アカマンボウに含まれるバレニンのアミノ酸自動分析計による定量

大村 裕治,^{1*} 木宮 隆,¹ 松田 隆,¹ 國吉 道子,¹
前川 貴浩,² 川端康之亮,² 安達 駿悟,² 網谷 雄也³

(2018年3月1日受付, 2018年8月3日受理, 2018年10月23日J-STAGE 早期公開)

¹(国研)水産研究・教育機構中央水産研究所, ²(株)極洋塩釜研究所, ³(株)極洋

Analysis of balenine in muscle extract of opah *Lampris guttatus* with automatic amino acid analyzer

YUJI OMURA,^{1*} TAKASHI KIMIYA,¹ TAKASHI MATSUDA,¹ MICHIKO KUNIYOSHI,¹
TAKAHIRO MAEGAWA,² YASUNOSUKE KAWABATA,² SYUNGO ADACHI²
AND YUYA AMITANI³

¹National Research Institute of Fisheries Science, Kanazawaku, Yokohama, Kanagawa 236-8648, ²Kyokuyo Co., Ltd., Shiogama Laboratory, Shiogama, Miyagi 985-0001, ³Kyokuyo Co. Ltd., Minatoku Tokyo 107-0052, Japan

We examined the method of analysis and quantitation of balenine (Bal) previously reported. In this method, Bal in muscle extract was hydrolyzed to 3-methylhistidine (3-Mehis) and β -alanine in 6 M hydrochloric acid heated at 110°C for 24 hours, analyzed and quantitated 3-Mehis by automatic amino acid analyzer. And it was found that 3-Mehis content was equal to Bal content before hydrolysis. However, in this study, the minimum variation of 3-Mehis content was achieved at 110°C for 3 hours by six repetitions of hydrolysis and quantitation of 3-Mehis derived from Bal. In addition, a high linear correlation between 3-Mehis content after hydrolysis and Bal content before hydrolysis was observed at the Bal standard solution concentrations of 0.05 to 10 μ mol/mL. The ratio of 3-Mehis content after hydrolysis to Bal content before hydrolysis was not equal but 89%. Based on these considerations, the Bal content of opah *Lampris guttatus* muscle extract was quantitated and a remarkably high Bal content was found. The Bal content of opah was much higher than that of some species of baleen whales, such as mink whale *Balaenoptera acutorostrata*, Sei whale *B. borealis* and Bryde's whale *B. brydei*.

キーワード: 3-メチルヒスチジン, アカマンボウ, アミノ酸自動分析計, バレニン

バレニン (Bal) はアンセリン (Ans) やカルノシン (Car) と同じイミダゾールジペプチドと称されるペプチドの1種である。これら3種のイミダゾールジペプチドは β -アラニンとヒスチジン (His) あるいはその誘導体, すなわちカルノシン (Car) はヒスチジンと, アンセリン (Ans) は1-メチルヒスチジン (π -メチルヒスチジン) と, バレニンは3-メチルヒスチジン (τ -メチルヒスチジン) とからなり, イミダゾール基による高い緩衝能に由来する抗疲労性などの機能性を有すると考えられている。¹⁾ Ans と Car は鶏肉, 牛肉などの畜肉やカツオ・マグロ類, ウナギなどにも多く含まれており, 抗疲労性に関する研究が広く行われ²⁻⁷⁾ サプリメントが市販

されていることなどにより一般に知られている。Bal も同様に抗疲労性を有するとされ,^{8,9)} 動物実験による試験で認知症予防機能があることも報告されている。¹⁰⁾ しかし Ans や Car は, 種々の生物に豊富に含まれていることが知られているのに対して, Bal を多く含むことが知られている生物は少ない。すなわち, 鳥類のニワトリで最大 5 mg/100 g, 哺乳類であるブタで最大 48 mg/100 g, シカで最大 94 mg/100 g, 爬虫類であるヘビで 48 から最大 312 mg/100 g 含まれることが知られており, 水産生物では硬骨魚類であるウナギで 4 mg/100 g, カラフトマスで 8 mg/100 g, ギンザケで 3 mg/100 g 含まれるが, その他の魚類では痕跡量が検出されるのみであ

ることが知られている。一方、海産哺乳類であるヒゲクジラ類ではナガスクジラで 1466 mg/100 g、コイワシクジラで 1847 mg/100 g と Bal 含量が顕著に高いことが知られている。^{1,11)} 国際捕鯨委員会における商業捕鯨の一時停止決議採択以降、一般にヒゲクジラ類の入手が難しい状況が続いていることにより Ans や Car に較べて食品素材や機能性探索等の研究対象として Bal を利用することは困難な状態となっている。また、Ans と Car はアミノ酸自動分析計で遊離アミノ酸とともに容易に定量できるが、Bal は Car とリテンションタイムが接近するため Bal の含量が高い場合には Car とピークが重なり、抽出エキスのままでは定量することが困難な場合がある。飯田ら¹²⁾は、ミンククジラから過塩素酸 (PCA) 抽出エキスを調製し、これを 6 M 塩酸中で 110°C で 24 時間加熱して Bal を 3-メチルヒスチジン (3-Mehis) と β -アラニンに加水分解し、Bal を構成する 3-Mehis が加水分解により Bal と等モル生成すると仮定し、定量した 3-Mehis から Bal 量を推定する方法を提出した。本法はアミノ酸分析を実施あるいは外部委託出来れば比較的簡便な方法であるが、塩酸加水分解における Bal からの 3-Mehis 生成比や加水分解時間の影響等に言及しておらず再検討の余地があると考えられた。そこで、筆者らは飯田らの方法について Bal 標準品を用いて定量性に大きく影響すると考えられる加水分解時間および定量性を確保可能な試料液中の Bal 濃度を検討し、それらの結果から本方法において、より適切と考えられる塩酸加水分解条件を明らかにした。さらに遠洋はえ縄漁業で混獲されるが一般に認知されておらずマグロ類に較べて経済的価値が低いアカマンボウ *Lampris guttatus* の筋肉エキスを本条件により分析したところ、ヒゲクジラ類を上回る含量の Bal が存在することを見出し、硬骨魚類で筋肉中に Bal を多量に含む魚種が存在を初めて明らかにしたので以下に報告する。

