

生鮮スルメイカ保管中におこる性状変化に関する研究 V

—酸素濃度が体色変化に及ぼす影響—

木下康宣, 吉岡武也, 加藤早苗*, 今野久仁彦**

Quality Change of Fresh Squid upon Storage V

—Color Development of Squid Skin as Affected by Oxygen Concentrations—

Yasunori Kinoshita, Takeya Yoshioka, Sanae Kato* and Kunihiro Konno**

要 旨

致死後のイカを保管した際に表皮が赤黒く変化する現象（発色）は、保管環境の酸素濃度により制御されていた。10%以上の酸素濃度下で保管した場合、発色の程度（発色率）は、24時間にかけて増加し、それ以降徐々に減少した。この変化は空気中で保管した場合と同様の傾向だった。一方、窒素充填により酸素濃度を0.1%以下に調整して保管した場合では、発色率が保管6時間にかけて増加し、その後の保管で減少した。酸素濃度が0.1%の場合と10%の場合では、何れも保管初期に発色率が増加したが、表皮の色合いを決定する色素胞の形態や大きさは異なっており、両者を識別することが可能であった。しかしながら、酸素濃度が2.5%と7.0%の場合では、実質的に保管48時間の間、発色率が変化しなかった。表皮のATP含量は、0.1%の酸素濃度下で保管した場合、保管直後から減少して6時間で半減したが、2.5%以上の酸素濃度では、保管48時間にかけて変化せず、致死直後のレベルが保たれていた。これらの結果は、表皮中のATP含量が致死後の保管中の発色率を決定するものではないことを示しており、高濃度酸素への曝露が発色を促進することを意味している。

1. はじめに

鮮度は、イカを含む多くの生鮮水産物にとって最も重要な品質要素の一つである。生きたイカの表皮は、内臓が透き通って見える程透明感があるが、致死後空気中で保管すると徐々に赤黒く変化しておよそ一日で最大に達し、その後徐々に白く変わっていく。流通の場面では、最も赤黒くなったものが高い評価を受けている。このことは、イカの表皮の色合いが感覚的で簡便なイカの鮮度評価指標として利用されていることを示している。このため、従来よりイカ表皮の発色に関する様々な研究が行われてきた¹⁻⁴⁾。表皮の色合いの変化は、表皮内に存在する柔軟性の高い組織構造を有した

色素胞の大きさが変化することによってもたらされ、拡張によって赤黒く変化し、収縮により白く見えることが分かっている。空気中に存在する酸素との接触を抑制するために、プラスチックフィルムでイカの表皮を覆って保管すると、表皮の白色化を招くことが報告されており、酸素が発色に重要な影響を及ぼすことが示唆されている⁵⁾。また、生きたイカの色素胞は、指で触れると拡張するが、このような反応性は、致死後も一日間に巨り保持されていることが報告されている⁶⁻⁷⁾。このような生物学的機能は通常、adenosine 5'-triphosphate (ATP) を adenosine 5'-diphosphate (ADP) に加水分解することにより生成されるエ

*旭川医科大学医学部生化学講座細胞制御科学分野

**北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門生物資源化学分野

エネルギーを要求する。生細胞においては、ADPは呼吸鎖系の働きにより直ちにATPに変換される。しかしながら、致死後におけるATPの再生は、呼吸活動の停止によって酸素供給が滞るため長くは続かない。そして、致死後のイカを保管した際の表皮におけるATP分解特性に関する知見は乏しい。

そこで、本研究では、保管環境の酸素濃度が表皮の色合いの変化やATP含量にどのような影響を及ぼしているのかを検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 実験材料

函館近海で漁獲された、活きたスルメイカ *Todarodes pacificus* (292-374 g) を活魚車で実験室へ運び、断頭により即殺したものを使用した。

