

魚粉におけるニトロソチアゾリジンの生成機構

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	戸沢, 晴巳 河端, 俊治
巻/号	53巻12号
掲載ページ	p. 2209-2216
発行年月	1987年12月

魚粉におけるニトロソチアゾリジンの生成機構^{*1}戸沢晴巳^{*2}, 河端俊治^{*3}

(1987年6月26日受理)

Mechanism of *N*-Nitrosothiazolidine Formation at the Stage of Fish Meal Preparation

Harumi Tozawa and Toshiharu Kawabata

Both cysteamine (CysA) and thiazolidine (THZ) are considered to be the precursors of *N*-nitrosothiazolidine (NTHZ). Regarding the occurrence of these compounds in foods, however, almost no data has been available so far. Present study has revealed the existence of about 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of CysA in fresh sardine meat, while the CysA content in the meat decreased below 30% of the initial level after being boiled, and only 5% of CysA was retained in the meal samples after freeze-drying of the boiled meat. On the contrary, very small quantity of THZ were detected in the fresh sardine meat, however, the contents remarkably increased upon boiling to reach 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the levels did not change even after lyophilization. Fish meal samples made from whole bodies of fresh sardines were found to contain larger amounts of THZ than those of CysA, in contrast; the THZ levels in the samples made from decomposed fish were apparently lower than those made from fresh materials. It was confirmed that nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid (NTZC) was formed in the sardine meal samples after treatment with NO_2 gas, and the yield of NTZC reduced by lowering the freshness of raw fish materials. Based on the aforementioned results, it may be proposed that the following two pathways exist in the formation of NTHZ in fish meal during manufacturing process, viz., (1) formation of NTHZ by nitrosation of THZ, and (2) formation of NTHZ by decarboxylation of NTZC.

前報^{1,2)}に述べたように、魚粉に含有される主要な揮発性ニトロサミンのうち、ニトロソジメチルアミン (NDMA) およびニトロソピロリジン (NPYR) については、その生成機構はほぼ明らかにされている。しかし、ニトロソチアゾリジン (NTHZ) については、前駆体を含め、その生成機構はいまだに明らかにされていない。NTHZ 生成についての第1の可能性としては、システアミン (CysA) とホルムアルデヒド (FA) からチアゾリジン (THZ) が生成され、次いでそれがニトロソ化される経路が考えられる。しかし、従来ベーコンを中心とする食品やその原料からは、CysA あるいは THZ は検出されていない。第2の可能性としては、システインと FA が反応してチアゾリジン-4-炭酸 (TZC) が生成され、これがニトロソ化されてニトロソチアゾリジン-4-炭酸

(NTZC) となり、さらに高温で加熱することにより分解 (脱炭酸) され、NTHZ となる経路である。この経路による NTHZ 生成は、ニトロソプロリンから NPYR が生成する機構と類似しており、ベーコンの調理加熱の際に NTHZ が増加するのは、この生成機構によるものと考えられている。^{3,4)} しかし、NTHZ は NPYR と異なり、加熱前の生ベーコンからも検出される⁵⁾ので、最近では CysA からの生成経路についても、再検討の必要性が指摘されている。⁶⁾ 魚粉の場合はすでに述べた¹⁾ように、NTHZ 生成に関する諸条件はベーコンとはかなり異なっているが、前記2つの生成経路についてはやはり解明する必要がある。本報においては、特に CysA および THZ の存在の有無に留意し、魚粉における NTHZ の生成機構につき検討を加えた。

*1 魚粉における揮発性ニトロサミンの存在および生成—III (Occurrence and Formation of Volatile *N*-Nitrosamines in Fish meal—III).

*2 東京大学農学部水産化学教室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113, Japan).

*3 国立予防衛生研究所 (National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa, Tokyo 141, Japan).

実験方法

マイワシ肉試料の調製 築地魚市場で購入したきわめて新鮮(漁獲1日後)なマイワシ(平均尾叉長 20.4 cm, 平均体重 116.2 g)の皮および大部分の皮下脂肪を除去し, 肉部(普通肉および血合肉)約 600 g を 0°C に冷却しながらミンチしてよく混和し, この約 1/3 量を生試料とした。残りを約 65 g ずつ6枚のラミネートフィルム製の袋につめ, 軽く脱気した後, 約 15 l の沸とう水中に入れ, 再沸とう 15 分後に取り上げて冷却した。この約 1/2量は煮熟試料とした。残りは直ちに凍結して真空凍結乾燥器で乾燥し, これをイワシ肉魚粉試料とした。これらの試料は, ガス不透過性のラミネートフィルム袋に入れ(魚粉試料は脱酸素剤を封入し脱気), -70°C に保存した。この各試料の水分量は, 生試料 67.2%, 煮熟試料 67.1%, 魚粉試料 2.54% であった。