材料と方法

材料 Bal 標準品は株式会社浜理薬品工業 (大阪府大阪市) に製造依頼して購入した L-バレニン標準物質 (純度 99.8%) を、Ans 標準品は和光純薬工業株式会社 (現 富士フイルム 和光純薬株式会社) 製 L-アンセリン硝酸塩標準物質 (純度 77.3–81.2%)、Car 標準品は同社製 L-カルノシン標準物質 (純度 99.8%)、3-Mehis 標準品は同社製 3-メチル-L-ヒスチジン標準物質 (純度 99.5%) を使用した。アカマンボウ *L. guttatus* は、株式会社極洋 (東京都港区) から提供された 9 個体を使用した。これらの個体は 2016 年 1 月 11 日、6 月 6、7 および 12 日、9 月 17、18 および 21 日にバリ島沖のインド洋で遠洋はえ縄漁船により漁獲し、船上で超低温凍結してバリ島所在の同社系列企業の加工場に搬入して凍

Table 1 Whole weight, coordinates of catch and catching date of opah *Lampris guttatus*

Individual No.	Whole weight (kg)	Coordinates of catching		Catching date	
		Latitude	Longitude		
1	30.6	8° 58'	114° 35'	January	11, 2016
2	21.2	8° 58'	114° 35'	January	11, 2016
3	14.4	8° 58'	114° 35'	January	11, 2016
4	27.0	8° 58'	115° 16'	June	6, 2016
5	28.0	8° 58'	115° 17'	June	7, 2016
6	35.0	8° 58'	115° 19'	June	12, 2016
7	14.0	9° 01'	115° 01'	September	18, 2016
8	30.4	8° 59'	115° 08'	September	21, 2016
9	35.2	8° 59'	114° 59'	September	17, 2016

結状態のままバンドソーで 3 分割に裁断後、再度、超低温冷凍庫内で冷却し発泡スチロールケースに収容して航空貨物便で国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所横浜庁舎 (神奈川県横浜市) に送付した。中央水産研究所到着後は実験に供するまで -40°C 以下で保管した。供試個体の漁獲日、漁獲位置および重量を Table 1 に示した。また、比較対照として冷凍ミンククジラ *Balaenoptera acutorostrata* の背肉赤肉、メバチ *Thunnus obesus* およびビンナガ *T. alalunga* の背肉普通筋を使用した。ミンククジラ背肉赤肉は 2016 年度南極海調査捕鯨副産物冷凍ブロック肉を株式会社神水産 (神奈川県横浜市) より購入した。メバチは平成 24 年度海洋水産資源開発調査事業 (遠洋マグロはえ縄—太平洋・中東部域) で独立行政法人水産総合研究センター (現国立研究開発法人水産研究・教育機構) 開発調査センター漁業調査船「開発丸」によりタヒチ東方沖で漁獲された 9 個体を、ビンナガは平成 23 年度海洋水産資源開発調査事業 (システム対応型: 近海はえ縄—北太平洋西部海域) で水産総合研究センター開発調査センター漁業調査船「海青丸」により北マリアナ諸島東方沖で漁獲された 4 個体を実験に供した。実験に供するまでメバチおよびビンナガの背肉普通筋は -55°C 以下で、ミンククジラ背肉赤肉は -40°C 以下で保存した。

アミノ酸自動分析計による Bal 定量 遊離アミノ酸と Ans は、アミノ酸自動分析計 (L-8900 日立ハイテクサイエンス株式会社) を使用し、高分離生体液分析法でクエン酸リチウム緩衝液 (L-8500-PF キット 三菱ケミカル株式会社) を用いて分離し、ニンヒドリン試薬 (L-8900 用ニンヒドリン発色溶液セット 和光純薬工業株式会社) により発色させ 570 nm の吸光度を測定することにより定量した。アミノ酸標準液は和光純薬工業株式会社製アミノ酸混合標準液 (AN-II 型) に同社製アミノ酸標準品 (L-アンセリン, L-カルノシン, 3-メチル-L-ヒスチジン) を 0.02 M 塩酸に溶解してから適宜に

混合して使用した。Bal および Car の定量は飯田らの方法¹²⁾に準じて行った。Bal 標準品を 0.02 M 塩酸に溶解し、同溶媒により適宜に希釈して標準液を調製し、これに 0.04% (v/v) となるように 2-メルカプトエタノールを加え、さらに 6 M となるように濃塩酸を適宜加えて加水分解管 (RT-20 Reliance Safety Glass PTE LTD) 中で混合した。氷水中で冷却しながらダイヤフラム式真空ポンプ (PC101 Vacuubrand Co Ltd) で 2 分間脱気し、密栓してからヒートブロック (DTU-1C タイテック株式会社) で 110°C で所定時間加熱した後、氷水中で急冷して加水分解反応を停止した。ロータリーエバポレーター (R205 BUCHI Labortechnik AG) で蒸発乾固した後、0.02M 塩酸に溶解して加水分解試料液とし、上述の方法によりアミノ酸自動分析計で 3-Mehis を分析、定量した。

Bal の分析、定量における加水分解時間と試料濃度の検討 飯田らはアミノ酸自動分析計により得られた試料液中の 3-Mehis 濃度を加水分解前の Bal 濃度としたが、著者らが Bal 標準液により検証した結果、3-Mehis は Bal と等モル生成しなかった。そこで、1 $\mu\text{mol/mL}$ の Bal 標準液 (6 M 塩酸-0.04% 2-メルカプトエタノール溶液) を 110°C で 1, 2, 3, 6, 12 および 24 時間加水分解し、各加水分解時間について 6 回ずつ加水分解とアミノ酸自動分析計による分析を繰り返したときに得られた 3-Mehis 濃度のばらつきを調べて Bal 定量に適切と考えられる加水分解時間を検討した。さらに 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 および 20 $\mu\text{mol/mL}$ の Bal 標準液を調製して各濃度の Bal 標準液を上述の検討により精度よく分析可能と判断した時間で加水分解し、生成した 3-Mehis を分析、定量した。得られた定量値から加水分解前標準液の Bal 濃度と加水分解により生成した 3-Mehis 定量値との関係を示す検量線を作成した。これを 6 回繰り返して Bal 標準液濃度に対する 3-Mehis 定量値のばらつきを調べ、3-Mehis 濃度から精度良く Bal 濃度を推定可能な検量線を作成し得る Bal 標準液の濃度範囲を検討した。

過塩素酸抽出エキスの調製 凍結状態のまま試料肉からバンドソー (NSO-N2B 株式会社中島製作所) で 1 辺 3 cm, 厚さ 1 cm 程度となるよう筋肉片を切り出した。アカマンボウは背肉普通筋、頭部背側の普通筋 (以下、頭部普通筋とする) および頭部体側皮下に存在する濃赤色の血合肉様の筋肉 (以下、頭部血合肉様筋とする) を、ミンククジラは背肉赤肉の 10 kg 冷凍ブロックの中心付近を、メバチとビンナガは左の背側ロイン前部の普通筋を切り出した。凍結状態の筋肉片を液体窒素に投入し、10 分間冷却した後にアルミホイルで 4 重に包んでから鉄製ハンマーで粉状になるまで凍結粉碎した。肉粉を 2 g 精秤し、5°C 以下に冷却した 10% 過塩素酸

