

ヘモグロビン酸化を用いた不飽和脂肪酸ならびに その酸化物の測定法に及ぼす酸の影響について

佐二木順子, 高橋 勝弘

Effects of Various Acids on Assay Method of Unsaturated Fatty Acids and Their Oxides in Marine Products Using Hemoglobin Oxidation

Junko SAJIKI and Katsuhiko TAKAHASHI

Summary

In this report, effects of various acids on hemoglobin (Hb) oxidation were investigated. It was further studied whether lactate contained in marine products would affect an assay method of unsaturated fatty acids using Hb oxidation. The results are summarized as follows;

1) Decreases of oxyhemoglobin (O₂Hb) peak at 540nm were observed when various concentrations of lactate more than 5 mM were added to blood suspension. Methemoglobin (MetHb) peak at 630 nm synthesized by addition of lactate changed gradually to longer wavelength and finally reached 650nm at high concentration of lactate (50mM). Other acids (HCl, succinate, and acetate) used in the experiment gave similar results. In the case of unsaturated fatty acid (docosahexaenoic acid; DHA), however, the change of wavelength for MetHb was not observed, even though DHA concentration was increased to 10.2mM and the reaction mixture was stood for 3 hr after addition.

2) Hb changes by addition of acids occurred at pH lower than 4. The initial velocity of decrease of O₂Hb peak at 540nm was dependent on the decrease of pH. The pH of reaction mixture added with the lowest concentration of DHA at which Hb oxidation occurred, was 6.9.

3) No effect of α -tocopherol on Hb change was shown.

4) A negative correlation between pH and lactate concentrations in the samples extracted from marine products by ether was obtained as the following formula; $Y = 32.8 - 32.1X$, ($r = -0.716$)

5) The highest lactate concentration ($34.9 \mu\text{mole}/\text{ml}$) in ether extracted sample from dry anchovy was less than the highest threshold ($102.6 \mu\text{mole}/\text{ml}$) to make Hb change by lactate.

It was concluded that an influence of lactate can be ignored in the method for measuring unsaturated fatty acids and their oxides in marine products by observing Hb oxidation.

はじめに

魚介類に豊富に含まれる不飽和脂肪酸ならびにその酸化物は、オカダ酸をはじめとする二枚貝の脂溶性毒のマウスを用いたバイオアッセイにポジティブな効果を示すことが明かである¹⁾。ヘモグロビン (Hb) 酸化を応用した不飽和脂肪酸の簡易測定法は、これらの物質を迅速かつ簡便に脂溶性毒物と分別測定する方法として考案された²⁾。

しかしながら、本法の測定原理であるオキシヘモグロビン (O₂Hb) の酸化に酸類が影響を与えることが知られている³⁾ため、本法の導入にあたって魚介類に含まれる酸類の本法への影響について把握しておく必要がある。特に魚肉中の乳酸生成は漁獲後促進される⁴⁾ため、乳酸の影響は重要である。

本研究では、各種酸類のHbへの影響を調べその作用機作を不飽和脂肪酸によるHb酸化と比較した。また、魚介類の脂溶性分画中の乳酸含量の測定を行い、本法による不飽和脂肪酸の測定に乳酸の影響があるか否か検討した。

実験材料ならびに方法

各種酸（塩酸、酢酸、乳酸、コハク酸）は市販特級品を用いた。エイコサペンタエン酸（EPA）はすでに報告した⁵⁾純度92%のものを、ドコサヘキサエン酸（DHA）はSigma社の純度99%のものをを用いた。抗酸化剤としてDL- α -トコフェロール（和光純薬工業社）を使用した。

魚介類は、市販の新鮮魚介類（アジ；*Trachurus japonicus*, キンキ；*Sebastolobus macrochir*, カツオ；*Katsuwonus pelamis*, ヤリイカ；*Loligo loligo blecheri*, カタクチイワシ；*Engraulis japonica*, アサリ；*Ruditapes philippinamm*), および干物（カタクチイワシ）を用いた。血球は羊保存血（コージン社）を用いた。

