

魚類筋肉組織の凍結において 凍結前保存期間が氷結晶形態に及ぼす影響

Effects of Storage Time before Freezing on the Ice Crystal Morphology in the Frozen Fish Muscle Tissue

小南友里*
Yuri KOMINAMI*

渡辺学*
Manabu WATANABE*

鈴木徹*
Toru SUZUKI*

* 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)
Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science
and Technology (4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477, Japan)

Summary

This study focused on chilled storage before freezing of the fish, in order to explore the relation between the postmortem changes in fish and the ice crystal morphology in frozen muscle tissue. Specimens of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) were killed by decapitating. After death the fish were pan-dressed and stored at 4degrees C for 0-2days. Subsequently, dorsal muscle tissue was dissected. The dissected tissue was used for ATP-related compounds analysis, measurements of water holding capacity (WHC), scanning electron microscopic (SEM) observation of connective tissue and freezing experiment for fluorescent microscopic observation of ice crystal morphology in the frozen tissue. As a result, it was found storage time affects the ratio of ATP-related compounds and the WHC of the dorsal muscle tissue of the fish. And the connective tissue became looser during storage. In addition, each stored tissue has the different size or number of ice crystal after freezing. In the frozen tissue of stored fish, there were large ice crystals enough to disrupt cells. From our results, it is suggested that the WHC in the muscle tissue or the soundness of connective tissue affects the process of ice crystal formation during freezing. And this means that postmortem changes in muscle tissue of fish should have a large effect on the ice crystal morphology in freezing.

Keywords: Freezing, Ice Crystal, Water Holding Capacity, Connective Tissue, Extracellular Matrix, Horse Mackerel

1. 緒言

水産物の冷凍については古くから世界的に研究が行われている。特に、凍結終温や凍結保管期間、凍結速度が解凍後の組織性状に及ぼす影響について多くの知見がある¹⁻⁶⁾。また、タンパク質変性度やドリップロス、破断強度、ラマンスペクトル、横緩和時間 T_2 などの測定によって解凍後の組織性状が調べられており、凍結前と凍結解凍後における明確な差が報告されている¹⁻⁶⁾。様々な評価手法が確立される一方で、凍結保管時の諸因子(凍結速度や保管温度)が解凍後の組織性状に及ぼす影響について未だに一致した見解は得られていない。このような事態が生じている原因の1つとして、研究に用いられて

いる試料の差が挙げられる。

試料魚の筋肉組織性状が異なる場合に凍結時に生じる差異については既に、スケトウダラやタイセイヨウダラ筋肉組織で死後硬直に伴う変化に応じて凍結組織の様相が異なることが明らかにされている⁷⁻⁸⁾。また、鮮度の異なるマアジ筋肉組織を凍結した場合に氷結晶サイズが顕著に異なることが報告されている⁹⁾。これらの報告では一様に、凍結前の保存時間が長いほど細胞外で氷結晶が成長し易い傾向にあることが示されている⁷⁻⁹⁾。既往の研究から魚体の死後の筋肉組織の変化が凍結時の氷結晶生成に影響を及ぼすと推察されるが、定量的にその影響を示した知見は殆ど得られていない。

そこで、本研究では魚体の死後に生ずる筋肉

組織の変化が凍結時の氷結晶生成に及ぼす影響を定量的に示すことを目的とし、魚体の凍結前保存期間に着目した生化学的及び組織学的実験を行った。活魚の入手が容易であり、取扱い易い魚体サイズであることから試料にはマアジを用いた。活魚を活けメし一定期間冷蔵保存した後に凍結試験を行った。凍結前にそれらの組織の状態について調べ、同一速度で凍結したときに生成する氷結晶形態について比較した。

2. 実験

2.1 試料および凍結方法

神奈川県内で蓄養されたマアジ(*Trachurus japonicus*)を試料魚として用いた。活魚運搬車で運搬し、到着後水槽に移して1時間以内に処理した。試料魚は延髄を切断した後にピアノ線を用いて脊髄を破壊し、活けメを行った¹⁰⁾。保存0日目のものは処理後2時間以内に実験に供した。また、頭と内臓を取り除いたドレスの状態のものをジッパー付保存袋に入れ、4°Cで1日ないしは2日保存した。