マイワシ試験魚粉の調製 前報²⁾で調製した2種の原料マイワシ鮮度別の試験魚粉(魚粉AおよびB)を, -70°C に保存したものをを用いた。魚粉Aは 10°C 貯蔵 0, 2, 7 日の各原料マイワシから調製した試料(以下 0, 2, 7 日試料と略称), 魚粉Bは同じく 10°C 貯蔵 0, 2, 4, 7 日の各原料から調製した試料(以下 0, 2, 4, 7 日試料と略称)を用いた。なお魚粉Aは身粕魚粉を, 魚粉Bでは身粕魚粉および全魚粉を用いたが, これらの調製法についても前報²⁾に記載した。

魚粉試料の NO₂ ガス処理 前報²⁾と同様にして, 魚粉試料を NO₂ ガスと反応させた。

標品および試薬 NTHZ は前報²⁾と同様にして調製した。NTZC は Lijinsky らの方法⁷⁾によって調製した。システアミン塩酸塩(CysA·HCl)は東京化成 KK 製, THZ は Aldrich Chemical Co. Inc. 製, コエンザイム A (CoA) Na 塩は Sigma Chemical Co. Ltd. 製, システインは和光純薬 KK 製のものをそれぞれ用いた。ジフェニルエチレンジアミン(DPED)試薬は, 東京化成 KK 製の DPED 1 g を 100 ml の氷酢に溶解し, 蒸留水を加えて 250 ml としたものをを用いた。

CysA および THZ の定量方法 試料溶液中の CysA を FA と反応させて THZ とし, はじめから存在する THZ とともに酸性条件下で亜硝酸(NO₂⁻)と反応させてニトロソ化し, 生成した NTHZ を定量する方法を用いた。

試料溶液の調製 マイワシ肉の生および煮熟試料は, 60 g に 100 ml の 5% 三塩化酢酸溶液を加え(各魚粉試料の場合は 10 g に 80 ml), ブレンダー(ポリトロン)で氷冷しながら 5 分間攪拌し, 遠心分離して得た抽出液を用いた。これらの抽出液から正確に等量の 2 部(生および煮熟試料の場合は各 50 ml, 魚粉試料の場合は各 30

ml) をとり, 一方は CysA 定量用, 他方は THZ 定量用とした。

定量方法 CysA 定量用試料溶液は NaOH 溶液で pH 7.0 に調整した後, 250 μmol/ml の FA 水溶液(37% 原液の 50 倍稀釈液) 2 ml を加え, 室温にて 1 時間放置後 1 M NaNO₂ 2 ml を加え, 三塩化酢酸溶液で pH 2.0 に調整し, 25°C に 1 夜(15 時間)放置して反応させた。

THZ 定量用試料溶液には, この中に存在する CysA と FA とが操作中に反応するのを防ぐため, DPED 試薬 1 ml を加え, 室温に 30 分間放置後, 30 ml のエーテルで 2 回抽出して余剰の DPED を除去し, この溶液に対して上記と同様に NaNO₂ を添加し, 1 夜放置して反応させた。

ニトロソ化反応終了後の上記 2 種の試料溶液に, それぞれスルファミン酸アンモニウム 2 g を添加して NO₂⁻ を除去し, さらに NaOH 溶液を加えて pH 6.5 とし, 次いでそれぞれ 40 ml のジクロロメタンで 2 回抽出し, これを合してクデルナ・ダニッシュ装置で濃縮して 0.5 ml の定容とし, NTHZ 分析用試料液とした。この試料液中の NTHZ は, 前報¹⁾に記載した熱エネルギー分析装置を付したグスクロマトグラフ(GC-TEA)によって分析した。なおこの NTHZ 値から, 定量操作のはじめに供した試料溶液中の THZ および CysA 量を求める計算は次の通りである。

THZ 量 = THZ 用試料溶液より得られた

$$\text{NTHZ 量} \times \frac{\text{THZ 分子量 (89)}}{\text{NTHZ 分子量 (118)}}$$

CysA 量 = (CysA 用試料溶液より得られた NTHZ 量 - THZ 用試料溶液より得られた

$$\text{NTHZ 量}) \times \frac{\text{CysA 分子量 (77)}}{\text{NTHZ 分子量 (118)}}$$

FA の定量 倉田の方法⁸⁾によって行った。

NTZC の定量 魚粉試料 2 g をとり, 蒸留水 30 ml, 1 M スルファミン酸アンモニウム 1 ml を加え, よく混和したのち, アセトン 200 ml を加えホモジナイズした。次に濾過し, 濾液を水浴温度 45°C 以下で約 30 ml にまで減圧濃縮した。濃縮物を pH 8.0 に調整し, n-ヘキサン 20 ml で 2 回洗い, 水層を pH 1~2 に調整したのち, NTZC を酢酸エチル 50 ml で 3 回振とう抽出した。酢酸エチル層を合し, 無水硫酸ナトリウムで脱水したのち, 水浴温度 45°C 以下で約 1~2 ml まで減圧濃縮した。

