飲むコーヒーあたり約 1 mg 含有されていると言われ¹²⁾、一方、12 時間天日乾燥し加熱したマアジ一匹の場合、約 0.7 mg 含有されていることにな

る。疫学的な調査から塩干魚と胃ガンとの関連が示唆されているが^{17), 18)}、MG もその一因であるかもしれない。

MG はヒトの生体内でもごく微量存在し、細胞増殖の制御因子として作用していると言われ^{19)~21)}、著者らもマウスに L1210 leukemia または sarcoma 180 を移植した際、その増殖に伴って変動することを観察した²²⁾。

MG については、このように生体内で代謝によって生成するものと、外部から与えたものとは相反する作用が報告されており、その原因の解明については、今後の研究に待たなければならないが、ヒトが日常の食品を通じて摂取する量は多いのではないかと思われ、その生体への影響については、今後、十分吟味されるべき課題と思われる。

ま と め

マアジの干物について、天日乾燥及び加熱による魚肉の脂質過酸化とそれに伴う変異活性 (*S. typhimurium* TA100, -S9) の変化を比較検討した。

その結果、可食部より得たエーテル抽出物は、天日乾燥時間が長くなるほど POV, COV, LPO いずれも増加し、また、加熱することにより、さらに過酸化が進行し、それに伴って変異活性も上昇した。したがって、天日乾燥、加熱操作の過程を通して、直接作用性の変異原物質が生成することが明らかになった。

この変異活性は、 Na_2SO_3 処理により減少することから、その活性成分としてカルボニル化合物の存在が示唆され、GC/MS 及び HPLC により検討した結果、変異原物質としてメチルグリオキサール (MG) の存在が証明された。この際、MG は、過酸化の進行に伴い増加した。一般に、MG などの α -ジカルボニル化合物は、糖類の分解により生成するものと考えられてきたが、本実験結果により、魚肉に含まれる脂質が天日乾燥、加熱操作などの過程で過酸化され、生成する可能性があるものと推察される。

文 献

- 1) Kee, M.: Nature, **303**, 648 (1983).
- 2) Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E.: Mutat. Res. **31**, 347~364 (1975).
- 3) 佐藤茂秋: 食衛誌, **28**, 1~12 (1987).
- 4) 橋爪 崇, 横山 剛, 神木照雄, 中村好志, 木苗直秀, 富田 勲: 同上, **24**, 369~375 (1983).
- 5) 橋爪 崇, 辻澤 広, 横山 剛, 小澤敬弘, 斎藤 優, 木苗直秀, 富田 勲: 同上, **31**, 513~521 (1990).
- 6) 金田尚志, 植田伸夫編: “過酸化脂質実験法”, p. 58~61 (1983) 医歯薬出版.
- 7) Sano, M., Abe, M., Yoshino, K., Matsuura, T., Sekino, T., Saito, S., Tomita, I.: Chem. Pharm. Bull. **34**, 174~178 (1986).
- 8) 矢作多喜江: 蛋白質 核酸 酵素 **20**, 1,178~1,189 (1975).
- 9) Yoshino, K., Matsuura, T., Sano, M., Saito, S., Tomita, I.:

- Chem. Pharm. Bull. **34**, 1,694~1,700 (1986).
- 10) Matsuura, T., Yoshino, K., Ooki, E., Saito, S., Ooishi, E., Tomita, I.: *ibid.* **33**, 3,567~3,570 (1985).
- 11) Marnett, L. J., Hurd, H. K., Hollstein, M. C., Levin, D. E., Esterbauer, H., Ames, B. N.: *Mutat. Res.* **148**, 25~34 (1985).
- 12) Nagao, M., Fujita, Y., Sugimura, T., Kosuge, T.: "The Role of Cyclic Nucleic Acid Adducts in Carcinogenesis and Mutagenesis", p. 283~291 (1986), IARC Scientific Publications, Lyon.
- 13) Hayashi, T., Shibamoto, T.: *J. Agric. Food Chem.* **33**, 1,090~1,093 (1985).
- 14) 林 建樹, 並木満夫: トキシコロジーフォーラム **9**, 169~176 (1986).
- 15) Hirayama, T., Yamada, N., Nohara, M., Fukui, S.: *J. Sci. Food Agric.* **35**, 1,357~1,362 (1984).
- 16) Furihata, C., Sato, Y., Matsushima, T., Tatematsu, M.: *Carcinogenesis* **6**, 91~94 (1985).
- 17) Kamiyama, S., Michioka, O.: "Carcinogens and Mutagens in the Environment", p. 29~42 (1983), CRC Press, Cleveland, Ohio.
- 18) Tajima, K., Tominaga, S.: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 705~716 (1985).
- 19) Együd, L. G., Szent-Györgyi, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **55**, 388~393, **56**, 203~207 (1966).
- 20) Szent-Györgyi, A., Együd, L. G., McLaughlin, J. A.: *Science* **155**, 539~541 (1967).
- 21) 村田幸作, 木村 光: 蛋白質 核酸 酵素 **31**, 1,010~1,021 (1986).
- 22) Matsuura, T., Owada, K., Sano, M., Saito, S., Tomita, I., Ikekawa, T.: *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 2,926~2,930 (1986).