2.2 試料の保管

イカ腹部を体軸方向に切断して内臓を除いた。表皮が付いたままの外套膜をプラスチックバックに投入し、様々な酸素濃度の気体を充填して包装し、5°Cで保管した。保管に使用した気体は、酸素ガス(99.9%)と窒素ガス(99.9%)を混合することにより、酸素濃度を<0.1%、1%±0.2%、1.5%±0.2%、2.5%±0.2%、7%±1%、10%±1%および20%±2%に調整したものを使用した。酸素濃度は、Check Mate 9900 O₂/CO₂ (PBI Dansensor A/S, Denmark) を用いて測定した。酸素濃度が最も低い<0.1%の試料は、窒素ガスのみを充填することにより調製した。保管に使用した気体は、5日間の保管中に酸素濃度が変化しないよう、2,500mlとした。保管には、ナイロン-ポリエチレン-ポリエチレンの3層構造を有したガスバリア性の高い袋(CANSFILM®:四国化工㈱, 40cc/m²×24h×atm[23°C, 75%RH])を使用した。

2.3 発色率の測定

表皮の赤黒さは、発色率(%)を用いて定量的に測定した。発色率は、保管前後の試料を色見本(Toyo 94 Color Finder1050, CF0155, 東洋インキ)とともにバットに載せてデジタルカメラで静止画を記録し、この情報をパーソナルコンピュータへ取り込んでPhotoshop Ver7.0 (Adobe Systems, Inc.)により二階調化した結果から、観察視野面積に対する黒色化された面積の割合を百分率とし

て算出した。結果は、6個体の平均値で示した。なお、発色率の増加は表皮の赤黒さが増すことを意味している。

2.4 色素胞の形態観察

保管中における色素胞の形態変化を追跡するため、画像処理ソフト(Photoshop 7.0, Adobe Systems, Inc.)を使用して、上述した保管中の静止画の一部を切り出し、拡大観察した。赤黒さが顕著な背部は、色素胞の密度が高く形態観察が困難なため、評価には、色素胞の相対的密度が低い腹部の画像を使用した。

2.5 表皮のATP含量の分析

一定期間保管したイカ試料から表皮を剥がし取り、液体窒素を用いて即時凍結したものを分析まで-80°Cで保管した。分析試料は、表皮試料の一部(0.4g)を凍ったまま25倍量の冷10%過塩素酸中で均質化し、続いて4,000×gで10分間遠心分離を行って得た上清を5M KOHで中和して、0.2μmのメンブランフィルターを通すことにより調製した。表皮のATP含量は、既法⁹⁾に従い高速液体クロマトグラフ(TOSOH, LC-8020)を用いて測定した。すなわち、カラムにはTOSOH社製のODS-80TS(4.6 mm I.D. × 250 mm)を用い、溶出・分離はA液〔0.1Mリン酸ニ水素ナトリウム(pH 4.1)〕とB液〔20%アセトニトリルを含む同溶液〕の2液を用いたりニアグラジェントにより行った。流速は1 ml/min, カラム温度は室温, 検出波長は254 nmとした。結果は何れも6個体の平均値で示した。

3. 結果および考察

3.1 異なる酸素濃度で保管した場合の発色率の変化

イカ表皮の色合いに及ぼす酸素濃度の影響を明らかにするため、表皮が付いたままのイカ外套膜を酸素濃度が<0.1%~20%の環境中で72時間保管した。実験方法の項で述べた条件下では、保管開始時の酸素濃度が10.2%のものは72時間の保管後でも10.0%とほぼ変わらず、2.5%のものは2.5%のままで変化がなかった。このことから、酸素濃度の減少は無視できる程度であり、充填した気体の量は十分であることが確認された。保管中の

発色率の変化は、0.1%、2.5%、10%の場合の3つのタイプに分けることができた(図1)。1.5~7%の酸素濃度で保管した場合は良く似たパターンを示した。酸素濃度が20%の場合は10%の場合とほぼ同様の变化を示した。保管前の外観は、目視上背部が赤黒く変化しており、腹部では発色が認められなかった。この時の発色率は54%~57%だったが、この値は背部の色合いに由来するものと判断した。なお、断頭により即殺した直後のイカは、表皮全体に透明感が保たれているが、背部は数分で発色してしまい、保管初期の発色率を低く維持するのは困難だった。