(PCA) 5 mL を加えて激しく攪拌した後、冷却遠心分離機 (7780 株式会社久保田製作所) で 4°C, 10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を採取し、沈殿に 5°C 以下に冷却した 5% PCA 2 mL を加えて振盪後、同様の遠心分離により洗う操作を 2 回繰り返して得られた上清を最初の遠心分離により採取した上清と合わせた後、氷冷しながら 5°C 以下に冷却した 8 M KOH を加えて中和した。4°C, 10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離して上清を採取し、過塩素酸カリウムの沈殿を氷冷しながら 5°C 以下に冷却した蒸留水 2 mL を加えて同様の遠心分離により洗う操作を 2 回繰り返して得られた上清を、最初の遠心分離により採取した上清と合わせ、5°C 以下に冷却した蒸留水を加えて 25 mL に定容した。凍結粉碎以降の操作は 5°C 恒温室内で行い、抽出液は分析に供するまで -40°C で凍結保存した。

PCA 抽出エキス中の Bal, Car および Ans の定量 アカマンボウ背肉普通筋、頭部普通筋および頭部血合肉様筋から凍結粉碎法により PCA 抽出したエキスを上述の Bal 標準液による加水分解時間と試料濃度の検討結果にもとづいて精度良く定量可能な範囲内となるように 0.02 M 塩酸で適宜に希釈した。濃塩酸、2-メルカプトエタノールおよび蒸留水を適宜加えて 6 M-0.04% 2-メルカプトエタノールとなるよう調整した溶液中で上述の検討結果にもとづいて精度良く定量可能な時間で加水分解した後、アミノ酸自動分析計により 3-Mehis を定量した。加水分解後の 3-Mehis 濃度から加水分解前の 3-Mehis 濃度を差し引いて加水分解により生成した 3-Mehis 濃度を求めた。予め Bal 標準液により作成した Bal 濃度と 3-Mehis 濃度との関係を示す検量線を作成し、加水分解により生成した 3-Mehis 濃度から PCA 抽出エキス中の Bal 濃度を求めた。Car 濃度は加水分解前エキスをアミノ酸自動分析計で分析して得られた Car のモル濃度から得られた Bar のモル濃度を差し引くことにより求めた。ただし、L-8900 アミノ酸自動分析計の高分離生体液分析法で同一濃度 (1.0 $\mu\text{mol/mL}$) の Bal と Car の標準液を 6 回繰り返して定量したときの Car のピークの面積値に対する Bal のピークの面積値の比が 111% だったことから Bal のモル濃度に 0.901 を乗じた値を Car のモル濃度から差し引いた。PCA 抽出エキスの加水分解からアミノ酸自動分析計による 3-Mehis の分析、定量は各検体について 2 回ずつ行い、得られた定量値の平均値を分析結果とした。

統計解析 平均値の差は、Welch の *t* 検定により有意差水準を 5% ($p < 0.05$) として検定した。

結 果

6 M 塩酸中 110°C 加水分解時間が Bal からの 3-Mehis 生成率に及ぼす影響 1 $\mu\text{mol/mL}$ Bal 標準液を 1, 2, 3,

6, 12 および 24 時間 110°C で加水分解したときの Bal 濃度と生成した 3-Mehis 濃度との関係を Fig. 1 に示した。Figure 1(a) に加水分解時間と 6 回繰り返し分析したときの生成した 3-Mehis の平均値との関係を示した。Bal 濃度に対し加水分解により生成した 3-Mehis の濃度は 1-24 時間までの各加水分解時間において 88-89% とほぼ同等だった。Figure 1(b) に加水時間と 1 $\mu\text{mol/mL}$ Bal 標準液から生成した 3-Mehis 濃度の相対標準偏差 (%) との関係を示した。相対標準偏差は 5 回以上の繰り返し分析で得られた結果の標準偏差を平均値で除して 100 を乗じた値 (%) で, 異なる濃度等の試料について繰り返し分析したときの測定値のばらつきを相対的に評価する尺度である。¹³⁾ 加水分解時間が 1 時間のときの相対標準偏差は 1.05%, 2 時間では 0.686%, 3 時間では

Fig. 1 Relationship between the period of hydrolysis and 3-methylhistidine concentration resulting from the hydrolysis of balenine. (a) Relationship between the concentration of 3-methylhistidine resulting from hydrolysis of 1 $\mu\text{mol/mL}$ balenine standard solution and the period of hydrolysis in 6 M hydrochloric acid at 110°C; (b) Relationship between the coefficient of variation of the concentration of 3-methylhistidine resulting from hydrolysis of 1 $\mu\text{mol/mL}$ of balenine standard solution and the period of hydrolysis in 6 M hydrochloric acid at 110°C.

0.429%, 6 時間では 0.526%, 12 時間では 0.493%, 24 時間では 1.18% だった。すなわち, 相対標準偏差は, 加水分解時間が 1 および 2 時間と 24 時間では, 3-12 時間までより顕著に大きく, 最も小さかったのは 3 時間だった。本検討結果からアカマンボウおよび対照のミンククジラ筋肉エキスの Bal の分析, 定量時の加水分解時間を 3 時間とした。

Bal 標準液濃度と加水分解により生成する 3-Mehis の濃度との関係 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 および 20 $\mu\text{mol/mL}$ の Bal 標準液を 6 M 塩酸中で 110°C で 3 時間加水分解したときに生成した 3-Mehis 濃度と加水分解前の Bal 標準濃度との関係を Fig. 2 に示した。Figure 2(a) に 0.01-20 $\mu\text{mol/mL}$ までの各 Bal 標準液について Bal 標準液濃度と加水分解とアミノ酸自動分析計による分析で得られた 3-Mehis 濃度の 6 回繰り返し分析値から作成した検量線を示した。決定係数は $R^2 = 0.998$ と高い予測精度の検量線が得られたが, 20 $\mu\text{mol/mL}$ の Bal 標準液に対して得られた 3-Mehis 濃度は 0.1-10 $\mu\text{mol/mL}$ までの Bal 標準液で得られた 3-Mehis 濃度の増加傾向に対して頭打ちとなった。このときの検量式は $y = 0.838x$ だった。Figure 2(b) に Bal 標準液濃度と 6 回繰り返し加水分解して生成した 3-Mehis 濃度をアミノ酸自動分析計で分析, 定量した定量値のばらつきを示す相対標準偏差との関係を示した。一般に定量下限は相対標準偏差が 10% 以下となる推定値とされる¹⁴⁾ が, 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ で 11% となった他は, 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ では 7%, 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ では 5%, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ では 4%, 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ では 4%, 5.0 $\mu\text{mol/mL}$ では 3%, 10 $\mu\text{mol/mL}$ では 4%, 20 $\mu\text{mol/mL}$ では 1% 以下といずれも 10% を下回った。Figure 2(c) に Bal 標準液濃度を 0.05-10 $\mu\text{mol/mL}$ までとしたときの検量線を示した。決定係数は $R^2 = 0.999$ となり, より相関性の高い検量線が得られた。このとき検量式は $y = 0.889x$ だった。本検討結果からアカマンボウおよび対照のミンククジラ筋肉エキスの Bal の分析, 定量時には抽出試料液の Bal 濃度が 0.05-10 $\mu\text{mol/mL}$ の範囲となるように調製した。