1) 酸類の調製

酸類は蒸留水で適当な濃度に希釈した。

2) 魚介類からの脂溶性物質の抽出ならびに乳酸測定用サンプルの調製

下痢性貝毒検査法⁶⁾に従い、アセトン、エーテルで脂溶性物質を抽出した。抽出物に1% Tween 60含有の生理食塩水を加え、1mlあたり魚介類の湿重量4gを含むようサンプルを調製し、pHを測定した。

3) Hb変性試験

リン酸緩衝食塩水（PBS, pH7.4）にて洗滌後、2%に調製された血球浮遊液2mlに酸0.1mlを添加し1時間室温に放置した後0.5mlを3mlの蒸留水にて溶血させたもののHbスペクトルの変化を既報⁷⁾に従い分光光度計（Hitachi 557 model）にて測定した。DHA（1, 3, 6mg）については、100 μ lメタノールで溶解した後血球浮遊液2mlを加えHbスペクトルを得た。

Hb酸化の初速度については蒸留水にて調製された0.3%の溶血液3mlに適宜希釈された酸を0.5ml添加し、添加後のO₂Hbピークの（ λ ; 540nm）減少を分光光度計（Shimadzu MPS-2000）にて測定した。EPAについては0.63~25mgを0.5mlメタノールに溶かしたものに溶血液3mlを加えpHを測定した。

4) 魚介類からのエーテル抽出サンプル中の乳酸濃度の測定

酸素法⁷⁾により測定した。サンプルに乳酸脱水素酵素（LDH）ならびにニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）を加え、37°C, 30分反応させ、乳酸がピルビン酸に変化する際同時に生成するNADH量を340nmにおける吸光度差から求めた。

結果

1) 各種酸類によるヘモグロビン変化について

適宜濃度に希釈された各種酸類を血球に添加したところ、添加濃度5mM以上になるとすべての酸でオキシヘモグロビン（O₂Hb）からメトヘモグロビン（MetHb）への酸化が認められた（Fig. 1）。酸化の強さは塩酸>コハク酸>乳酸>酢酸の順であった。乳酸を血球に添加した際の添加濃度の違いによるヘモグロビンスペクトルの変化をFig. 2に示した。添加濃度5mMから変化が認められ、濃度の増加と共にオキシヘモグロビンピーク（540, 578nm）に減少がみられた。同時に添加濃度5mMから12.5mMまでは630nmにメトヘモグロビンの新たなピークが生じたが、25mM以上になると新生ピークの吸収波長が長波長側に移行し、50mMでは650nmにピークが検出された。この傾向は他の酸類でも同様で、波長移行が観察された最低添加濃度は塩酸、コハク酸が5mM以上、酢酸が25mM以上であった。一方、DHAのHbスペクトルの変化はFig. 3に示したとおり、すでに1.7mMでHb変化が生じ630nmに吸収をもつMetHbが生成されたが、このピークの吸収波長は10.2mMまで変化しなかった。またDHA添加後3時間までMetHbピークの吸収波長の変化はみられなかった。

オキシヘモグロビンピークの減少速度とpHの関係をHC1ならびに酢酸について調べたところ、これら酸類によるヘモグロビンの変化はpHと深く関係していることが明らかになった。pH4以下になるとヘモグロビン

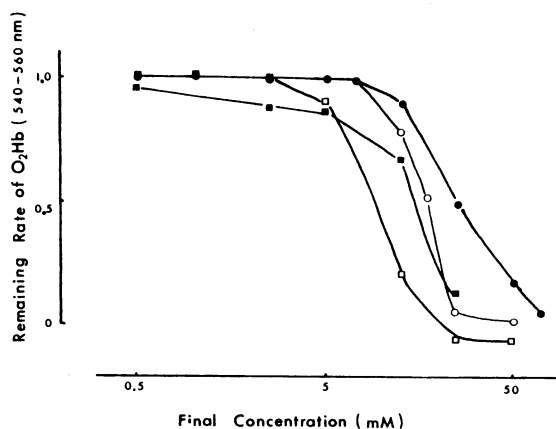


Fig. 1 Hemoglobin oxidative activities 1 hr after an addition of various concentrations of acids.