凍結には-30°Cに設定したストッカー(MEDICAL FREEZER-U331, SANYO)を用いた。凍結速度を出来得る限り揃えるため、5cm×2cm×1cm程度に切り出した背側筋肉組織をラップフィルムで包み凍結試験に供した。試料中心部にT型熱電対(φ0.6mm)を挿入し、データロガー(メモリハイロガー LR8431, HIOKI)を用いて温度計測及び記録を行った。

2.2 ATP関連物質の分析

胡ら¹¹⁾の方法に従い、各保存期間におけるマアジ筋肉組織試料を10倍量の5%過塩素酸溶液と混和した後に水酸化カリウム溶液でpHを2.5~3.0に調整した。これを静置した後に上清をフィルター(pore 0.45μm)ろ過した。得られたろ液を緩衝液と混和し、ATP関連物質抽出液とした。分析はHPLC(LC10, Shimadzu)で行い、マルチモード用カラム(GS-320 7G, Showadenko)を用い、260nmを検出波長とした。

2.3 保水力の評価

本研究では遠心分離によって流出した水分量(遠心ドリップ)と遠心分離後に加熱によって蒸発した水分量(残存水)を算出し、保水力を評価した。

0.5mL容の遠心式フィルターユニット(Ultrafree-MC HV 0.45μm, Millipore)を遠心分離に使用した。試料には背側筋肉組織0.1~0.3gを用いた。サンプルカップに試料を入れてチューブにセットし、4°Cに設定した遠心分離機で

2500×gにて30分間遠心分離した¹²⁾。遠心分離後にチューブ底部に得られたドリップを遠心ドリップとした。続いてサンプルカップを78°Cのオープンに移し、2日間乾燥させた。得られた乾燥物を固形成分とし、乾燥中に蒸発した水分を算出し推算残存水とした。保存に伴う保水力の変化については、試料をいれたフィルターユニットをプラスチックパラフィンフィルムで密封して4°Cに設定したインキュベーター内で1日ないしは2日保存し、プラスチックパラフィンフィルムを外してから上記の条件によって測定を行った。

2.4 結合組織観察

Andoらの方法に倣い¹³⁾、結合組織の観察を行った。組織を3mm角以下に切り出して2%グルタルアルデヒド-2%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液に入れ、4°Cで固定した。固定後、試料が透明になるまで10%水酸化ナトリウム溶液に浸漬し、細胞質を溶出させた¹⁴⁾。10%~1%塩化ナトリウム水溶液系列に入れて洗い、1%オスミウム溶液で二次固定を行った。1%塩化ナトリウム溶液で洗った後、1%タンニン酸及び1%オスミウム酸で導電染色を行った。1~10%塩化ナトリウム溶液系列で脱水した後、50~100%エタノール系列で脱水した。t-ブチルアルコールに置換し、t-ブチルアルコール凍結乾燥機(JFD-310, JEOL)で凍結乾燥を行った。走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope; SEM)(Quanta250, FEI)で低真空モード(100Pa)にて低真空二次電子検出器(LFD)を用いて加速電圧10kVで観察を行った。

2.5 凍結組織観察

未凍結組織は8mm角程度に切り出して直ちに液体窒素で冷却したイソペンタンに浸漬し、急速凍結固定を行った。凍結試験を行った組織は中心温度が-25°Cに達した時点で液体窒素中に移し、切断後組織片を得た。これらを直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン中で包埋剤(O.C.T.Compound, Sakura Finetek Japan)にて包埋し、切片作製時まで-80°Cのストッカーで保管した。クライオコーティング法で凍結組織切片(6μm厚)をとり、lamininを標的とした免疫染色を行った¹⁵⁾。一次抗体にanti-laminin antibody produced in rabbit(L9393, Sigma Aldrich)を、二次抗体にbiotinylated goat anti-rabbit IgG antibody(BA-1000, Vector Laboratories)を、蛍光色素標識のためにstreptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate(S11223, Invitrogen)を用いた。蛍光顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)で緑色蛍光用フィルター(OP-66636BZ フィルタ GFP-BP, KEYENCE)を用