アカマンボウ筋肉の遊離アミノ酸およびイミダゾールジペプチド含量 Table 2 にアカマンボウの背肉普通筋, 頭部普通筋および頭部血合肉様筋の遊離アミノ酸およびイミダゾールジペプチド含量を示した。アカマンボウ ($n = 9$) の Bal 含量は Table 3 に示したミンククジラ背肉赤肉の 1889 mg/100 g に対して背肉普通筋で 2561 ± 436 mg/100 g, 頭部普通筋 2797 ± 448 mg/100 g, と顕著に高かった一方, 頭部血合肉様筋は 2220 ± 1227 mg/100 g と個体差が大きかった。Car 含量は対照としたミンククジラ背肉赤肉で 455 mg/100 g だったのに対してアカマンボウの背肉普通筋では 549 ± 290 mg/100

Fig. 2 Examination of the relationship between the concentration of balenine standard solution and 3-methylhistidine resulting from the hydrolysis of balenine. (a) Correlation of the concentration of balenine standard solution and 3-methylhistidine resulting from hydrolysis in the balenine concentration of 0.01 to 20 $\mu\text{mol/mL}$; (b) Relationship between the relative standard deviation of the concentration of 3-methylhistidine resulting from hydrolysis in the balenine concentration of 0.0 to 20 $\mu\text{mol/mL}$; (c) Correlation of the concentration of balenine standard solution and 3-methylhistidine resulting from hydrolysis in the balenine concentration of 0.05 to 10 $\mu\text{mol/mL}$.

Table 2 Free amino acid and imidazole dipeptide contents in dorsal and cephalic muscles of opah *Lampris guttatus* (mg/100 g wet weight)

	Dorsal ordinary muscle	Cephalic ordinary muscle	Cephalic dark muscle
Amino acids			
Taurine	12.7 $\pm$ 8.65	13.5 $\pm$ 6.61	162 $\pm$ 218
Aspartic acid	0.917 $\pm$ 0.00711	0.288 $\pm$ 0.192	0.740 $\pm$ 0.642
Threonine	3.27 $\pm$ 0.534	3.29 $\pm$ 0.427	7.37 $\pm$ 6.74
Serine	1.83 $\pm$ 0.502	1.75 $\pm$ 0.384	5.43 $\pm$ 5.73
Glutamic acid	5.44 $\pm$ 2.44	3.58 $\pm$ 1.82	11.7 $\pm$ 13.0
Glycine	3.19 $\pm$ 0.977	3.11 $\pm$ 1.41	12.1 $\pm$ 14.3
Alanine	7.75 $\pm$ 1.84	8.98 $\pm$ 2.14	44.3 $\pm$ 53.7
Valine	4.15 $\pm$ 0.956	4.00 $\pm$ 0.848	4.42 $\pm$ 0.996
Methionine	4.01 $\pm$ 0.671	3.99 $\pm$ 0.766	3.65 $\pm$ 0.830
Isoleucine	2.53 $\pm$ 0.588	2.35 $\pm$ 0.569	2.65 $\pm$ 0.653
Leucine	4.54 $\pm$ 0.988	4.31 $\pm$ 0.894	4.95 $\pm$ 1.24
Tyrosine	2.93 $\pm$ 1.13	2.91 $\pm$ 0.870	3.17 $\pm$ 1.10
Phenylalanine	1.87 $\pm$ 0.637	1.90 $\pm$ 0.506	2.13 $\pm$ 0.581
β -Alanine	0.50 $\pm$ 0.166	0.508 $\pm$ 0.137	1.84 $\pm$ 2.43
β -Aminoisobutyric acid	0.50 $\pm$ 0.453	0.635 $\pm$ 0.439	0.634 $\pm$ 0.578
Ethanolamine	0.395 $\pm$ 0.151	0.388 $\pm$ 0.124	0.698 $\pm$ 0.301
Ammonium	12.6 $\pm$ 1.67	11.3 $\pm$ 1.40	10.5 $\pm$ 2.15
Ornithine	0.133 $\pm$ 0.0913	0.210 $\pm$ 0.105	0.386 $\pm$ 0.268
Lysine	1.92 $\pm$ 0.482	1.91 $\pm$ 0.708	3.35 $\pm$ 2.45
Histidine	0.892 $\pm$ 0.458	1.55 $\pm$ 0.338	2.61 $\pm$ 2.67
3-Methylhistidine	0.579 $\pm$ 0.0678	0.652 $\pm$ 0.156	0.633 $\pm$ 0.160
Arginine	0.759 $\pm$ 0.428	0.72 $\pm$ 0.344	1.02 $\pm$ 0.328
Hydroxyproline	4.27 $\pm$ 0.883	4.22 $\pm$ 1.14	3.90 $\pm$ 1.18
Proline	1.85 $\pm$ 0.762	1.76 $\pm$ 1.09	7.52 $\pm$ 11.4
Imidazole dipeptides			
Anserine	11.4 $\pm$ 1.89	10.5 $\pm$ 0.957	73.6 $\pm$ 95.8
Carnosine	549 $\pm$ 290	607 $\pm$ 383	676 $\pm$ 294
Balenine	2561 $\pm$ 436	2797 $\pm$ 448	2220 $\pm$ 1227

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation ($n=9$).