●—● Acetate ○—○ Lactate
■—■ Succinate □—□ HCl

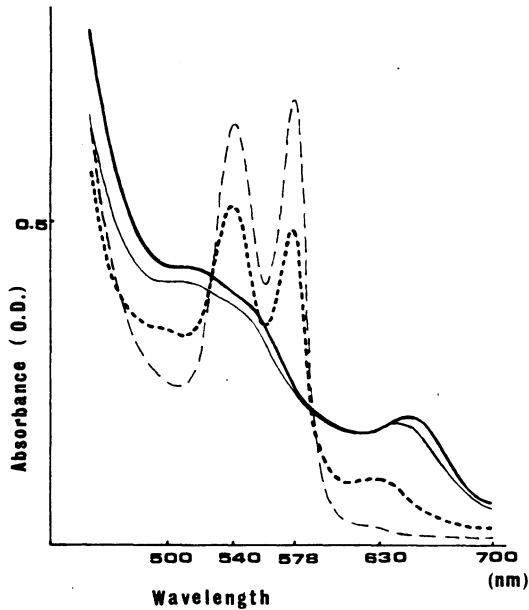


Fig. 2 Hemoglobin spectra of red blood cell 1 hr after an addition of various concentrations of lactate.
 --- 5 mM as final concentration
 12.5mM ——— 25mM
 - · - · - 50mM

の変化が生じ、オキシヘモグロビンの減少初速度とpHの低下とに直線関係が認められた (Fig. 4)。0.3%の溶血液に終濃度0.5~20.8mMのEPAを添加した場合、反応液のpHは6.9~5.4と高い値を示した。なお、0.5 mMのEPAを添加し1時間放置した反応液でO₂Hbの減少が明らかであった。

不飽和脂肪酸によるヘモグロビン酸化は α -トコフェロールにより抑制されることが知られている⁸⁾ので、酢酸のHb酸化に対する α -トコフェロールの効果について調べたが、25mM酢酸を添加した血球に α -トコフェロールを添加した場合、添加濃度0.5%まで何等効果は認められなかった。

2) 魚貝類からエーテルで抽出したサンプルのpHならびに乳酸濃度

エーテル抽出物に1%Tween含有生食を加え調整したサンプルのpHならびに乳酸含量はTable 1に示したとおりであった。生鮮魚介類のpHは3.2~4.4、乳酸含量は0~8.91 μ mole/mlであったが、イワシの干物ではpH3.0~3.1、乳酸含量は22.34~34.9 μ mole/mlであった。今回用いた14検体のpHと乳酸含量には有意な負の相関関係 ($Y=32.8-32.1x$, $r=-0.716$, $p<0.01$) が認められた。

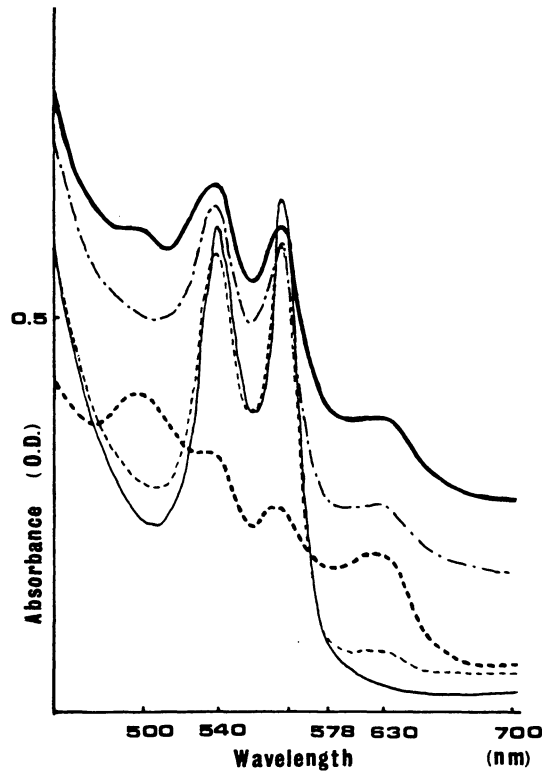


Fig. 3 Hemoglobin spectra of red blood cell 1 h (..... 1.7mM as final concentration, --- 5.1mM, — 10.2mM) and 3 hr (---- 10.2mM) after an addition of various concentrations of DHA. Blank represents as straight thin line.