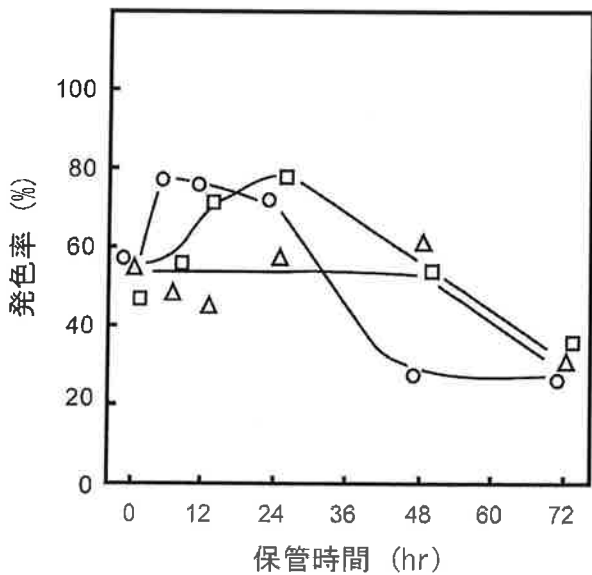


図1 異なる酸素濃度で保管した場合の発色率の変化
酸素濃度：0.1% (○), 2.5%(△), 10%(□)

10%という高濃度の酸素環境下で保管した場合の発色率は、時間経過に伴って増加し、24時間で最大値を迎えてその後徐々に減少した。この変化は、空気中で保管した場合の変化⁸⁾と実質的に同様だった。0.1%の酸素濃度で保管した場合もまた、保管に伴い発色率が増加したが、10%酸素濃度の時と異なり、6時間で最大値に達した。この時の発色率は、保管6時間目で比較した場合、2.5%や10%の値よりも著しく高かった。この値は、保管24時間まで顕著に減少することがなく、ほぼ同様の値に保持され、その後の保管で緩やかに減少した。酸素濃度が2.5%の場合の発色率の変化は、0.1%や10%の場合と異なり、保管48時間の間実質的に増加も減少もしなかったが、その後72時間にかけて緩慢に減少した。これらの結果は、

イカにおける発色が、致死後に起こる単純な現象ではなく、保管環境の酸素濃度により大きな影響を受けていることを示している。

イカは通常、氷の上か冷蔵庫内の空気中で保管されるが、この場合の表皮は致死後24時間で赤黒く変化する。そこで、発色に対する酸素濃度の影響を明確にするために、保管開始時の発色率に対する保管24時間後の発色率の比を算出し、酸素濃度に対してプロットした(図2)。その結果、酸素濃度が1.5%~7%で保管した場合は、1%以下あるいは10%以上の場合よりも著しく低いことが示された。この場合の10%以上で認められた高い発色率比は、保管24時間で十分な発色が起きていることを意味している。これらの結果は、酸素の有無ではなく、明らかに保管中の酸素濃度が発色に大きな影響を与えていることを示している。このことから、商業的に流通されるイカで発色が起こるのは、20%の酸素を含む空気中で流通されているためと考えられた。イカの生息環境である海水の溶存酸素濃度は最大で25mg/Lほどであるが、これは5℃の理想気体における酸素濃度に換算すると約7%に値する。そして、開放容器内で保管した海水の酸素濃度は2.5%程度であることから、恐らくは2.5%という酸素濃度がイカにとって正常で標準的なものであり、7%以上の酸素濃度は異常な環境と推測される。イカで起こる発色は、このような異常な酸素濃度に対する反応のように