g, 頭部普通筋では 607 ± 383 mg/100 g, 頭部血合肉様筋では 676 ± 294 mg/100 g と個体差が大きかった。アカマンボウの Ans 含量はミンクジラの 7.26 mg/100 g より高く背肉普通筋で 11.4 ± 1.89 mg/100 g, 頭部普通筋で 10.5 ± 0.957 mg/100 g だったが, 頭部血合肉様筋では 73.6 ± 95.8 mg と個体差が著しく大きかった。Table 3 に示した 2 種のマグロ類の遊離アミノ酸およびイミダゾールジペプチド含量と比較すると His 含量はメバチ ($n=9$) が 575 ± 59.4 mg/100 g, ビンナガ ($n=4$) が 422 ± 137 mg/100 g だったのに対してアカマンボウは背肉普通筋で 0.892 ± 0.458 mg/100 g, 頭部普通筋で 1.55 ± 0.338 mg/100 g, 頭部血合肉様筋では 2.61 ± 2.67 mg/100 g といずれも著しく低かった。Ans 含量もメバチが 1002 ± 94.8 mg/100 g, ビンナガが 874 ± 149 mg/100 g だったのに対して上述のようにアカマンボウの Ans 含量は His 同様に著しく低かった。

Table 3 Free amino acid and imidazole dipeptide contents of dorsal muscles of mink whale *Balaenoptera acutorostrata*, bigeye tuna *Thunnus obesus* and albacore *T. alalunga* (mg/100 g wet weight)

	Mink whale	Bigeye tuna	Albacore
Amino acids			
Taurine	12.1	7.43 ± 1.16	15.9 ± 1.67
Aspartic acid	0.557	0.572 ± 0.966	15.2 ± 4.79
Threonine	2.53	3.93 ± 1.16	2.60 ± 0.909
Serine	2.39	2.91 ± 0.942	1.53 ± 0.402
Glutamic acid	0.959	2.12 ± 1.95	2.54 ± 0.954
Glycine	2.60	7.34 ± 1.91	4.02 ± 0.429
Alanine	22.0	11.9 ± 5.38	11.27 ± 2.24
Valine	4.84	5.64 ± 0.992	3.66 ± 0.755
Methionine	1.36	3.02 ± 0.489	2.70 ± 0.505
Isoleucine	1.52	3.14 ± 0.894	2.23 ± 0.485
Leucine	4.01	5.36 ± 1.21	8.05 ± 1.56
Tyrosine	1.63	2.82 ± 0.713	3.44 ± 1.74
Phenylalanine	0.844	2.41 ± 0.692	2.27 ± 0.608
β-Alanine	2.35	0.213 ± 0.0925	0.454 ± 0.0529
β-Aminoisobutyric acid	0.382	0.0351 ± 0.0261	0.453 ± 0.174
Ethanolamine	0.543	0.112 ± 0.0544	0.205 ± 0.203
Ammonium	31.5	2.43 ± 1.19	9.11 ± 18.2
Ornithine	1.37	0.806 ± 0.226	0.898 ± 0.306
Lysine	1.96	7.69 ± 3.40	2.40 ± 0.516
Histidine	1.59	575 ± 59.4	422 ± 137
3-Methylhistidine	2.86	0.172 ± 0.250	0.509 ± 0.60
Arginine	0.974	0.368 ± 0.390	0.337 ± 0.0856
Hydroxyproline	—	0.132 ± 0.281	0.826 ± 0.443
Proline	2.54	2.38 ± 1.02	0.841 ± 0.155
Imidazole dipeptides			
Anserine	7.26	1002 ± 94.8	874 ± 149
Carnosine	455	5.25 ± 8.96	4.49 ± 1.45
Balenine	1889	ND	ND

Data are presented as mean ± standard deviation (mink whale: $n=1$, Bigeye tuna: $n=9$, Albacore: $n=4$). ND: not detected. (—): trace level.

考 察

加水分解とアミノ酸自動分析計による Bal 定量法の検討 Bal は, Pocchiari *et al.*¹⁵⁾により初めてクジラから分離された。その後 Nakai *et al.*¹⁶⁾や Suyama *et al.*¹⁷⁾の研究などにより魚類には含まれないか含まれていても微量であるのに対してヒゲクジラ類には高含量の Bal が存在することが明らかにされた。Bal が分離された当時のイオン交換クロマトグラフィーではイミダゾールジペプチドと遊離アミノ酸の同時分析は困難だった¹⁸⁾が、現在ではアミノ酸自動分析計により遊離アミノ酸と Ans および Car の同時一斉分析が可能である。一方、

試料に Bal を含む場合、分離ピークが Car と重複するため日立ハイテックスサイエンス株式会社製 L-8900 アミノ酸自動分析計の高分離生体液分析法ではエキスそのままの試料について Bal を含めたイミダゾールジペプチドの一斉分析、定量はできない。イミダゾールジペプチドの分析定量については HPLC による方法が Abe *et al.*¹⁹⁾, 西塔ら²⁰⁾や Mora *et al.*²¹⁾により報告されており、標準品が入手可能であれば Bal の分析、定量は比較的容易に実施可能と考えられる。しかし、近年、我が国では Bal 標準品を販売する薬品製造・販売企業が減少し、筆者が調べた限りでは現在、株式会社浜理薬品工業が受注生産しているのみである。このため、近年、わが国のヒゲクジラ類の Bal 含量を分析、定量した報告では Bal 標準品の入手が困難として飯田らの方法¹²⁾など標準品を利用しない方法によっている。^{22,23)}飯田らが提出した方法は高速液体クロマトグラフやアミノ酸自動分析計を備えていない機関でも加水分解処理したエキスを調製し、受託分析機関に抽出エキスと加水分解エキス中の遊離アミノ酸の分析、定量を発注すれば特殊なオーダーをする必要なくアミノ酸自動分析計に標準で組み込まれている分析法で得られる 3-Mehis 定量値から Bal の含量を遊離アミノ酸や他のイミダゾールジペプチドと同時に知ることが出来る簡便な方法である。しかし、飯田らは Bal の定量性を担保可能な加水分解時間と濃度範囲、および加水分解により Bal から 3-Mehis が等モル生成することを前提とすることの妥当性について言及していない。これらのことから飯田らの方法は簡便ではあるものの精度よく分析、定量する手法としては課題を残すものと考えられた。そこで Bal 標準品を用いて加水分解時間と試料濃度を変えて分析・定量を実施し、より精度よく Bal を定量可能な条件について検討を行った。ペプチドを構成するトリプトファンの定量の例を挙げるまでもなく加水分解時間はペプチドから生成するアミノ酸の定量性に影響すると考えられる。Figure 1(a)に示したように 1 μmol/mL の Bal 標準液を 110°C で 1 から 24 時間の間で加水分解時間を変えたときに生成した 3-Mehis の濃度と加水分解前の Bal 濃度の関係を検証した結果、生成した 3-Mehis は Bal に対して 88–89% (mol%) と概ね一定だった。しかし、Fig. 1(b)に示した加水分解と分析を 6 回繰り返したときのばらつきを検証した結果、加水分解時間を 3 時間としたときの相対標準偏差が最も小さかったことから Bal を精度よく分析するための PCA 抽出エキスの加水分解時間は 3 時間とするのが妥当と考えられた。これにより分析精度が向上したことに加えて、加水分解時間を 24 時間とした場合に較べて処理時間の短縮による効率化を図ることができた。次に定量性を確保可能な試料液中の Bal の濃度範囲について検証した結果、Fig. 2(a)に示したように Bal 標準液濃度

