

# 水産食品におけるジメチルニトロサミン(DMNA)の生成 I.

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	戸沢,晴已 佐藤,理子
発行元	日本水産學會
巻/号	40巻4号
掲載ページ	p. 425-430
発行年月	1974年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 水産食品におけるジメチルニトロサミン(DMNA)の生成—I

スケソウ卵での DMNA 生成におよぼすヘモグロビン  
およびアスコルビン酸塩の影響\*1

戸沢晴巳・佐藤理子

(1974年2月4日受理)

Formation of Dimethylnitrosamine (DMNA) in Sea Foods—I  
Effects of Hemoglobin and Ascorbate on DMNA  
Formation in Alaska Pollock Roe

Harumi TOZAWA\*2 and Mitsuko SATO\*2

With regard to the formation of carcinogenic dimethylnitrosamine (DMNA) in a salted Alaska pollock roe, the effects of the co-existing substances, especially hemoglobin (Hb) and ascorbate, on the formation of DMNA by the reaction between dimethylamine (DMA) and nitrite were investigated.

Apparently, the blood and Hb of carp revealed an accelerative effect on the formation of DMNA when they were added to Alaska pollock roe or to minced halibut flesh together with DMA and nitrite.

The addition of ascorbate to Alaska pollock roe or to halibut flesh, both containing DMA, nitrite and Hb, resulted in a considerable decrease of the amount of DMNA being formed. However, in the flesh sample without Hb, ascorbate caused no change in DMNA production.

The authors concluded that the "inhibitive activity" of ascorbate mentioned above might be regarded as the inhibition of the "accelerative activity" exhibited by Hb, rather than of the reaction between DMA and nitrite.

ニトロサミンの生成あるいはアミンのニトロソ化・ジアゾ化反応については、すでに多くの研究がなされている<sup>1)</sup>が、最近ニトロサミンの発癌性が注目される<sup>2)</sup>ようになって以来、食品中における各種ニトロサミン、特にジメチルニトロサミン(DMNA)の存在や、その分析法に関する研究がとり上げられるようになり、とりわけ水産食品に多くの関心がむけられている<sup>3-8)</sup>。水産食品の中ではたらこ(塩蔵スケソウ卵)がジメチルアミン(DMA)含量が多いために問題とされ、すでにいくつかの報告がなされている<sup>6-8)</sup>。またDMNA生成の条件、反応機構あるいは共存物質の影響なども検討されはじめている<sup>8-11)</sup>。

われわれはそれらの報告から、たらこでは *in vitro* の場合より DMNA が生成されやすい傾向がある点に着目し、たらこの成分中で DMA のニトロソ化反応に影響しそうな物質を検索した結果、血液やヘモグロビン(Hb)がDMNAの生成を促進することを見出した。またニトロソ化反応に関与することが知られ、たらこの添加物としても使用されるアスコルビン酸ソーダ(AHNa)の影響についても検討したので、併せて報告する。

\*1 東海区水産研究所業績 B 第 587 号; 本研究の要約は昭和 47 年度日本水産学会秋期大会(高知)において発表した。

\*2 東海区水産研究所(Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo)

## 実験方法

**供試材料** スケソウ卵は 1972 年 2-3 月に漁獲された、いわゆる北転船ものスケソウ (*Theragra chalcogramma*) から採取し凍結貯蔵したもの、オヒョウ (*Hippoglossus stenolepis*) は 1972 年 6 月漁獲のいわゆる北転船もの(ベーリング西海域)、コイ (*Cyprinus carpio*) は市販の活魚を用いた。

**試料の調製** Hb はコイの血液を遠沈して集めた血球を 1% 食塩水で 3 回洗浄後、蒸留水を加えて 30,000 G, 20 分間遠沈した上澄を用いた (Hb 濃度: 8.8-11.6%)。AHNa はアスコルビン酸 (AH<sub>2</sub>) 水溶液に NaOH を加えて pH 6.0 に調整し、-20°C に凍結貯蔵したものを用いた。

**緩衝液試料 (溶液試料)**—M/10 磷酸緩衝液 (pH 5.9 および 6.0) に各濃度の NaNO<sub>2</sub>, DMA·HCl その他供試物質を添加、アルミ箔で遮光したフラスコに入れ、密栓して各温度に放置後分析に供した。

スケソウ卵およびオヒョウ肉試料—スケソウ卵は卵膜をとつて卵粒をほぐし、オヒョウ肉は血管をできるだけ除去したのちミンチし、いずれもたらこの通常の塩分に合せて NaCl を 8% になるように添加したものを基材とした。これに各濃度の NaNO<sub>2</sub>, DMA·HCl その他供試物質を添加、ピーカーに入れパラフィルムで密封し、5°-10°C に放置後分析した。