上記の濃縮物を少量の酢酸エチルでシリカゲルカラム(メルク製シリカゲル 60 を 105°C で 1 昼夜活性化後, その 5 g を 5% 含水させ, 1.5 cmφ×30 cm のクロマト管に酢酸エチルを用いて充てんしたもの)に添加し, ジ

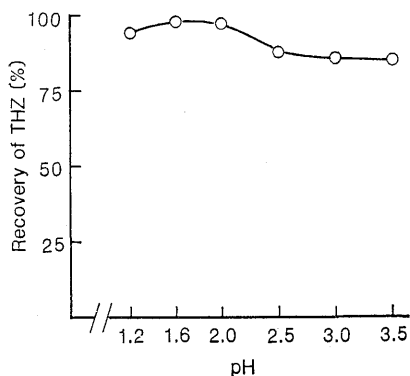


Fig. 1. Effect of pH on the formation of nitrothiazolidine (NTHZ) from thiazolidine (THZ) and NaNO_2 .

The pH of test solutions each containing $10 \mu\text{g}$ of THZ and 2 mmol of NaNO_2 were adjusted from 1.2 to 3.5, then nitrosation of THZ was performed overnight at 25°C . Nitrothiazolidine formed was extracted twice with dichloromethane, and analyzed by a GC-TEA. The recoveries of THZ are calculated based on the values of NTHZ.

クロルメタン 100 ml を流下させ、次に 30% エタノール・酢酸エチルで NTZC を溶離させた。溶離液は 45°C 以下で減圧濃縮し、この濃縮物全量を 10 ml 容試験管に移し、溶媒を留去したのち、ジアゾメタン・エーテルを加えて NTZC をメチルエステル化した。 N_2 ガスで溶媒を留去したのち、乾固物を 1 ml のアセトンに溶解し、これを GC-TEA 分析に供した。なお GC の分析条件は、充てん剤が 5% DEGS-0.5% H_3PO_4 /ChromosorbW (60~80 mesh), カラムは $3 \text{ mm}\phi \times 2 \text{ m}$ のガラスカラム, カラム温度は 170°C であった。

結 果

CysA および THZ の定量条件の検討 実験方法の項に述べたように、本報における CysA および THZ 定量法には、CysA-FA および THZ- NO_2^- の反応を用いた。はじめにこの 2 種の反応の条件、特に最適 pH についての検討を行った。

Fig. 1 に THZ- NO_2^- 反応における pH の影響を示した。本報ではこの反応による NTHZ 生成率を、極力 100% に近づけるよう反応時間を長くしたこともあって、この pH の領域 (1.2~3.5) では生成率に大きな差は見られなかったが、pH 1.6~2.0 の範囲における値がもっとも大であった。反応中に試料溶液の pH がやや下ることを考慮し、定量操作は pH 2.0 で行うこととした。

一方、CysA-FA の反応については、Hayashi ら⁹⁾は

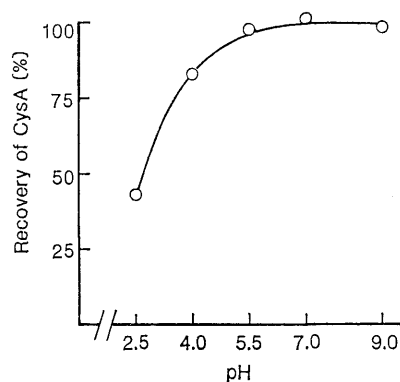


Fig. 2. Effect of pH on the formation of THZ from cysteamine (CysA) and formaldehyde (FA).

Each of test solutions containing $10 \mu\text{g}$ of CysA (HCl salt) and 0.5 mmol of FA was adjusted to pH from 2.5 to 9.0, and kept at room temperature for 1 h. Then, each solution was adjusted to pH 2.0, and nitrosated in the same manner in the footnote of Fig. 1.

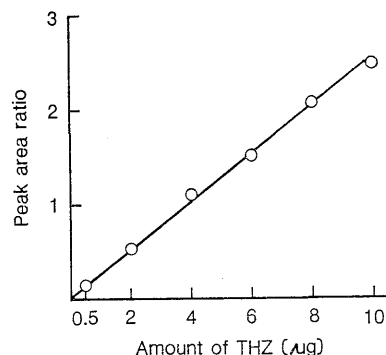


Fig. 3. Calibration curve for THZ.