いて観察を行い、画像を撮影した。得られた観察像について画像解析ソフト (Hybrid Cell Count BZ-H2C, KEYENCE)を用いて解析を行った。画像解析には1条件あたり異なる観察像6枚について解析した。

3. 実験結果

3.1 凍結温度履歴

図1に得られた凍結温度履歴を示す。全試料において凍結開始点は約-2℃だった。全試料において凍結前に過冷却現象が見られたが、過冷却度は0.5~1℃程度であり、また過冷却解消後の凍結に40分程度を要した。データは示していないが、同条件でマアジ筋肉組織を凍結させた際、過冷却現象が無い場合においても凍結に40分程度要した。過冷却度が大きいほど凍結時の氷結晶が微細化することが報告されているが¹⁶⁾、過冷却度が大きくとも過冷却解消後の冷却が遅い場合には氷結晶が粗大になることが報告されている¹⁷⁾。本研究では過冷却度も小さく、また過冷却解消後の冷却が十分な速さではなかったことから、過冷却現象による氷結晶サイズへの影響は考慮不要な程度であると考えられ、全試料はほぼ同一速度にて凍結されたと見なすことができる。さらに、中心温度が-25℃に達した後、2.5に記した通り急速に冷却し、十分な低温で保持したので再結晶化による氷結晶の粗大化は起きていないと考えられる。

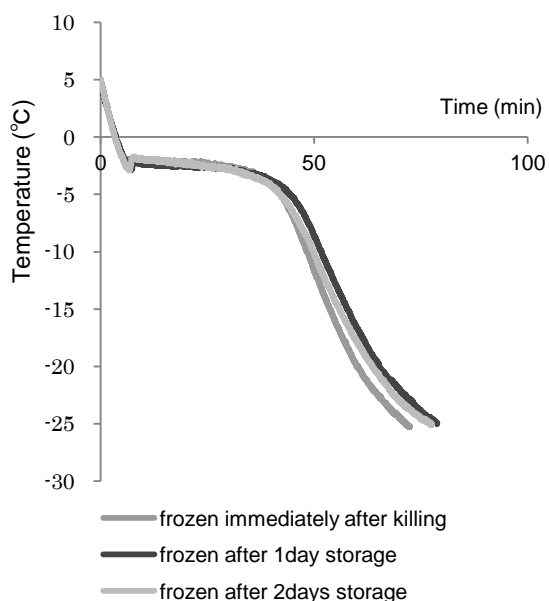


Fig.1 The cooling curve during freezing of muscle tissues of horse mackerel

3.2 筋肉組織中 ATP 関連物質組成

筋肉組織にはアデノシン三リン酸(adenosine 5'-triphosphate; ATP)がエネルギー供給源として蓄積されている¹⁸⁾。魚体の死後変化過程において ATP は関連酵素によって ADP, アデノシン一リン酸(adenosine 5'-monophosphate; AMP), イノシン酸(inosine 5'-phosphate; IMP), イノシン(inosine; Ino), ヒポキサンチン(hypoxanthine; Hx)の順に分解されるが、IMP の分解は比較的遅く、蓄積し易い^{19,20)}。

ATP 関連物質の分析結果を図2に示す。保存0日目の即殺群では ATP が約 6μmol/g 含まれていた。Mishima らの報告¹⁰⁾では、即殺直後のマアジ筋肉組織内 ATP 量が約 7μmol/g だったことから、本研究においても試料魚は比較的安静に処理されたといえる。

生体での筋収縮は筋肉細胞内の Ca²⁺濃度によって制御されるが、死後変化の過程で Ca²⁺濃度が制御できなくなり筋収縮が引き起こされる²¹⁾。筋肉の弛緩には ATP の供給が必須であるが²²⁾、死後の筋肉組織では ATP の供給が断たれ、収縮状態が維持される^{20,21)}。このような死後の持続的な筋収縮は死後硬直と呼ばれる²⁰⁾。図2にあるように、保存1日目で既に ATP 残存量が激減しており筋肉細胞では死後硬直が起きていたことが推察される。また、保存に伴って IMP の蓄積及び Ino, Hx の増加が見られており、酵素反応による ATP 関連物質の分解が進行していたことが分かる。