**分析法** DMNA の抽出は河端ら<sup>12)</sup> の改良 SEN 法で行なつた。また定量は河端ら<sup>7,13)</sup> のガスクロマトグラフ (GLC) 法を用い、ほぼ同一の条件で測定した。

DMA は銅ジチオカーバメート法<sup>14)</sup>, Hb はシアンメト法<sup>15)</sup> によつてそれぞれ定量した。

## 実験結果

**スケソウ卵試料と溶液試料における DMNA 生成量の比較** DMA のニトロソ化に関する *in vitro* の実験は、通常緩衝液中に適宜濃度の NaNO<sub>2</sub> と DMA·HCl を添加 (この種の試料を以下溶液試料と呼ぶ) して行なっているが、この反応は pH によつて著しく影響され<sup>10)</sup>, たらこの通常の pH 値である 6.0 附近での DMNA 生成量は非常に少ない。しかしはじめに述べたように既往の報告にみられるたらこでの DMNA 生成量は、溶液試料での生成量から類推されるよりも相当高い値を示している (例えば中村ら<sup>8)</sup>)。そこでスケソウ卵に NaNO<sub>2</sub>, DMA·HCl を添加した試料と、同一 pH (5.9) で同濃度の NaNO<sub>2</sub>, DMA·HCl を含む溶液試料とでの DMNA 生成量を比較した。Table 1 に示すように、スケソウ卵試料での DMNA 生成量は、溶液試料の場合よりもはるかに多かつた。

Table 1. Formation of DMNA in Alaska pollock roe and in buffer solution under same conditions

Samples	DMNA (ppb)
Alaska pollock roe* <sup>1</sup> +NaNO <sub>2</sub> +DMA·HCl	90
Buffer solution* <sup>2</sup> +NaNO <sub>2</sub> +DMA·HCl	7

Both samples (pH 5.9), containing NaNO<sub>2</sub> (2.2 mM; 100 ppm as NO<sub>2</sub>) and DMA·HCl (21.4 mM; 300 ppm as N), were incubated at 10°C for 3 days.

\*<sup>1</sup> 8% NaCl added.

\*<sup>2</sup> M/10 phosphate buffer

**DMNA 生成におよぼす血液または Hb の影響** 上の結果は、スケソウ卵には DMNA の生成を促進する何らかの因子が存在することを予測させる。そこで共存物質としての血液や Hb の影響について検討した。まずスケソウ卵試料 (NaNO<sub>2</sub> 添加) に、コイの血液または Hb (血球中の他の成分をも含む) を添加して DMNA の生成量を対照と比較すると、Fig. 1 のように血液、Hb とも明らかに DMNA 生成を促進している。

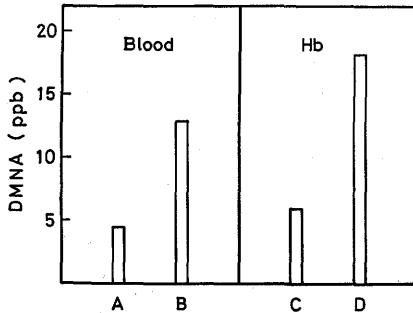
しかし溶液試料に Hb を添加しても全く影響は見られない (Table 2)。この場合 Hb は明らかに NO<sub>2</sub> によつて酸化され、メトヘモグロビン (MHb) に変化していた。しかしスケソウ卵に NaNO<sub>2</sub> を添加すれば、

**Table 2.** Formation of DMNA in buffer solution in the presence and absence of Hb

Additives to buffer solution*	DMNA (ppb)
NaNO <sub>2</sub> +DMA·HCl	44
NaNO <sub>2</sub> +DMA·HCl+Hb	41

The concentrations of NaNO<sub>2</sub>, DMA·HCl and Hb were M/150, M/50 and 0.05% respectively. Incubation was performed at 10°C for 4 days.

\* M/10 phosphate buffer (pH 6.0).