THZ was nitrosated at pH 2.0, then the formed NTHZ was analyzed by a GC-TEA under the same conditions as the footnote of Fig. 1.

FA の定量にこの反応を適用している。Hayashi らはその際に最適 pH 値について検討し、pH 8.0 以上で THZ 生成率が最大に達するとして、定量法には pH 8.0 を採用している。しかし、本報における検討結果は Fig. 2 に示したように、pH 5.5 以上で THZ 生成率が最大となることがわかった。そこで反応の確実性を考慮して、pH 7.0 を採用することとした。

THZ 定量における検量線は Fig. 3 のように、試料溶液中 $0.5 \sim 10 \mu\text{g}$ の範囲では原点を通る直線性を示した。また、THZ 標品を磨砕したマイワソ肉に添加し抽出を行ったところ、ほぼ 100% 回収されること、ならびに三塩化酢酸、DPED 試薬、エーテル抽出操作などの妨害はないことを確めた。なお、CysA と同じく SH 基をもつ

Table 1. Contents and molar ratios of CysA and THZ in raw, boiled and meal samples of sardine meat

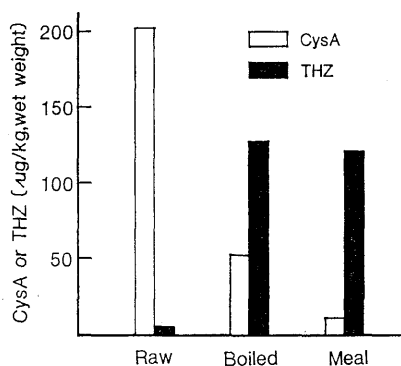
Sample	(A) CysA		(B) THZ		Molar ratio	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	$\mu\text{g}/\text{kg}$	($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	(A)/(B)	(A)/(A)+(B) (%)
Raw* ¹	203	(2.64)	5.7	(0.06)	41.3	97.8
Boiled* ²	55.4	(0.72)	128	(1.44)	0.50	33.3
Meal* ³	34.2	(0.44)	372	(4.18)	0.11	9.5

Sardine meat samples were prepared as follows:

*¹ Raw meat sample: About 600 g of ordinary and dark muscles obtained from very fresh sardines were minced twice, and mixed thoroughly.

*² Boiled meat sample: Two-thirds of the raw meat sample were packed in several plastic pouches, and boiled for 15 min.

*³ Meal sample: One half of the boiled samples were freeze-dried.

**Fig. 4.** Changes in the CysA and THZ contents at different stages of sardine meat samples.

CysA or THZ contents in the boiled meat and meal samples were calculated on the basis of wet weight.

システム、および CysA を構成基とする CoA (CoA) 標品 (Na 塩) について、この定量法に対する影響を検討したが、妨害は全く認められなかった。

生鮮マイワシ肉の煮熟および魚粉化工程における CysA および THZ の消長 はじめに冷凍マイワシ肉および前報²⁾の実験で使用した試験魚粉について、CysA および THZ 定量の予備実験を行い、これら両物質の存在を確認した。次いで実験方法の項に記したマイワシ肉の生、煮熟および魚粉試料について、CysA および THZ 含有量の分析を行い、その結果を Table 1 に示した。マイワシ肉の生試料では、CysA 含有量は THZ 量よりはるかに多く、モル比で THZ の 40 倍であり、同じくモル量において両者の合計値の 98% を占めた。しかし、CysA の占めるこの比率は煮熟によって 33% (THZ の 1/2) に、さらに魚粉試料では 10% (THZ の 1/9) にまで減少した。

Table 1 の CysA および THZ の値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) は、水分量の異なる各試料における含有濃度なので、そのままでは各試料間の量的比較はできない。そこで、実験方法の

Table 2. Formaldehyde contents in various sardine meat samples

Sample* ¹	Moisture (%)	Formandehyde	
		$\mu\text{g}/\text{g}$	$\mu\text{g}/\text{g}$, wet weight* ²
Raw	67.2	2.15	2.15
Boiled	67.1	1.49	1.49
Meal	2.54	2.08	0.70

*¹ See the footnote of Table 1.

*² FA contents in the boiled meat and meal samples were calculated on the basis of wet weight.