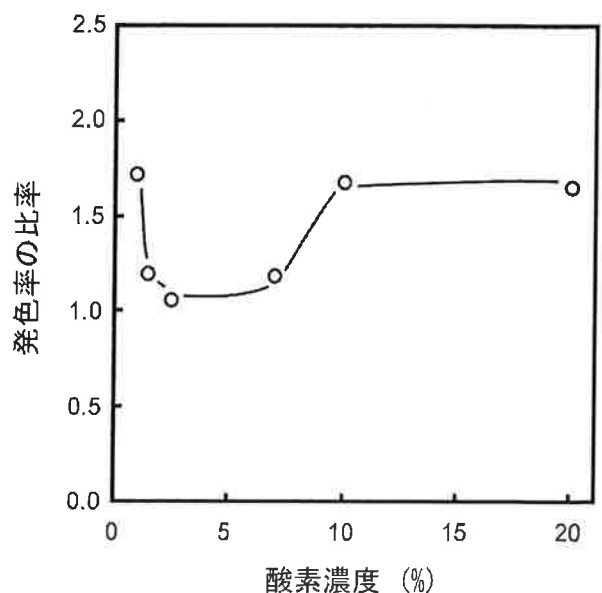


図2 発色に及ぼす酸素濃度の影響

思われる。発色を引き起こす化合物や表皮表面から色素胞へ伝達される刺激経路といった反応のメカニズムは、今のところ明らかでない。しかし、イカ表皮の色合いを変化させない保管条件を知ることが商業的にも重要である。生息環境と類似した酸素濃度でイカを保管することは、表皮の生理機能を維持するために適した方法と言えるのかもしれない。

本研究では、0.1%未満という低酸素環境下で保管した場合、72時間経過しても発色率が26%で決して0に到達しない（表皮が完全に白色化しない）という、思いもよらない現象が起こることを見出した（図1）。一方、プラスチックフィルムで表皮を覆って保管したイカでは、発色が抑制されて白色を呈することが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。そこで、これらの結果に見られる矛盾を追求するため、次のような類似実験を行った。データは示さないが、イカ表皮をポリエチレンフィルムで覆い5℃で保管したところ、24時間の間発色率に変化が認められなかった（発色しなかった）が、それ以降急速に減少して36時間後には0に近い値に達した。ポリエチレンフィルムで覆った場合のイカ表皮の外観や色合いは、窒素ガスを充填することによって酸素濃度を0.1%に調整して保管したものとは明らかに異なっていた。このことから、嫌気的環境における保管が常に表皮の完全な白色化を招く訳ではないことが明らかになった。メカニズムは不明だが、プラスチックフィルムでイカ表面を覆うことは、白色化を誘発するような物理的な影響を与えているのかもしれない。

3.2 保管に伴う色素胞の形態変化

本研究では、イカ表皮の色合いや発色の程度を定量的に評価するために発色率を使用した。発色率の増加は、確かに発色が起こっていることを示し、その値の変化は目視による観察結果を良く反映しているように思われた。しかしながら、酸素濃度が0.1%と10%の場合で認められた発色率の増加は、色素胞で起きている現象を反映したものかどうか明確でない。そこで、上述した3つの異なる酸素濃度でイカ外套膜を保管した場合の色素胞の形態変化を観察した。