**Fig. 1.** Effects of the blood and Hb of carp added to Alaska pollock roe on the formation of DMNA.

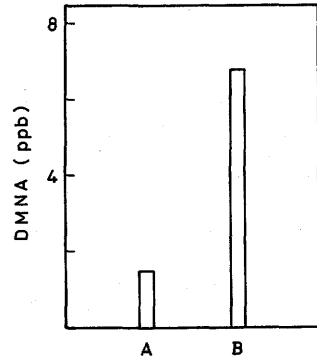
A: Control—Alaska pollock roe (containing 29–34 ppm of DMA-N during the incubation)+ NaNO<sub>2</sub> (0.44 mM; 20 ppm as NO<sub>2</sub>)

B: A+blood (1.5 ml/1,000 g sample)

C: Control—Alaska pollock roe (containing 27–30 ppm of DMA-N during the incubation)+ NaNO<sub>2</sub> (0.44 mM)

D: C+Hb (0.09%)

Incubation: at 5°C for 6 days (A, B) and for 7 days (C, D)

**Fig. 2.** Effect of carp Hb added to halibut flesh on the formation of DMNA.

A: Control—halibut flesh+NaNO<sub>2</sub> (1.1 mM; 50 ppm as NO<sub>2</sub>)+DMA·HCl (3.6 mM; 50 ppm as N)

B: A+Hb (0.18%)

Incubation: at 5°C for 9 days.

周知のようにニトロソヘモグロビン (NO·Hb) が生成し発色する。そこで Hb の“促進作用”が現われるためには、ニトロソヘモグロビンが生成するような条件が必要ではないかと考えたが、溶液試料では適宜な条件が得られなかつたので、基質として自身魚肉 (オヒョウ肉) を用いることとした。

NaNO<sub>2</sub> と DMA·HCl のみを添加した対照オヒョウ肉試料に対し、コイの Hb を添加した試料ではやはり DMNA の生成が著しく多かつた (Fig. 2)。以上の結果からスケソウ卵あるいはオヒョウ肉のような生物試料では、血液や Hb が DMNA の生成を著しく促進することがわかつた。

**DMNA 生成におよぼす AHNa の影響** MIRVISH ら<sup>11)</sup> は、pH 1–4、25°–37°C の溶液中で AHNa が DMNA 生成におよぼす影響について検討し、pH 3–4 では AHNa は抑制的に作用するが、pH 1–2 では殆んど影響がないかあるいは促進的になる場合もあると報告している。われわれはたらこの pH に近い pH 6.0 の溶液試料で、温度および AHNa の濃度を変えて DMNA 生成に対する影響を検討した。Fig. 3 に示すように AHNA の作用は複雑で、反応温度が低い場合 (特に 5°C) は促進的であつたが、温度が高いほど抑制的になり、また、高濃度 (40 mM) のときの方がより抑制的に作用した。

一方、スケソウ卵試料 (NO<sub>2</sub> として 20 ppm 添加) に AHNa を添加すると、DMNA の生成量は Fig. 4 のように著しく減少した。さきに明らかにしたように、スケソウ卵試料では天然に含有している Hb により“促進作用”が生じている筈で、このような試料での AHNa の作用と、溶液試料における作用とは本質的

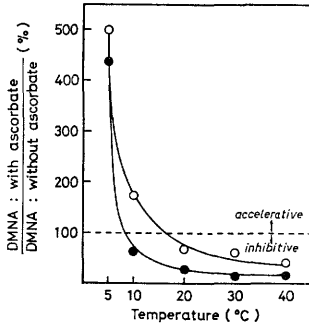


Fig. 3. Effect of ascorbate added to buffer solution on the formation of DMNA. M/10 phosphate buffer (pH 6.0), containing  $\text{NaNO}_2$  (20 mM) and  $\text{DMA}\cdot\text{HCl}$  (20 mM), was used as a control sample. Concentrations of ascorbate were 10 mM (—○—) and 40 mM (—●—). The samples were incubated for 48 hours at 5°, 10° and 20°C for 24 hours at 30° and 40°C.

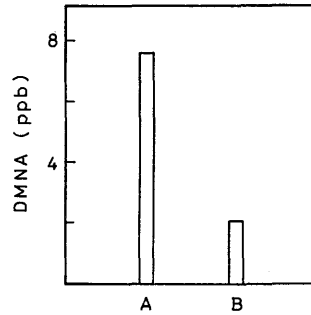


Fig. 4. Effect of ascorbate added to Alaska pollock roe on the formation of DMNA. A: Control—Alaska pollock roe (containing 19–27 ppm of  $\text{DMA-N}$  during the incubation)+ $\text{NaNO}_2$  (0.44 mM; 20 ppm as  $\text{NO}_2$ ) B: A + Na-ascorbate (20 mM) Incubation: at 5°C for 4 days.