項に記した各試料中の水分量にもとづき、煮熟および魚粉試料中の CysA および THZ 濃度を、生試料中の濃度に換算した。Fig. 4 にはこの換算した値を用いて、はじめに生試料中に存在した CysA および THZ 量が、煮熟および魚粉化の工程によりどのように変化するかを示した。Fig. 4 から明らかなように、CysA は煮熟によってはじめの 30% 以下に、さらに魚粉化の工程ではじめの約 5% にまで急激に減少した。これに対し、THZ は煮熟によって 20 倍以上に急増し、その値は魚粉化によってもほとんど変化しなかった。

マイワシ肉各試料中の FA 含有量 マイワシなどの海産魚類試料にはトリメチルアミノオキシド (TMAO) の分解により生成した FA が含有され、これが CysA と反応して THZ を生成するものと思われる。そこで、上述したマイワシ肉各試料における FA の存在を確認し、あわせて CysA および THZ の消長との関連を見るため、FA の分析を試みた。結果は Table 2 に示したように、各試料とも FA の存在が認められた。Table 2 の右欄には、煮熟および魚粉試料の重量を生試料に換算したときの FA 値を示したが、煮熟試料中の FA 量は生試料中の含量よりかなり減少し、また、魚粉試料ではこれより更に減少した。この結果は、煮熟試料については、Fig. 4 に示した CysA の減少、THZ の増加という結果と対応したが、魚粉試料に関してはそのような関連は見られなかった。

Table 3. CysA and THZ contents in the meal samples, and the formation of NTHZ in those samples after treatment with gaseous NO₂*¹

Meal sample	CysA μg/kg	THZ μg/kg	NTHZ μg/kg
Sardine meat meal* ²	34.2	372	169
Meal-B (0 day)* ³	71.0	680	217
Meal-B (7 days)* ³	299	101	51.8
Meal-A (0 day)* ³	6.1	50.2	
Meal-A (7 days)* ³	88.4	4.6	

*¹ Meal samples (5 g) added with gaseous NO₂ (2.5 ml at 30°C) were heated in sealed vessels at 120°C for 60 min.

*² See the footnote of Table 1.

*³ Meal-A samples were made from whole bodies of medium-sized sardines previously stored at 10°C for 0, 2 or 7 days, and meal-B samples were made from large-sized ones stored at 10°C for 0, 2, 4 or 7 days.

種々の魚粉試料における CysA および THZ 含有量と NTHZ 生成量 前報²⁾ で用いた試験魚粉 (魚粉 A および B, 身粕魚粉) の一部についても, 先に示したマイワシ肉魚粉試料と同様にして CysA および THZ の含有量を測定し, またこれらの魚粉試料を前報²⁾ と同様な NO₂ ガスを添加, 加熱する方法 (魚粉 5 g, NO₂ 2.5 ml, 120°C, 60 分加熱) で処理し, その際に生成される NTHZ の分析を行った。これらの結果は Table 3 に示した。これに見られるように, 試験魚粉においても, 新鮮魚体より調製したもの (0 日試料) では, 今回調製したマイワシ肉魚粉と同様に, THZ の含量は CysA に比してはるかに大であった。しかし, 鮮度低下の著しい魚体を原料とするもの (7 日試料) では, THZ は 0 日試料に比してはるかに小となる一方, CysA の含量は魚粉 A, B とも 0 日試料に比してかなり大きな値となった。

つぎに Table 3 の結果と関連して, 魚粉試料に NO₂ ガス処理を行った場合の, NTHZ の前駆体ないしその関連物質からの NTHZ 生成率につき検討を加えた。すなわち, THZ, CysA·HCl および CoA (Na 塩) の各標品を上記の各魚粉試料に添加し, 同一条件下で NO₂ 処

理を行ない, それら各物質より生成する NTHZ 量, およびその生成率を求めた。各供試標品の水溶液 100 μl をそれぞれ魚粉試料 5 g に添加, よく混合したものを試料とした。対照にはこの量比で蒸留水を添加したものを用いた。得られた結果は Table 4 に示したが, マイワシ肉魚粉および魚粉 B (0 日試料) の場合とも, THZ よりの NTHZ 生成率は 35 ないし 22% という高い値を示し, それに対し CysA·HCl 添加の場合は 2% 台と低かった。一方, CoA 添加による NTHZ 生成率は, CysA·HCl の場合よりかなり高い値を示した。これらの結果から見て, マイワシ肉魚粉や魚粉 B-0 日試料のように, THZ 含量が CysA に比してはるかに大きいものでは, NTHZ 生成の前駆体関連物質としての CysA その他の存在は, 実際的には無視し得るものと考え, Table 3 に示した THZ および NTHZ の値から THZ のニトロソ化率を計算すると, マイワシ肉魚粉では 34.3%, 魚粉 B-0 日試料では 24.0% となり, Table 4 に示した THZ 標品のニトロソ化率に近い値となった。