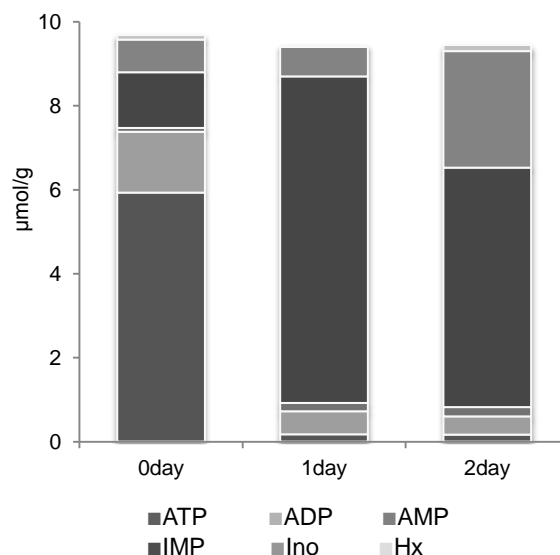


Fig.2 Time dependent changes in ATP-related compounds during storage in the dorsal muscle tissue of horse mackerel

3.3 筋肉組織の保水力の差異

図3に保水力評価の結果を示す。遠心ドリップ、推算残存水、固形成分それぞれが全体に占める割合を百分率で表した。保存に伴う固形成分の有意な変化はなかった。遠心ドリップは死直後には僅かだったが、保存に伴って増加し、また推算残存水の減少がみられた。すなわち、マアジ筋肉組織では凍結前の冷蔵保存中に保水力が低下していたといえる。

死後の筋肉組織では様々な要因によって保水力が低下すると考えられている²³⁾。とくに、死後硬直進行時には種々の代謝が進行し、筋肉細胞の保水力が下がるためドリップロスが増加する²³⁾。なかでも、乳酸の蓄積は筋肉細胞内のpH低下をもたらし、タンパク質を部分的に変性させるため、細胞内に保持されている水の流出を招くと言われている²³⁾。Mishimaら¹⁰⁾、望月ら²⁴⁾は即殺後冷蔵保存したマアジ筋肉組織内では保存開始24~26時間で乳酸が相当量蓄積されていることを報告している。また、魚類筋肉組織における死後硬直後の細胞内の水の運動性の上昇は¹H-NMRを用いたタイセイヨウサケ背側筋肉組織に関する実験から示されている⁶⁾。本研究では、3.2で示したようにATP残存量から保存1日目で死後硬直が開始していたことが示唆されており、保存期間中における遠心ドリップの増加傾向は死後硬直に伴う細胞内の水の束縛度の低下を反映していると考えられる。

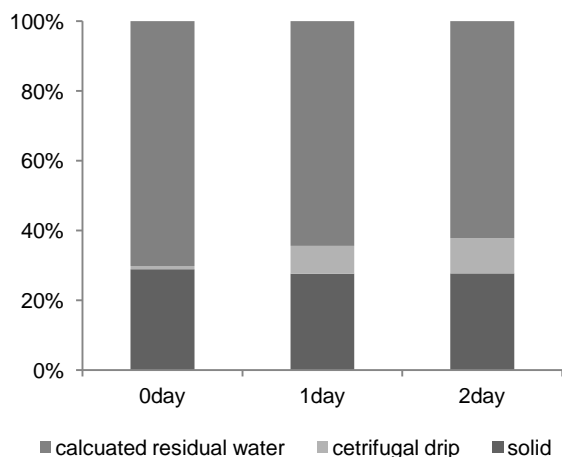


Fig.3 Time dependent changes of water holding capacity during storage in the dorsal muscle tissue of horse mackerel