と加水分解後の 3-Mehis 定量値との関係を示す検量線を作成すると Bal 標準液濃度 20 $\mu\text{mol/mL}$ に対する 3-Mehis 濃度が, Bal 標準液濃度が 1.0–10 $\mu\text{mol/mL}$ までの Bal 濃度に対する 3-Mehis 濃度の増加傾向よりも低くなる, いわゆる頭打ちの傾向がみられた。また, Fig. 2(b)に示したように加水分解と分析を 6 回繰り返したときの相対標準偏差は Bal 標準液濃度が 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ のとき 11% と一般的に定量限界の目安とされる 10%¹⁴⁾ を超えたことから本分析法による定量下限は 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ より高い濃度と考えられ, 本研究では検量線作成に使用する標準液濃度の下限を 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ とした。なお, 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ を筋肉湿重量あたりに換算すると 15.2 mg/100 g であり今回分析対象としたアカマンボウやヒゲクジラ類の Bal 含量を勘案すれば定量下限として問題ないと判断した。これらの結果からアカマンボウやヒゲクジラ類のような Bal 含量が高い試料について精度よく Bal を定量するためには試料液の Bal 濃度を 0.05–10 $\mu\text{mol/mL}$ までの間に調整するのが妥当と考えられた。この濃度範囲では, Fig. 2(c)に示したとおり決定係数が $R^2=0.999$, 検量式が $y=0.889x$ と推定精度の高い検量線が得られ, 検量式から加水分解により 3-Mehis は等モルで生成するのではなく, 試料液中の Bal に対して 89% (mol%) の比率で生成することが明らかとなった。以上の検討結果からエキスを分析定量する簡便法としては, 試料液の Bal 濃度を 0.05 から 10 $\mu\text{mol/mL}$ となるように調整して 6 M 塩酸–0.04% 2-メルカプトエタノール中 110°C で 3 時間加水分解し, アミノ酸自動分析計により 3-Mehis を分析して得られた 3-Mehis のモル濃度から加水分解前エキスを分析して得られた 3-Mehis のモル濃度を差し引いた値を 0.889 で除した値を加水分解前試料液中の Bal のモル濃度とする方法を用いるのが妥当と考えられた。

アカマンボウのイミダゾールジペプチド含量と遊離アミノ酸組成 Table 2 に示したとおり供試した 9 個体のアカマンボウの Bal 含量は背肉普通筋で 2561 ± 436 mg/100 g, 頭部普通筋では 2797 ± 448 mg/100 g, 頭部血合肉様筋肉では 2220 ± 1227 mg/100 g だった。背肉および頭部普通筋の Bal 含量は比較対照として Table 3 に示したミンククジラ背肉赤肉の Bal 含量 (1889 mg/100 g) よりも顕著に高かった。辻ら²³⁾はミンククジラの背肉赤肉の Bal 含量を北太平洋沖合で捕獲された 10 個体について 1178 ± 227 mg/100 g, 三陸沖で捕獲された 10 個体について 1461 ± 227 mg/100 g, 釧路沖で捕獲された 10 個体について 1289 ± 205 mg/100 g, 南極海で捕獲されたものについては 1479 ± 146 mg/100 g と報告し, 北太平洋沖合で捕獲されたイワシクジラ *B. borealis* 10 個体の背肉赤肉の Bal 含量を 1481 ± 378 mg/100 g, ニタリクジラ *B. brydei* 10 個体では 1099 ± 133

mg/100 g と報告している。本研究で調べたアカマンボウの Bal 含量は背肉普通筋および頭部普通筋ともに, これらのヒゲクジラ類で報告された値を顕著に上回った。なお, 辻らはこれらのヒゲクジラ類の Bal 含量を飯田らの方法により分析, 定量しておりアミノ酸自動分析計で定量した 3-Mehis と Bal を等モルとしていることから実際の Bal 含量はこれよりも約 13% 程度高い可能性があるが, その場合でも, アカマンボウの Bal 含量は, それらの値を顕著に上回った。Suyama *et al.*¹⁷⁾はナガスクジラ *B. physalus* の Bal 含量を 1465 mg/100 g, イワシクジラで 1751 mg/100 g, ミンクシクジラでは 1874 mg/100 g と報告しており本研究で得られたアカマンボウ背肉および頭部の Bal 含量は, これらの値も顕著に上回った。これまで Bal 含量が顕著に高い水産生物はヒゲクジラ類しか知られておらず硬骨魚類のエキス中には存在しないか存在しても痕跡量^{1,11,16,23,24)}とされてきたが, 本研究の結果から初めてヒゲクジラ類と同等以上の高含量の Bal を含む硬骨魚類が存在することを明らかにした。Car については, アカマンボウの背肉普通筋の含量が 549 ± 290 mg/100 g, 頭部普通筋で 607 ± 383 mg/100 g, 頭部血合肉様筋で 676 ± 294 mg/100 g と個体差は大きかったものの平均値では Car 含量が特に高いとされるウナギ²³⁾やヒゲクジラ類^{17,23)}と同等以上であり, アカマンボウは Bal だけでなく Car 含量も高かった。一方, アカマンボウの Ans と His 含量は上述のように Table 3 に示したメバチおよびビンナガと比較すると Ans 含量はメバチでは 1002 ± 94.8 mg/100 g, ビンナガでは 874 ± 149 mg/100 g だったのに対して, アカマンボウでは背肉普通筋で 11.4 ± 1.89 mg/100 g, 頭部普通筋で 10.5 ± 0.957 mg/100 g, 頭部血合肉様筋で 73.6 ± 95.8 mg/100 g と顕著に低く, His 含量はメバチが 575 ± 59.4 mg/100 g, ビンナガが 422 ± 137 mg/100 g だったのに対してアカマンボウは背肉普通筋で 0.892 ± 0.458 mg/100 g, 頭部普通筋で 1.55 ± 0.338 mg/100 g, 頭部血合肉様筋で 2.61 ± 2.67 mg/100 g とこれも同様に著しく低かった。これらのイミダゾール化合物は生理的 pH 付近で強い緩衝能をもつことが知られ, カツオ, マグロ類など高速遊泳する高度回遊性魚類では摂餌や天敵からの逃亡などの激しい運動を必要とする際に嫌氣的呼吸により筋肉組織の pH が急激に低下するのを抑制する役割を担っていると考えられている。¹⁾ アカマンボウは著しく扁平な体形が特徴的であるが, 標準和名や扁平な体形が似るフグ目 *Tetraodontiformes* マンボウ科 *Molidae* のマンボウ *Mola mola* とは全く異なるアカマンボウ目 *Lamprifores* アカマンボウ科 *Lampridae* に分類される魚種でありマンボウに特有の舵鰭と称される体後端部の上下に伸びる鰭を有さず, 一般的な硬骨魚類にみられる尾柄と尾鰭を備える。²⁵⁾ その生態には不明な点が多