観察試料には、個々の色素胞が観察しやすい腹部の静止画像を使用した。イカ腹部の色素胞を拡

大した画像を図3A, 3B, 3Cに示した。即殺直後のイカ表皮の色素胞は、拡張したものの割合が少なく、大部分が収縮した状態にあった（図3A₀, 3B₀, 3C₀）。観察視野にある色素胞は、個々が独立した動きを示すとともに、個々が同調しない急速な拡張収縮運動を行っており、見かけ上不均一な大きさのものが一面に分布しているように見受けられた。10%酸素濃度で6時間保管したものでは、保管開始時に比べて拡張した色素胞の割合が多くなっていったが、収縮した色素胞も点在して観察された（図3A₆）。発色率が最大値に達した保管24時間のものでは、ほとんどの色素胞が拡張していた（図3A₂₄）。即殺直後で見られた大きさの色素胞は保管時間の経過と共に減少し、72時間後ではこれを反映して発色率が減少していた。一方、0.1%の酸素濃度で保管したものの色素胞の外観は、10%のものとは著しく異なっていた。0.1%で6時間保管したものの色素胞は、不完全な拡張を示しているものが多く見受けられた（図3B₆）。0.1%以下の酸素濃度下で起こる色素胞の不完全な拡張は、最大発色率が低く抑えられることを意味しているが、この結果は、急速な拡張収縮運動が繰り返されていることを示しているのとは異なる。色素胞の大きさは、72時間まで保管を続けることにより、徐々に減少した。0.1%酸素下で72時間保管した試料の発色率は、図1に示したとおり26%であった。2.5%で保管した場合の色素胞の形態変化を図3Cに示した。この場合、保管24時間と72時間の何れにおいても、まだ致死直後で見られたような、拡張した色素胞や収縮した

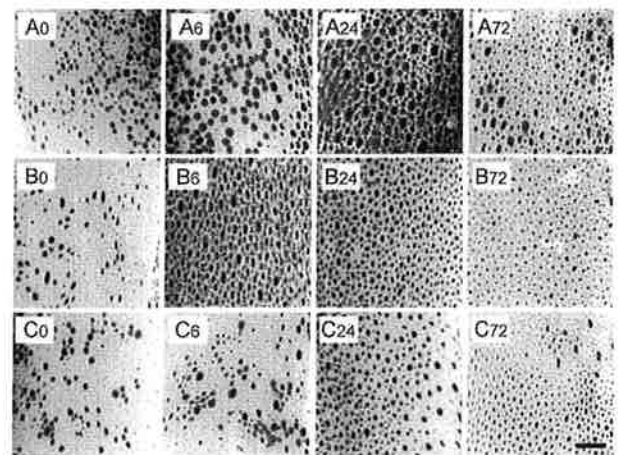


図3 異なる酸素濃度で保管した場合の色素胞の形態変化
酸素濃度：10% (A), 0.1% (B), 2.5% (C), 図中の数値は保管時間, 実線は3mmを示している。

色素胞が分布している様子が観察された。肺、胎児の眼球骨髄、中枢神経系などの組織では、高酸素分圧への曝露が不可逆的な損傷を与えることが報告されている⁹⁾。また、酸素濃度が100%という酸素過剰の状態は、網膜と視神経近傍の毛細血管の血流減少を引き起こすこと¹⁰⁾や、ラットの坐骨神経に対して神経上膜の細動脈の収縮を誘発する¹¹⁾ことが知られている。これらの症候は、高濃度酸素への曝露（酸素過剰）が生細胞に対して好ましくない影響を及ぼすことを示している。10%酸素濃度のような高い酸素環境へ曝露した場合に起こるイカ表皮色素胞の拡張は、これに類似したものかもしれない。

3.3 異なる酸素濃度で保管した場合のイカ表皮におけるATP含量の変化

本試験で、発色率の変化は保管中の酸素濃度によって制御されていることを見出した。ATPは、生細胞において生物活性を維持するために普遍的に要求される成分である。そして、生細胞においてATPがADPに加水分解される過程ではエネルギーが生産されるが、生成されたADPは酸素を要求する呼吸鎖系の反応により、再び速やかにATPに変換される。このことから、保管中における発色率の変化は、ATP含量の変化に付随して起こると考えるのは理にかなっている。そこで、これを確認するため、保管中におけるイカ表皮のATP含量の変化を検討した。図1と同じ酸素濃度下で保管した試料のATP含量の経時変化を図4に示した。分析に使用するために試料から表皮を採取したが、この処理はATP含量に影響を与えないことを確認した。