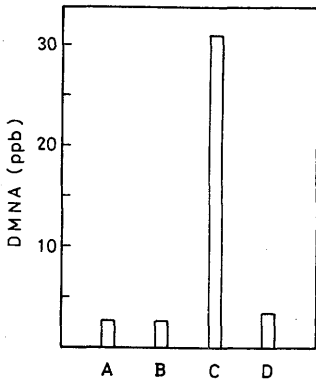


Fig. 5. Effect of ascorbate added to halibut flesh on the formation of DMNA in the presence and absence of Hb. A: Control—halibut flesh+ $\text{NaNO}_2$  (2.2 mM; 100 ppm as  $\text{NO}_2$ )+ $\text{DMA}\cdot\text{HCl}$  (7.1 mM; 100 ppm as N) B: A+Na-ascorbate (20 mM). C: A+Hb (0.20%). D: A+Na-ascorbate (20mM)+Hb (0.20%). Incubation: at 5°C for 6 days.

と、Hb を添加しないオヒョウ試料での生成量 (Fig. 2-A, あるいは実験条件のより近い Fig. 5-A) を比較すると、両者はほぼ同レベルと認められるから、少なくともオヒョウ肉の成分物質は DMNA 生成に対してあまり大きく影響しないと考えてよいであろう。したがってスケツウ卵においても血液以外の成分の影響がさして大きいとは考えられず、Hb の作用をもつとも有力な原因と考えることができよう。

溶液試料中での  $\text{NO}_2\text{-DMA}$  系に対する AHNa の作用はきわめて複雑であり、その反応機構は明らかで

に同じものかどうかは興味のある点である。そこで先に供試したと同じオヒョウ肉試料を用いて、Hb の有無により AHNa がそれぞれどのように影響するかを調べた。

Fig. 5 に明らかなように、Hb が存在しない場合は AHNa を添加しても DMNA 生成量には殆んど影響がなく、Hb が存在すると AHNa は著しく抑制的な作用を示した。この結果からいえば、少なくとも魚肉試料では AHNa は  $\text{NO}_2\text{-DMA}$  の反応系に対するときと、 $\text{NO}_2\text{-DMA-Hb}$  の反応系に対するときとは明らかに異なった作用をするものと考えられる。

## 考 察

スケツウ卵や魚肉のような生物試料では、Hb が存在すると DMNA の生成が著しく促進されることが明らかとなつたが、勿論この結果から直ちに Hb を、たらこで DMNA が生成し易いことの唯一の原因物質と断定することはできない。しかし Table 1 の溶液試料での DMNA 生成量

ない。Mirvish ら<sup>11)</sup>は、この機構を  $\text{NO}_2$  ないし  $\text{N}_2\text{O}_3$  (または  $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ ) に関するアミンとアスコルビン酸塩の competition として説明しているが、これではわれわれの実験結果にもみられる DMNA 生成の促進効果は説明できない。一方、魚肉試料での  $\text{NO}_2$ -DMA-Hb 系に対する AHNa の作用は、少なくとも  $\text{NO}_2$ -DMA 系に対する場合とは異なることが明らかにされたが (Fig. 5)、この反応機構についても現在は明らかにし得ない。しかし Fig. 5 に関するかぎり、Hb の存在する場合の AHNa の作用は「アミン(DMA)のニトロ化反応に対する阻害」を主体として考えるより、「Hb による DMNA 生成の促進作用に対する阻害」を主体として考えた方が妥当と思われる。この場合の DMNA 生成量 (Fig. 5-D) が、Hb, AHNa とともに存在しない対照の値 (A) とほぼ等しくなることは、この考え方に一つの根拠を与えている。スケソウ卵試料における AHNa の作用も、当然同様に考えてよいであろう。なお本研究大要の発表 (47 年度水産学会秋期大会) 時点で、河端ら<sup>7)</sup>が同じくスケソウ卵での AHNa の“抑制作用”について発表しているが、この場合の AHNa 濃度はわれわれの用いた濃度の 1/10 以下 (1.36 mM)、温度は同じく 5°C であつて、Hb の存在しない試料であれば AHNa が“促進的”に働くことも考えられる上記の条件でも、われわれとはほぼ同程度に明瞭な“抑制”効果を認めている。これは AHNa の「Hb の作用に対する阻害」効果を示唆するとともに、実用面からも AHNa の“抑制”効果が、広い濃度範囲にわたつて安定していることを裏付けるものとして極めて興味深い。