3.4 結合組織の観察

筋肉組織ではコラーゲン線維によって補強された細胞外マトリクスが神経枝、毛細血管、線維芽細胞などと共に結合組織を構成し、筋繊維

間の超分子ネットワークを生み出している²⁵⁾。本研究ではアルカリ水浸軟法を用いたのでアルカリ可溶性成分は殆ど溶出しており、観察されるのは主にアルカリ不溶性のコラーゲン線維である¹³⁾。

図4に結合組織のSEM像を示す。図4-A、図4-B、図4-Cはそれぞれ即殺後保存0、1、2日目のアルカリ水浸軟を施した筋肉組織内結合組織である。保存日数に依らず、蜂の巣様の構造が観察された。蜂の巣構造にある中心部の空洞は筋肉細胞が存在していた部分であり、これらの構造は主にコラーゲン線維によって形成されている。保存日数に依らず蜂の巣構造が観察されており、大規模な構造破壊はなかったといえる(図4-A-i,B-i,C-i)。しかし、即殺後保存0日目ではコラーゲン繊維が密に集積して結合組織を構築しているのに対し(図4-A-ii 矢印)、保存1日目では既にコラーゲン繊維網の密度が粗くなっており(図4-B-ii 矢印)、保存2日目ではコラーゲン繊維間に大きな隙間が空いているのが見えるほど構造が疎らになっていた(図4-C-ii 矢印)。これらの結果と同様な結果がニジマスを用いた場合にも報告されており¹²⁾、筋肉組織の死後変化の過程で結合組織の脆弱化が進行していたといえる。このような結合組織の脆弱化は、死後変化の過程でマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)などのタンパク質分解酵素が作用し、結合組織中のコラーゲンを分解することに起因する^{18,26,27)}。とくに、魚類筋肉組織を構成するコラーゲンのうち95%を占めるコラーゲン type I を分解する MMP-9 は冷蔵温度でも十分な酵素活性を示すことが報告されており²⁶⁾、冷蔵保存であっても結合組織の脆弱化は酵素分解が原因といえる。

健全な筋肉組織ではコラーゲン繊維が筋収縮時にその配列を変えることで歪を解消していると言われている¹³⁾。すなわち、結合組織が脆弱化すると筋細胞の変形に伴う歪が解消されづらくなるので、筋肉組織全体が軟化すると考えられる。実際に、Andoらは魚類筋肉組織の死後変化過程で結合組織の構造崩壊に伴って破断荷重が減少することを示している¹²⁾。したがって、図4-Bや図4-Cのようにコラーゲン繊維が疎らになった状態では、筋細胞の変形に対する結合組織の抵抗力が落ちていると考えられる。

3.5 筋肉組織内の氷結晶観察

図5に蛍光顕微鏡によるマアジ筋肉組織横断面の観察像を示す。本研究で免疫染色の標的としたLamininは細胞外マトリクスの構成タンパク質の一種である²⁵⁾。本研究で用いた蛍光色素は蛍光極大が519nmであるので、観察像では細