即殺直後の表皮のATP含量は、湿重量当り0.6-0.7 $\mu\text{mol/g}$ だった。この含量は、イカ筋肉で報告されている値 (8-9 $\mu\text{mol/g}$) の1/10程度だった⁹⁾。この差は、組織が有する機能の違い、すなわち筋肉タンパク質の収縮に使用されるために多くのATPを含有している必要がある筋肉組織か、主たるタンパク質がコラーゲンのような結合組織である表皮組織かに起因しているのではないかと考えられた。イカ外套膜を0.1%以下の酸素環境で保管した場合、ATP含量は保管と共に徐々に減少し、およそ6時間で半減して24時間で消失した。この減少は、表皮組織内でATPの消費が行われている

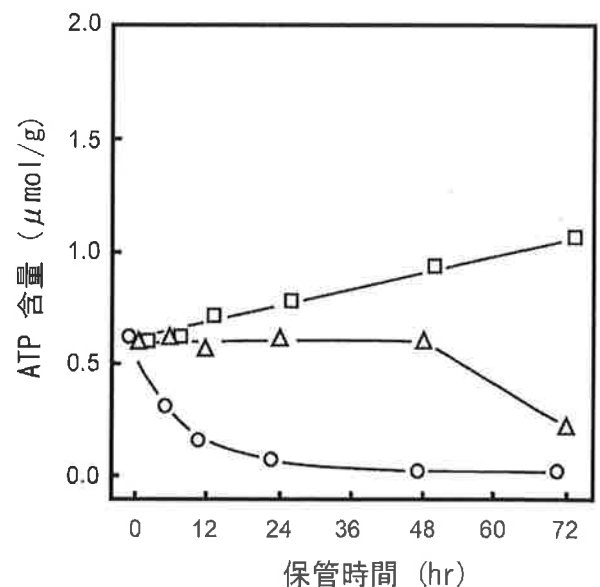


図4 異なる酸素濃度で保管した場合の表皮のATP含量の変化
酸素濃度：0.1% (○), 2.5% (△), 10% (□)

ことを意味している。しかしながら、10%環境下では、72時間経過しても致死直後と変わらないか、あるいは微増する傾向にあった。また、酸素濃度2.5%で保管した場合でも、48時間まではATP含量が変わらずに保持されていた。これらの結果は、2.5%という酸素濃度がATPを再生するために十分な濃度であることを示唆していると共に、致死後でも表皮が酸素を利用してATPの再生を行っていることを示している。

イカ表皮は、10%酸素下で高いATP含量を維持していたにも係わらず、発色率は増加した後減少するという変化を示した (図1)。特に、色素胞の収縮を伴う赤黒さの低下は特徴的だった (図3)。従って、このような数日間に亘る保管時に起こる発色率の低下は、ATP含量の減少によって引き起こされるものではない。2.5%酸素下では、10%の場合と同様、保管48時間の間ATP含量が致死直後と同等の値に保持されていた。このことから、イカ表皮で見られる発色の進行や発色率の変化は、ATP含量そのものによって決定されるものではなく、他の要素により引き起こされていると考えられた。0.1%の酸素下で認められた色素胞の不完全な拡張や10%の酸素下で認められた完全な拡張は、特徴的だった。その上、0.1%および10%の酸素環境下で確認された、ATP含量の減少や高含量保持の傾向も、同様に特徴のあるものだった。

イカ表皮において、高いATP含量は色素胞が完全拡張するために重要と思われたが、ATP含量の低下は不完全な拡張を引き起こすのかもしれない。これらの完全拡張や不完全拡張している色素胞では、何れも刺激に対する反応性を失っていたが、この条件で認められた色素胞の拡張は、生理的変化が理由ではない。このような不可逆的な色素胞の拡張が不可逆的な収縮によって起こると仮定すると、魚肉の死後硬直に似た現象のように思われる。しかしながら、死後硬直がATPの消失に伴って起こる現象であるのに対して、ここで見られた色素胞の拡張は、ATP含量が保持されていることから明らかに死後硬直とは異なったものである。ATPが完全に消失していた、酸素濃度0.1%で24時間保管したものでは、発色率の急速な減少が起こっていたことから、ATP含量は、色素胞の拡張を引き起こすまでの時間に影響を及ぼしているのかもしれない。