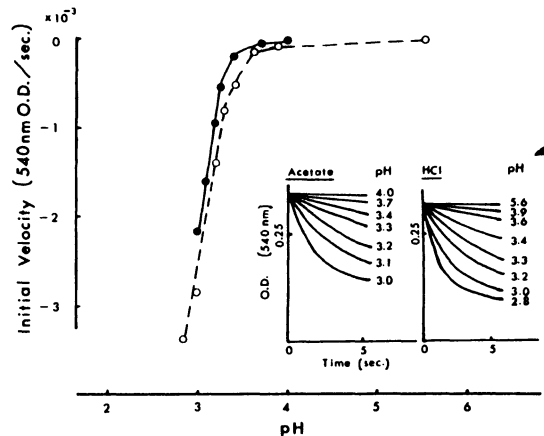


Fig. 4 Initial velocity of decrease of the O₂Hb peak at 540nm as a function of pH after an addition of acetate (●—●) and HCl (○—○). Changes of optical density at 540nm with time after an addition of acetate and HCl possessing various pH are represented in small figures at the bottom right-hand corner.

Table 1 Lactate concentrations and pHs in ether extracted samples from various kinds of marine product

Kind of fish	Lactate concentration ($\mu\text{mole}/\text{ml}$)	pH
<i>Trachurus japonicus</i> (fresh, whole)	1.73	3.5
<i>Sebastes macrochir</i> (fresh, whole)	0.98	3.7
<i>Loligo loligo bleckeri</i> (fresh, whole)	1.12	4.1
<i>Katsuwonus pelamis</i> (fresh, muscle)	8.36	3.5
(fresh, viscera)	1.84	3.6
<i>Engraulis japonica</i> (fresh, whole)	1.84	3.6
(fresh, whole)	6.02	4.0
(fresh, whole)	2.50	3.9
(fresh, viscera)	1.70	3.5
(fresh, viscera)	8.91	3.2
(dry, whole)	22.34	3.0
(dry, whole)	25.0	3.1
(dry, viscera)	34.9	3.1
<i>Ruditapes philippinamm</i> (fresh, whole)	0	4.4

考察

2%の血球浮遊液に各種の酸を添加した場合、濃度が高まると630nmに吸収をもつMetHbのピークが650nmに移行する現象が認められた。この変化はアスコルビン酸による色素の分解反応過程で認められる現象³⁾と同様であり、650nmのピークは色素の分解過程で生ずるベルドヘモクローム⁹⁾と考えられた。一方、10.2mMのDHAを添加した場合、添加後3時間までこの様なMetHbピークの移行は認められなかった。この結果は、不飽和脂肪酸によるHbの酸化と酸によるHb分解とはその機序が異なることを示している。

0.3%の溶血液に直接酸を添加する反応系を用いた実験結果 (Fig. 4) によると、酸によるHbの変化はpH 4以下で起こりその変化はpHに依存していた。しかし、EPAをこの系に添加した場合、Hb変化が認められる反応液のpHは5以上であった事実、不飽和脂肪酸によるHb酸化は抗酸化剤 (α -トコフェロール) の使用により抑制される⁹⁾が、酢酸によるHb変化には α -トコフェロールの効果がみられなかった事実は、不飽和脂肪酸によるHb酸化がpH低下によるものではなく、一方、酸類によるHb変化に活性酸素等による酸化反応の関与はないことを示している。