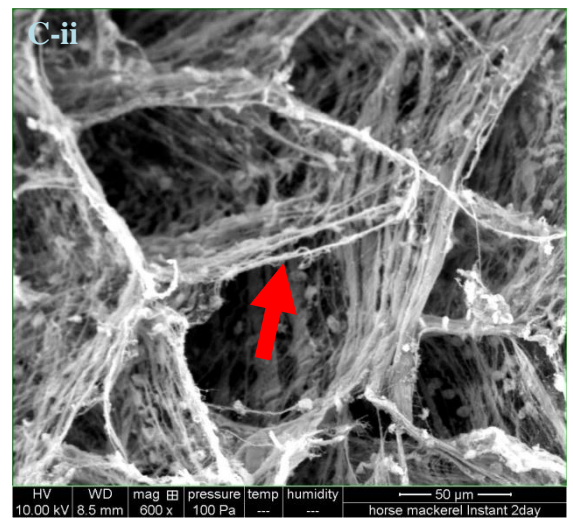
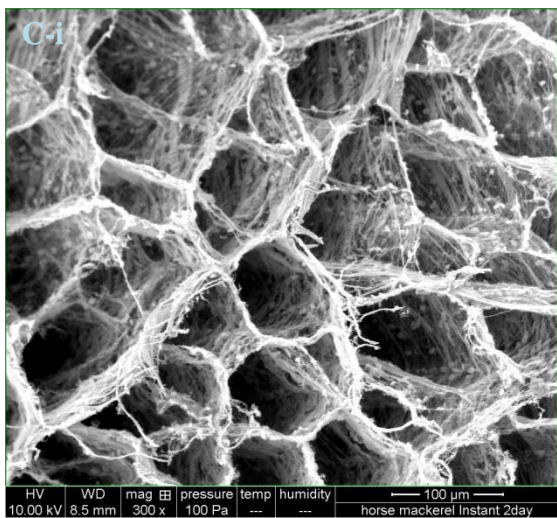
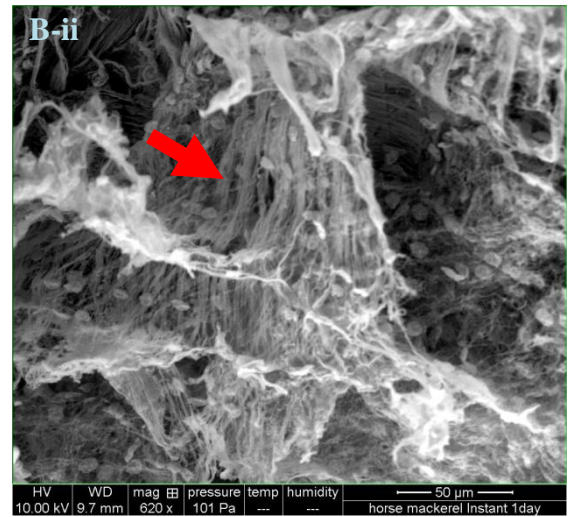
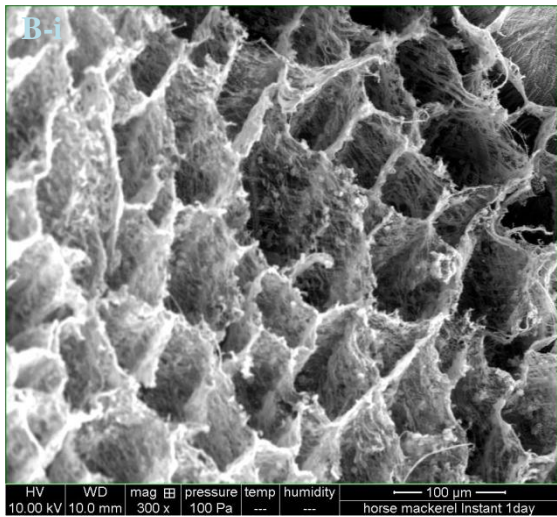
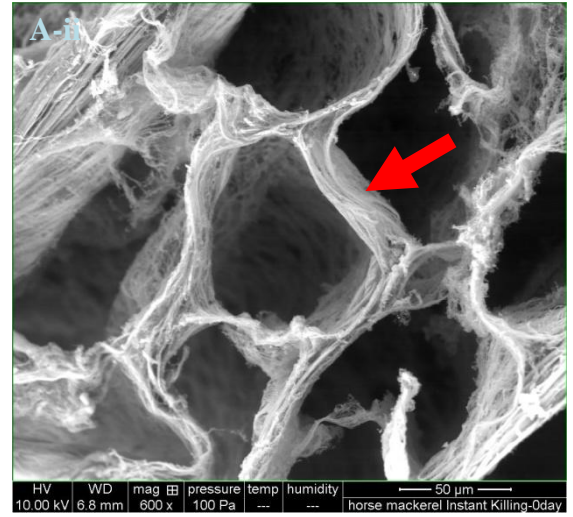
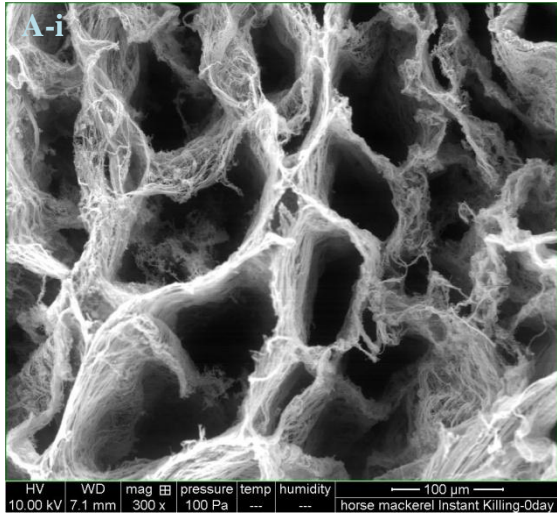