Hb と  $\text{NaNO}_2$  の混合系に AHNa を添加すると、 $\text{NO}\cdot\text{Hb}$  が著しく増加することはよく知られている<sup>10)</sup>が (事実 Fig. 5, D の試料は C に比してはるかに強い桃赤色の発色を示した)、上述のようにこの状態のときに Hb の“促進作用”は消失または減少する。また MHb の状態にあるときは明らかに Hb の“促進作用”は認められない (Table 2)。したがつて本研究の実験範囲では、Hb はスケソウ卵や魚肉のような適当な還元力をもつ基質のなかで、 $\text{NaNO}_2$  の存在により「中間的な発色」を示すような状態でのみ“促進的”に作用すると結論づけられる。このように Hb の“促進作用”が Hb の存在状態と密接な関係があるという事実は、促進作用の機作に関して一つの手がかりを与えるものであろう。

## 要 約

塩蔵スケソウ卵における DMNA の生成条件、特に共存物質の影響を明らかにする目的で、 $\text{NaNO}_2$  と DMA を含有する各種試料を調製し、これら試料での DMNA 生成におよぼす Hb と AHNa の影響について検討した。

1. 同一条件 ( $\text{NO}_2$  と DMA の濃度, pH, 反応温度および時間) のスケソウ卵試料と溶液試料の場合、DMNA 生成量はスケソウ卵試料のほうがはるかに多かつた。
2. スケソウ卵およびオヒョウ肉試料にコイの血液あるいは Hb を添加すると、DMNA の生成が著しく促進された。以上の結果から、スケソウ卵で DMNA の生成し易いことのもつとも有力な原因は、Hb の作用であろうと考えた。
3. Hb の DMNA 生成“促進作用”は、 $\text{NO}_2$  存在下での Hb の存在状態と密接な関係があり、“促進作用”の発現は適宜な基質中での一定の発色状態と対応する。
4. 溶液試料に添加した AHNa の作用は複雑であり、反応温度や AHNa 濃度により促進、抑制の両様の影響をおよぼした。一方、スケソウ卵試料では、AHNa は明らかに DMNA の生成を抑制した。
5. オヒョウ肉試料に AHNa を添加すると、コイ Hb が存在しない場合は DMNA 生成に殆んど影響がなく、Hb が存在する場合は明瞭な“抑制作用”を示した。このことから、スケソウ卵などのように Hb の存在する場合の AHNa の作用は「アミンのニトロ化に対する阻害」とみるよりも、「Hb の“促進作用”に対する阻害」と考えるほうが妥当であろうと結論した。

稿を終るに当り DMNA の定量に関し懇切なる御指導と御援助を頂いた予防衛生研究所河端俊治博士ならびに石橋 亨氏に対し深謝の意を表す。

## 文 献

- 1) J. H. RIDD: *Quart. Rev. Chem. Soc.*, **15**, 418-441 (1961).
- 2) P. N. MAGEE and J. N. BARNES: *Advances Cancer Res.*, **10**, 163-246 (1967).
- 3) J. W. HOWARD, T. FAZIO, and J. O. WATTS: *J. AOAC*, **53**, 269-274 (1970).
- 4) T. FAZIO, T. N. DAMICO, J. W. HOWARD, R. H. WHITE, and J. O. WATTS: *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 250-253 (1971).
- 5) N. P. SEN, L. A. SCHWINGHAMER, B. A. DONALDSON, and W. F. MILES: *ibid.*, **20**, 1280-1281 (1972).
- 6) 酒井綾子・谷村顕雄: 食衛誌, **12**, 463-464 (1971).
- 7) 河端俊治・栗原道彦・葛西英一・吉田千恵子: 本誌, **39**, 883-889 (1973).
- 8) 中村全良・臼杵睦夫・福見 徹: 北水誌月報, **29**, 29-39 (1972).
- 9) 酒井綾子・谷村顕雄: 食衛誌, **12**, 170-176 (1971).
- 10) S. S. MIRVISH: *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633-639 (1970).
- 11) S. S. MIRVISH, L. WALLCAVE, M. EAGEN, and P. SHUBIK: *Science*, **177**, 65-68 (1972).
- 12) 河端俊治・松居正巳・中村昌道・石橋 亨: 本誌, **40**, 79-85 (1974).
- 13) 河端俊治・松居正巳・石橋 亨・中村昌道: 分析化学, **21**, 1326-1332 (1972).
- 14) W. J. DYER and Y. A. MOUNSEY: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6**, 359-367 (1945).
- 15) D. L. DRABKIN: *Am. J. Med. Sci.*, **209**, 268-270 (1945).
- 16) B. M. WATTS and B. T. LEHMANN: *Food Res.*, **17**, 100-108 (1952).