く食性等も良く分かっていない。遠洋はえ縄船の水揚げ時にはアカマンボウがマグロ類と同時に水揚げされる光景が見られるが、漁獲量や利用仕向け先についても統計データが無いために不明である。一方、同じ漁場で混獲され高速遊泳に適した紡錘形の体形をもつマグロ類やカツオ類とは体形が著しく異なり、扁平なうえに体高が高く、魚体容積に対して体表面積が大きいことから遊泳時の抵抗が大きく高速遊泳に適しないと思われ、Bal が高含量存在することは天敵からの逃亡や摂餌時の激しい高速遊泳への適応とは考えにくいと推察された。Runcie *et al.*²⁶⁾はアカマンボウが頭蓋内温度を保持する機能を有することを明らかにし低水温となる深海への鉛直移動に適応するためと推定している。また、Wegner *et al.*²⁷⁾はアカマンボウにアーカイバルタグを装着して遊泳生態を調査し、30 分間に水深 20 m から 100 m への比較的急速な鉛直移動を行うことや、日中にビンナガ個体の 60% が 50 m 以浅に分布したのに対し、アカマンボウでは 90% 以上の個体が水深 50–400 m に広く分布することを報告している。これら研究により明らかにされたアカマンボウの生態およびアカマンボウ目にはアカナマダ科 *Lophotidae* やリュウグウノツカイ科 *Regalecidae* などに属する深海性魚種が含まれること²⁵⁾から Bal が高含量存在するのは、比較的急速な鉛直移動に伴う持続的運動により筋肉の pH が低下するのを抑制するためと推察された。また、カツオ、マグロ類を代表とする高度回遊性魚類の普通筋には一般に His と Ans が高含量存在し、Bal が存在しないのに対して、アカマンボウの筋肉は His および Ans 含量が低く、Bal 含量が顕著に高いことについてはカツオ、マグロ類では水平方向の高速移動に適応するために高含量の Ans と His が存在し、アカマンボウは鉛直移動に適応する何らかの要因があって高含量の Bal が存在することも推察された。しかしながらクジラ類の中でも顕著な鉛直移動を行う生態をもつマッコウクジラ *Physeter macrocephalus* はヒゲクジラ類に比べて Bal 含量が著しく低いことが知られており^{23,28)} Bal 含量と顕著な鉛直移動とを関連付ける証拠を見いだすことは出来なかった。阿部²⁴⁾は、イミダゾール化合物含量に生理的条件の変化が影響すると述べていることから、アカマンボウに高い含量の Bal が存在する理由を明らかにするには生態や生理条件と Bal 含量との関係について知見を蓄積する必要があると考えられた。

アカマンボウに含まれる Bal の活用 イミダゾールジペプチドには抗疲労性などの機能性があることが知られており、動物試験だけでなくヒト試験による多くの研究も行われている。^{29–35)} それらのほぼ全ては Ans と Car を対象としたもので、得られた知見に基づいて製造された Ans や Car を主成分とし抗疲労性を謳ったサプリメント食品が市販されている。Ans と Car は、鶏肉、カ

ツオ、マグロ類に豊富に含まれ、廃鶏やカツオ、マグロ類の不可食部などの安価な原料から容易に抽出可能なことから普及が進んだと考えられる。一方、これまで Bal が豊富に含まれる生物はヒゲクジラ類のみしか知られておらず、Bal の抗疲労性に関しては中島ら⁸⁾および杉野ら⁹⁾によるクジラエキスを対象とした報告があるのみである。現状、調査捕鯨副産物と小規模な沿岸捕鯨漁獲物だけが供給源であるヒゲクジラ類は供給量が限られるうえに価格も鶏肉やカツオ、マグロ類と比較して高価なため、一般に入手することは容易ではないことが Bal を対象とする機能性研究事例が少ない要因と考えられる。しかし、本研究により遠洋はえ縄漁業で混獲される低価値魚であるアカマンボウにヒゲクジラ類を上回る含量の Bal が存在することが明らかとなったことで今後、Bal を対象とした機能性研究が容易に実施可能となると思われる。Bal には Ans や Car では知られていない認知症予防効果に関する報告¹⁰⁾もあることから新たな機能性研究への発展も期待される。また、従来、水産業において主対象魚として扱われず消費者一般の認知度も低かったアカマンボウの健康機能性に関する知見が蓄積されれば、アカマンボウの付加価値化に寄与し漁業収益の改善に貢献することも期待される。現在、筆者らは太平洋の複数のマグロ漁場で異なる季節に遠洋はえ縄船により漁獲されたアカマンボウの Bal 含量の調査を行っている。また、魚体重量のおよそ 50% を占める頭部は不可食部が大部分を占めるため廃棄されていることから、その有効利用のために頭部におけるより詳細な Bal 分布についても調査する予定である。

文 献

- 1) 坂口守彦. 魚介類のエキ成分とその代謝. 「水産生物化学」(山口勝巳編) 東京大学出版協会, 東京. 1991; 80–101.
- 2) 西谷真人, 宗清芳美, 杉野友啓, 梶本修身. 新規抗疲労成分: イミダゾールジペプチド. 日本補完代替医療学会誌 2009; 6: 123–129.
- 3) 原田理恵, 田口靖希, 浦島浩司, 佐藤三佳子, 大森丘, 森松文毅. トリ胸肉抽出物 (チキンエキス) のマウス遊泳持久力に対する効果. 日本栄養・食糧学会誌 2002; 55: 73–78.
- 4) 原田理恵, 浦島浩司, 佐藤三佳子, 大森丘, 森松文毅. カルノシンおよびトリ胸肉抽出物 (チキンエキス) のマウス遊泳疲労回復力に対する効果. 日本栄養・食糧学会誌 2002; 55: 209–214.
- 5) 佐藤三佳子, 鈴木康博, 森松文毅, 高松 薫. トリ胸肉抽出物 (CBEX™) 長期摂取が骨格筋肉中カルノシン濃度と短時間高強度運動パフォーマンスに及ぼす影響. 体力科学 2003; 52: 255–264.
- 6) 佐藤三佳子, 前村公彦, 高畑能久, 森松文毅, 佐藤雄二. 鶏肉抽出物の摂取が中高年齢者の筋力に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌 2012; 59: 182–185.
- 7) 柳内延也, 塩谷茂信, 水野雅之, 鍋谷浩志, 中島光敏. チキンエキス由来アンセリン–カルノシン混合体の抗酸