NTZC よりの NTHZ の生成 すでに述べたように, ベーコンの調理加熱における NTHZ の生成については, NTZC が主要な生成源とみなされているので, NO₂ 処理魚粉における NTZC のレベル, および原料魚の鮮度によるその量的変化について検討した。Table 5 には魚粉 B (身粕魚粉および全魚粉) を, Table 3 の場合と同様に NO₂ 処理した試料中の NTZC 含量を示した。このレベルは原料鮮度のよい 0 日試料においては, 同じ試料中の NTHZ のレベル (Table 3) よりかなり高かった。また, NTHZ における傾向と同様に, 原料魚体の鮮度低下とともに NTZC 量も急激に減少した。

次に NTZC 標品を魚粉試料に添加・加熱して, 生成する NTHZ の収率を Table 6, 7 に示した。Table 6 は, NTZC 標品 (455 μg を含有する水溶液 100 μl) を添加した魚粉試料 (5 g) に, NO₂ ガス (2.5 ml) を添加し加熱した場合の結果である。魚粉 A と B とではかなりの

Table 4. Formation of NTHZ from authentic THZ, CysA·HCl and coenzyme A (CoA) in the meal samples by reaction with gaseous NO₂*¹

Meal sample	Authentic reagents added			NTHZ formed	
	THZ (μg)	CysA·HCl (expressed as μg of CysA)	CoA	Net weight* ⁴ (μg)	Formation rate (%)
Sardine meat meal* ²	10.6			4.99	35.5
Meal-B (0 day)* ³	10.6			3.09	22.0
Meal-B (0 day)		9.88		0.34	2.2
Meal-B (0 day)			8.59	1.07	8.1

*¹ Meal samples (5 g) containing each 100 μl of aqueous solution of THZ, CysA·HCl or Co A were treated with gaseous NO₂ under the same conditions shown in the footnote *¹ of Table 3. Control samples containing each 100 μl of distilled water were treated with NO₂ in the same manner described above.

*² See the footnote of Table 1.

*³ See the footnote *³ of Table 3.

*⁴ Net NTHZ values were obtained by subtracting the NTHZ contents of the respective control sample from the values of test samples.

Table 5. Amounts of nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid (NTZC) formed in the NO₂-treated meal-B samples*¹

Meal sample* ²	NTZC (μg/kg)			
	Storage days of raw fish* ³			
	0	2	4	7
Ordinary meal	800	620	270	10
Whole meal		650	190	130

*¹ The conditions of NO₂-treatment and the meal-B samples were shown in the footnote *¹ and *³ of Table 3, respectively.

*² Preparation methods of ordinary and whole meal samples were noted in the previous paper.²⁾

*³ See the footnote *³ in Table 3.

Table 6. Formation ratios of NTHZ from authentic NTZC in the meal samples by reaction with NO₂*¹ at different heating temperatures

Meal sample* ²	Formation ratios of NTHZ* ³ (%)	
	120°C	
	120°C	160°C
Meal-A (0 day)	4.1	2.0
Meal-A (2 days)	5.2	
Meal-B (0 day)	2.2	8.7
Meal-B (2 days)	2.8	10.0

*¹ Each meal sample (5 g) added with authentic NTZC solution (455 μg in 100 μl of distilled water) was reacted with gaseous NO₂ (2.5 ml at 30°C) at 120°C or 160°C for 60 min.

Control samples added with each 100 μl of distilled water, and treated in the same manner described above.

*² See the footnote *³ of Table 3.

*³ The formation ratios were calculated according to the amounts of NTHZ produced from the authentic NTZC added. These values were obtained by subtracting the NTHZ values of the control samples from those of the NTZC added samples.

差が認められ,特に高温(160°C)での結果を見ると,魚粉AにおけるNTHZ生成率は低温(120°C)に比してむしろ減少し,魚粉Bでは反対に増大するため,その差はさらに著しくなった。Table 7には,試料処理の際のNO₂添加の有無によるNTHZ生成率を比較したが,処理温度120°CではNO₂の有無でほとんど差がないのに

対し,160°CではNO₂無添加の場合の生成率は著しく低くなった。

考 察

CysAはCoA,あるいはパンテチンの構成成分として早くから知られており,^{10,11)}いわゆるradioprotection機能などの生理活性についての研究は非常に多い。またCysAの分析法についても,近年かなり多くの報告がなされている。¹²⁻¹⁵⁾しかし,生物体におけるCysA存在量については,マウス各組織に関しきわめて僅かな報告^{16,17)}があるのみで,食品やその原料中のCysA量に関する研究は見当たらない。またTHZについても,かなり有効な分析方法の報告¹⁸⁾はあるものの,生物体試料における存在量の報告はなされていない。このことはすでに述べたように,ベーコンに含有されるNTHZの生成機構が明らかにされていないことの大きな要因となっている。この意味で,今回われわれがマイワシ肉や魚粉試料におけるCysAおよびTHZの存在と,その含有量を明らかにしたことは,食品を含めた生物体試料でのNTHZ生成機構につき,新しい知見を加えたこととなる。