Fig.4 The connective tissue of horse mackerel muscle. A:0day stored, B: 1day stored, C: 2days stored. i: original magnification $\times 300$, ii: original magnification $\times 600$ or 620 .

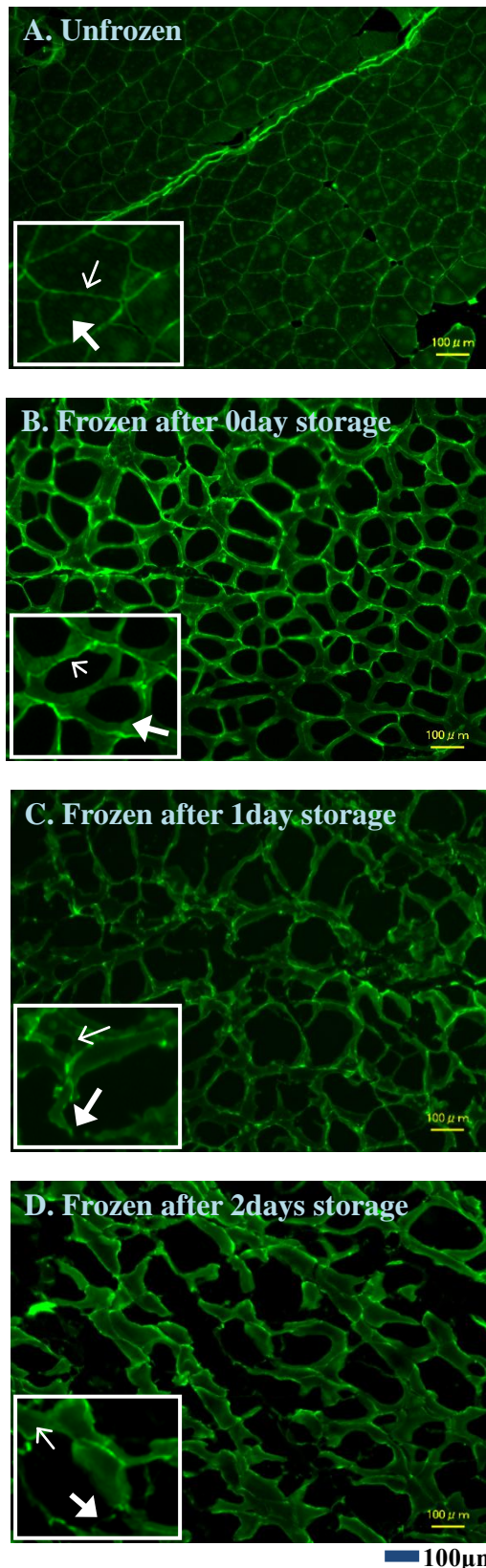


Fig.5 Immunohistochemical analyses on transverse sections of muscle tissue of horse mackerel killed instantly. A: Immediately after death, B, C, D: Frozen after storage for 0, 1, 2 day. Small boxes are enlarged view of the signature region. Bar, 100 μ m.