- 化活性：植物由来抗酸化物質との比較．日本食品化学工学会誌 2004; **51**: 238-246.
- 8) 中島卓真．鯨肉抽出物（バレニン含有）摂取による抗疲労効果．食品と開発 2006; **41**: 62-64.
- 9) 杉野友啓，安永玄太，福田正博．鯨肉抽出物の身体作業負担および日常作業による疲労に対する軽減効果．薬理と治療 2013; **41**: 879-893.
- 10) Wada N, Yamanaka S, Shibato J, Rakwal R, Hirako S, Iizuka Y, Kim H, Matsumoto A, Kimura A, Takenoya F, Yasunaga G, Shioda S. Behavioral and omics analyses study on potential involvement of dipeptide balenine through supplementation in diet of senescence-accelerated mouse prone 8. *Genomics Data* 2016; **10**: 38-50.
- 11) 谷内 透．「魚の科学辞典」朝倉書店，東京．2005; 463-467.
- 12) 飯田 遥，村田裕子，松本五郎，戸田 聡，山下由美子，横山雅仁．ミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*) 可食部成分．中央水産研究所研究報告 1998; **11**: 27-36.
- 13) 北村恭朗．検量線に関わる理論と評価方法について．農薬調査研究報告 2015 Vol. 7, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター，東京．2015; 101-106.
- 14) FAO 分析用語に関するガイドライン (CAC/GL-200)．厚生労働省 2012.
- 15) Pocchiari F, Tentori L, Vivaldi G. The presence of the dipeptide s-alanyl-3-methyl histidine in whale meat extract. *Science Report of Istituto Superiore di Sanità*. Roma Italia. 1962; **2**: 188-194.
- 16) Nakai T, Tsujigado N, Akiya S. Extractives from muscle meat of *Balaenoptera physalus* (Linnaeus). *J. Biochem.* 1963; **54**: 541-549.
- 17) Suyama M, Suzuki T, Nonaka J. Chromatographic determination of imidazole compounds in the whale meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1967; **33**: 141-146.
- 18) 西沢直行，高野 靖，神立 誠．イオン交換クロマトグラフィーによる筋肉中のカルノシン，アンセリン，バレニンの定量．分析化学 1976; **25**: 294-298.
- 19) Abe H, Okuma E. Discrimination of meat species in processed meat products based on the ratio of histidine dipeptides. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 1995; **42**: 827-834 (in Japanese with English abstract).
- 20) 西塔正孝，國崎直道．高速液体クロマトグラフィーによる数種魚類のアンセリン及びカルノシンの測定．女子栄養大学紀要 2004; **35**: 57-59.
- 21) Mora L, Sentandreu MA, Toldra F. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. *J. Agric. Food Chem.* 2007; **55**: 4664-4669.
- 22) Fujino T, Shioda K, Nemoto Y, Ogushi M, Yoshie-Stark Y. Chemical composition of red meat of Baird's beaked whale and antioxidant/ACE inhibitory activities of methanolic extract of the red meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2017; **83**: 607-615 (in Japanese with English abstract).
- 23) 辻 浩司，佐藤暁之，金子博美，安永玄太，藤瀬良弘，野俣 洋．鯨類捕獲調査で得られた鯨類体内におけるイミダゾールジペプチド類の比較（短報）．北海道水産試験場研究報告 2009; **74**: 25-28.
- 24) 阿部宏喜．イミダゾール化合物．「魚貝類のエキス成分」（坂口守彦編）恒星社恒星閣，東京．1988; 66-78.
- 25) 益田 一，尼岡邦夫，荒賀忠一，上野輝也，吉野哲夫．「日本産魚類図鑑一解説」東海大学出版協会，東京，1984; 113-115.
- 26) Runcie R, Dewar H, Hawn DR, Frank LR, Dickson KA. Evidence for cranial endothermy in the opah (*Lampris guttatus*). *J. Exp. Biol.* 2009; **212**: 461-470.
- 27) Wegner NC, Snodgrass OE, Dewar H, Hyde JR. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus*. *Science* 2015; **348**: 786-789.
- 28) Suyama M, Suzuki T, Yamamoto A. Free amino acids and related compounds in whale muscle tissue. *J. Tokyo Univ. Fish.* 1977; **63**: 189-196.
- 29) 田中雅彰，鴨原良仁，藤井比佐子，平山佳伸，渡辺恭良．CBEX-Dr 配合飲料の健常者における抗疲労効果．薬理と治療 2008; **36**: 199-212.
- 30) 清水恵一郎，福田正博，山本晴章．イミダゾールジペプチド配合飲料の日常的な作業のなかで疲労を自覚している健常者に対する継続摂取による有用性—第一次エントリー 207 名の解析結果報告—．薬理と治療 2009; **37**: 255-263.
- 31) Maemura H, Goto K, Yoshioka T, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Takamatsu K. Effects of carnosine and anserine supplementation on relatively high intensity endurance performance. *Int. J. Sport Health Sci.* 2006; **4**: 86-94.
- 32) Takahashi Y, Kawarasaki M, Hoshino Y, Honda H, Enari H. Salmon Muscle extract containing anserine as a suppressor of fatigue in humans. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 2008; **55**: 428-431 (in Japanese with English abstract).
- 33) Terasawa N, Muneda H, Takahashi Y, Koo A, Shiina Y. Effect of a salmon extract containing anserine on exercise performance and anti-lassitude of student athletes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014; **80**: 601-609 (in Japanese with English abstract).
- 34) 住澤知之，河井一明．鰹出汁摂取がヒトの疲労に及ぼす影響の予備的検討．南九州地域科学研究所所報 2014; **30**: 1-5.
- 35) 前村公彦，佐藤三佳子，森松文毅，高松 薫．遅発性筋肉痛および筋疲労感に対する鶏胸肉抽出物（CBEX）摂取の影響．環太平洋大学研究紀要 2008: 83-87.