今回測定した魚介類からのエーテル抽出サンプル中の乳酸含量とpHに負の相関関係が認められたことは、魚介類のエーテル抽出サンプルのpHが乳酸により調節されていることを示している。しかしながら、pH3.5, 3.6を示した生鮮イワシのエーテル抽出サンプル2検体を同様に血球浮遊液に添加したもののpHはそれぞれ6.82, 6.85であり、このpHの値から判断するとエーテル抽出サンプルを添加したHb酸化の測定系は乳酸の影響を受けないものと考えられる。なお、乳酸含量が最高値を示したイワシの干物 (34.9 $\mu\text{mole}/\text{ml}$) のエーテル抽出サンプルを2%血球浮遊液 2 ml に100 μl 添加した場合、乳酸の終濃度を求めると1.7mMとなる。この値はFig. 1, 2から判断するとHbを変化させる濃度 (5 mM以上) ではない。以上の結果から、Hb酸化を利用した魚介類中の不飽和脂肪酸ならびにその酸化物の測定系に及ぼす乳酸の影響は無視してよいものと考えられた。

まとめ

各種酸類のHbに及ぼす影響を調べ、Hb酸化反応を用いた魚介類中の不飽和脂肪酸の測定系に魚介類に含まれ

る乳酸が影響を及ぼすか否か検討した。

① 検討したすべての酸類で、添加濃度が5 mM以上になるとO₂Hbピークの減少が生じた。酸類の生成Met-Hbピークは濃度の増加につれその吸収波長が630nmから650nmに移行したが、不飽和脂肪酸の場合この様なMetHbピークの移行は認められなかった。

② 酸によるHb変化はpH 4以下で生じ、O₂Hbピークの減少初速度はpHの減少に依存していた。一方、Hb変化が観察される最低濃度のドコサヘキサエン酸(DHA)を添加した反応液のpHは6.9と高かった。

③ 酸によるHb変化に α -トコフェロールは何等効果を示さなかった。

④ 魚介類のエーテル抽出サンプルのpHと乳酸含量には負の相関関数($Y=32.8-32.1X$, $r=-0.716$, $P<0.01$)が認められた。

⑤ 最も高値を示したイワシ干物のエーテル抽出サンプル中の乳酸含量(34.9 μ mole/ml)は、乳酸がHb変化を起こしうる閾値(102.6 μ mole/ml)以下であった。

以上の結果から、魚介類中に含まれる乳酸の本法への影響は無視して良いものと考えられた。

参考文献

- 1) J.SAJIKI and K.TAKAHASHI, : Free fatty acids inducing mouse lethal toxicity in lipid extracts of *Engraulis japonica*, the Japanese anchovy, *Lipids, submitted for publication*.
- 2) J.SAJIKI and K.TAKAHASHI, (1989) : A

simple method for determination of the unsaturated fatty acids concentration in the fish and shellfish by hemoglobin denaturation, *Bull. Public Health Laboratory of Chiba Prefecture*, 13, 9-16.

- 3) 日本血液学全書, 日本血液学会, pp203, 丸善, 東京, 1963.
- 4) 土屋靖彦, 国井清, (1960) : 漁獲直後の処理法が肉質変化に及ぼす影響の研究-V. 魚筋肉の乳酸量, *日本水産会誌*, 26, 284-288.
- 5) 佐二木順子, 高橋勝弘, 浜崎智仁, (1992) : エイコサペンタエン酸(EPA)ならびにその酸化物のマウス致死ならびにヘモグロビン酸化作用について, *衛生化学*, 38, 57-62.
- 6) 下痢性貝毒検査法, 厚生省環境衛生局乳肉衛生課発行, 1980.
- 7) H. U. BERGMAYER, M. GRASSEL and H. E. WALTER, (1983) : *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed. Vol. 2, pp582, VCH, Weinheim, W. Germany - Deerfield Beach, FL.
- 8) 佐二木順子, 高橋勝弘, (1990) : 不飽和脂肪酸によるメトヘモグロビン生成について, *衛生化学*, 36, 51-55.
- 9) B. GOLDBERG and A. STERN, (1977) : The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte, *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 218-225.