以上の結果から、空气中で保管したイカで見られる表皮の色合いの変化は、高濃度の酸素に対する反応の結果と結論した。色素胞の拡張に対する高濃度酸素の役割を確かめるために、次のような実験を行った。最初に、2.5%の酸素濃度で1日間保管し、発色率が変化しないことを確認した。次に、この試料を高酸素濃度に曝露するため、空気中に取り出して保管した。その結果、データは示していないが、外套膜は空気に曝露してから一日で発色を起こすことが確認された。このことから、メカニズムは明らかではないが、高濃度の酸素が発色を起こす刺激物質として作用していることは明白である。

本研究では、酸素ガスと窒素ガスを混合することにより酸素濃度を調整したが、この方法は、実用的な酸素濃度の制御方法とは言えない。我々は、海水の飽和酸素濃度が7%であり、色素胞の拡張を引き起こさない最低の酸素濃度が1.5%であることを知った(図2)。これは、海水が保管中の表皮の色合いを即殺直後と同等に保持するために最適な媒体であることを示唆している。現在、酸素曝気した海水を利用した生鮮イカの保管技術の開発研究に取り組んでいるところである。

謝 辞

本研究を遂行にあたり、適切なお助言をいただいた株式会社古清商店 代表取締役 古伏協隆二氏に深謝いたします。また、発色率の測定に関して適切なお指導をいただいた北海道立工業技術センター 研究開発部長 宮原則行氏並びに、各種の分析および結果の取りまとめにご協力いただいた専門員の野上智代さんに感謝の意を表します。

この研究の一部は、文部科学省「地域イノベーションクラスタープログラム(グローバル型)」において、参画企業・団体との共同研究として行われたものです。ここに記して感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Ohmori H, Hori T, Nakamura K. 1975 Studies on the preservation of skin color of squid in iced sea-water. *Refrigeration* 50(572): 13-6.
- 2) Iwamoto M, Yamane R. 1993. Research on the postmortem change of kensaki-ika, storage condition and body-color change. *Bull Shimane Pref Fish Exp Stn* 1991: 83-90.
- 3) Iwamoto M, Yamane R. 1994. Research on the postmortem change of kensaki-ika, storage condition and body-color change. *Bull Shimane Pref Fish Exp Stn* 1992: 126-31.
- 4) Okada T, Ushio H, Ohshima T. 2004. Skin color changes of squids *Todarodes pacificus* and *Loligo bleekeri* during chilled storage. *J Food Sci* 69:S414-7.
- 5) Ushio H. 2004. Maintenance of fish and squid skin color. In: Nakazoe J, Yamanaka H, editors. *The use of high technology for the control of fish quality and freshness*. Tokyo: Koseishakoseikaku Co., Ltd. P 102-12.
- 6) Flory E. 1966. Nervous control and spontaneous activity of the chromatophores of a cephalopod, *Loligo opalescens*. *Comp Biochem Physiol* 18: 305-24.
- 7) Messenger JB. 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol Rev* 76: 473-528.
- 8) Yoshioka T, Kinoshita Y, Yoshino H, Park S, Konno K, Seki N. 2003. Change in translucency

- of squid mantle muscle upon storage. *Fish Sci* 69:408-13.
- 9) Gillen HW. 1965. Neurologic hazards of hyperbaric oxygen exposure. *Am Coll CHEST Physicians* 47(4): 369-73.
- 10) Langhans M, Michelson G, Groh JMM. 1997. Effect of breathing 100% oxygen on retinal and optic nerve head capillary blood flow in smokers and non-smokers. *Br J Ophthalmol* 81: 365-69.
- 11) Sakai N, Mizuno R, Ono N, Kato H, Ohhashi T. 2007. High oxygen tension constricts epineurial arterioles of the rat sciatic nerve via reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1498-507.