THZはCysAとは対照的に,きわめて鮮度の高いマイワシ生肉中にはほとんど存在せず,魚粉製造工程,特に煮熟中にCysAから生成することが明らかとなった。ただしこの結果は,一般に生の魚体中におけるTHZの存在を否定するものではなく,煮熟を行わない魚体中においてもTHZは徐々に生成するようである。このことは冷凍マイワシ(-70°C,約6ヶ月貯蔵)の肉から,かなりの量のTHZ(48 μg/kg)が検出されたことから裏付けられる。

THZの生成は実験結果が示すように,マイワシ試料自体に含有されているFAと,CysAとの反応によることは明らかである。このFAはTMAOに由来しているから,このような形でのTHZの生成は,海産魚類試料に特有のものと考えられる。一方,魚粉のNO₂処理によりNTZCが生成することから,その前駆体である

Table 7. Comparison of the formation ratios of NTHZ from authentic NTZC in the meal samples heated at different temperatures with or without gaseous NO₂

Meal* ¹ Samples	Formation ratios of NTHZ* ² (%)			
	Heated at 120°C		Heated at 160°C	
	With NO ₂ * ³	Without NO ₂ * ⁴	With NO ₂ * ³	Without NO ₂ * ⁴
Meal-A (0 day)	4.1	4.2	2.0	0.2
Meal-B (2 days)	2.8	2.6	10.0	2.8

*¹ See the footnote *³ of Table 3.

*² See the footnote *³ of Table 6.

*³ The samples were treated with NO₂ under the same conditions shown in the footnote *¹ of Table 6.

*⁴ The samples were heated under the same conditions shown in the footnote *¹ of Table 6 except the NO₂-treatment.

TZC の生成についても、魚類試料中の FA が関与するものと思われる。

前報²⁾では、原料マイワシの鮮度低下（または放置時間の増大）にともなう、魚粉の NO₂ 処理による NTHZ 生成量が減少することを明らかにした。今回はさらに、その場合（NO₂ 処理前）魚粉中の CysA は増加するが THZ は減少し、これとともに NTHZ 生成量も減少することが示された（Table 3）。また、Table 4 に示した各物質からの NTHZ 生成率の比較においても、THZ の場合は、CysA や CoA に比して生成率が最も高かった。これらの結果は、魚粉における NTHZ 生成に関与する主要なアミン系の前駆体は、THZ であることを示唆するものである。なお、NTHZ 生成率において、CoA が CysA よりもかなり高い値を示す点は注目されるが、煮熱や乾燥などの工程をへて作られる魚粉においては、残存する CoA があつたとしても、その量はかなり少ないものと思われる。

NTZC の存在量という点では、一般にベーコンにおける NTZC の含有レベルは NTHZ に比してかなり高く、^{3,4,10)} 加熱調理したベーコンでは数千 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のレベルのものも報告されている。魚粉の NTZC 含有量については、既往のデータはわずかに 1例¹⁰⁾のみであるが、やはり同じ魚粉の NTHZ 含有量 (18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) よりかなり高い値 (370 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が報告されている。この点については、NO₂ 処理を行った魚粉においても同様な傾向が見られた。NTZC からの NTHZ 生成率については、ベーコンを調理加熱する場合、加熱温度 180~190°C、加熱時間 6~13 分という条件で、生成率 1~3% という値が報告されている。^{3,6)} これらの処理条件は、米国の家庭などで行うベーコンの通常の調理を基準としており、魚粉の製造条件とは大きく異なっている。したがって本報の実験結果と直接比較することは困難であるが、一般的にいえば、本報における魚粉の処理条件のほうが加熱時間が長いだけに、NTHZ 生成率が大きいものと思われる。

本報での実験結果によって、魚粉における NTHZ の生成機構はかなり明確なものとなった。すなわち、その機構は 2 つの生成経路により構成される。第 1 は、CysA→THZ→NTHZ の経路である。かなり鮮度のよい原料魚を用い、直火式加熱乾燥法によって魚粉を製造する場合を想定すると、主として煮熱工程中に、原料魚体中に含有される CysA が同じく魚体中に存在、あるいはこの工程中に生成する FA と反応して THZ が生成され、これが乾燥工程中に熱風に含まれる NO_x (NO₂) によりニトロソ化され、NTHZ が生成する。

第 2 は、システイン→TZC→NTZC→NTHZ の経路である。システインから NTZC 生成にいたる過程は確認されなかったが、恐らく上記の CysA→NTHZ の過程

と併行して、システインと FA との反応、およびそれに続くニトロソ化反応が起こるものと思われる。NTZC→NTHZ の分解（脱炭酸）は、乾燥工程中のかなり高温の加熱によって起こるが、実際には同時に TZC→NTZC のニトロソ化も進行し、NTZC が生成されつつ分解されるという、かなり複雑な過程を経るものと思われる。

以上の NTHZ 生成に関する 2 経路のうち、いずれが主であるかは必ずしも明確ではない。本報の実験結果についていえば、魚粉 B-0 日試料（身粕魚粉）の場合、処理温度 120°C では、Table 5 に示した NTZC の値 (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および、Table 6 に示した NTHZ 生成率 (2.2%) から、第 2 の経路、すなわち NTZC を経て生成される NTHZ 量は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と計算される。この場合、実際に生成する NTHZ の全量は 217 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Table 3) であるから、ここでは明らかに第 1 の経路が主体であるとみなされる。しかし同じく魚粉 B-0 日試料であっても、処理温度 160°C においては、NTZC 経由の NTHZ 生成率は 120°C の場合の約 4 倍 (Table 6) であった。一方、前報²⁾で明らかにしたように、処理温度 160°C では 120°C の場合に比して、NTHZ の全生成量が著しく減少すると考えられるので、この場合いずれの経路が主体であるかは判断しがたい。加えて市販魚粉の複雑かつ不均一な製造条件をも考慮すれば、NTHZ 生成に関する主要な経路の推定はきわめて困難な問題である。

本研究の遂行に当って、貴重な御協力と御指導を賜った東海区水産研究所・中添純一、飯田 遙、中山昭彦の諸氏に厚く感謝の意を表します。なお、NTZC 分析に関し御協力頂いた(財)日本医療食協会附属研究所・石橋享博士に対し御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 戸沢晴巳，河端俊治：日水誌，52，1969-1974 (1986)。
- 2) 戸沢晴巳，河端俊治：日水誌，53，1449-1456 (1987)。
- 3) N. P. Sen, S. W. Seaman, and P. A. Badoo: *Food Tech.*, 39, 84-88 (1985)。
- 4) D. J. Skrypec, J. I. Gray, A. K. Mandagere, A. M. Booren, A. M. Pearson, and S. L. Cuppett: *Food Tech.*, 39, 74-79 (1985)。
- 5) J. W. Pensabene and W. Fiddler: *J. Food Sci.*, 48, 1452-1454 (1983)。
- 6) J. W. Pensabene and W. Fiddler: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68, 1077-1080 (1985)。
- 7) W. Lijinsky, L. Keefer, and J. Loo: *Tetrahedron*, 26, 5137-5153 (1970)。
- 8) 倉田自章：化学の領域，増刊 33 号，93-95 (1958)。

- 9) T. Hayashi, C. A. Reece, and T. Shibamoto: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 101-105 (1986).
- 10) P. C. Jocelyn: *Biochemistry of the SH group*, Academic Press, London and New York, 1972, pp. 8-10.
- 11) G. D. Novelli, F. J. Schmetz, and N. O. Kaplan: *J. Biol. Chem.*, **206**, 533-545 (1954).
- 12) M. Hsiung, Y. Y. Yeo, K. Itiaba, and C. Crawhall: *Biochem. Med.*, **19**, 305-317 (1978).
- 13) S. Duprè and M. Aureli: *Anal. Chem.*, **105**, 97-100 (1980).
- 14) 高橋裕明, 吉田隆典, 目黒 照: *Bunseki Kagaku*, **30**, 339-341 (1981).
- 15) A. J. Jonas and J. A. Schneider: *Anal Biochem.*, **114**, 429-432 (1981).
- 16) G. Ricci, M. Nardini, R. Chiaraluca, S. Duprè, and D. Cavallini: *J. Appl. Biochem.*, **5**, 320-329 (1983).
- 17) S. Ida, Y. Tanaka, S. Ohkuma, and K. Kuriyama: *Anal. Biochem.*, **136**, 352-356 (1984).
- 18) M. Sakaguchi and T. Shibamoto: *J. Agric. Food. Chem.*, **26**, 1179-1183 (1978).
- 19) N. P. Sen, P. A. Badoo, and S. W. Seaman: *J. Food Sci.*, **51**, 821-825 (1986).
- 20) T. Helgason, S. W. B. Ewen, B. Jassray, J. M. Stowers, J. R. Outram, and J. R. A. Pollock: in "*N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effect and Relevance to Human Cancer*" (ed. by I. K. O'Neill, R. C. von Borsster, C. T. Miller, J. Long, and H. Bartsch), IARC Scientific Publications No. 57, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1984, pp. 911-920.