胞外マトリクスから強い緑色の蛍光が観察される。組織切片の氷結晶痕からの蛍光は無いので像の黒色部は氷結晶痕にあたる¹⁴⁾。また、細胞質部分からは有機物由来の自家蛍光が発生するため薄い緑色蛍光が見られる。

図 5-A は 0 日目の凍結前マアジ筋肉組織の観察像である。筋肉組織において単位細胞である筋繊維(図 5-A 太矢印)の間を細胞外マトリクス(緑色蛍光部分), (図 5-A 細矢印)が埋めている様子が分かる。

図 5-B, 5-C, 5-D はそれぞれ即殺後 4°C で 0, 1, 2 日間保存した後に凍結したマアジ筋肉組織の観察像である。即殺直後に凍結した場合には(図 5-B), 氷結晶に圧縮された細胞質(図 5-B 太矢印)とそれらを囲む細胞外マトリクス(図 5-B 細矢印)が見られたが細胞の配列は完全には崩れていなかった。即殺した魚体を 1 日保存した後に凍結した組織(図 5-C)では大きい氷結晶と小さい氷結晶が疎らに分布している様子が見られ、トポロジカルな形態を維持している細胞(図 5-C 細矢印)と細胞質が激しく圧縮されて細胞外マトリクスまで断裂している細胞(図 5-C 太矢印)の両方が多数見られた。さらに、保存 2 日後に凍結した組織(図 5-D)では細胞の配列は大きく崩れており、巨大な氷結晶の傍らに小さく圧縮された細胞(図 5-D 細矢印)や氷結晶により断裂されている細胞(図 5-D 太矢印)が見られた。これらの結果から、即殺した魚体では凍結前の保存期間が長くなるほど凍結時の氷結晶は粗大化し、さらに氷結晶により断裂される細胞と圧縮される細胞の両方が増えるといえる。そこで、画像解析を行って氷結晶サイズを詳細に調べた。

3.6 画像解析

図 6 は画像解析によって得られた氷結晶のサイズ毎の生成数をまとめたヒストグラムである。横軸が氷結晶サイズ(μm^2), 縦軸が氷結晶数の構成比(%)である。凍結前保存時間によってヒストグラムの形状が変化しており、即殺直後に凍結した組織では生成した氷結晶の約 65%が $10^3 \sim 10^4 \mu\text{m}^2$ だったが、保存 2 日後に凍結した組織では巨大な ($10^4 \mu\text{m}^2$ 以上)氷結晶と微小な ($10^2 \mu\text{m}^2$ 以下)氷結晶の両方が多く生成していた。そして、今回試料に使用したマアジ筋肉組織の平均細胞サイズは約 $7000 \mu\text{m}^2$ だった(データは示していない)ことから、凍結前の保存期間が長くなると細胞サイズを超える氷結晶が生成しやすい傾向にあることが分かる。実際の観察像においても、凍結前保存期間 0 日の魚体では細胞内氷結晶が多く観察されており、2 日保存後に凍結した組織では細胞を断裂するほど巨大な氷結晶が多く観察されている。したがって、得ら

れたヒストグラムは観察像を的確に反映しており、観察された凍結状態の変化を定量的に表現できたといえる。

図7に画像解析によって求めた平均氷結晶サイズ及び観察視野あたりの氷結晶数を示す。保存期間を経るごとに平均氷結晶サイズは大きくなり、氷結晶数は減少した。これらの結果から、組織の凍結前保存期間が長い場合には、凍結時に組織内で発生した氷結晶1個に対してより多くの水が集まり易く、粗大化する傾向にあると考えられる。

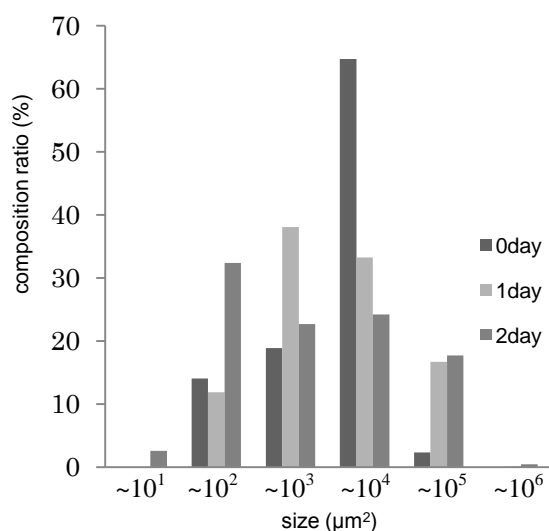


Fig.6 Histogram of ice crystal size in frozen tissue of horse mackerel after storage for 0, 1, 2 days

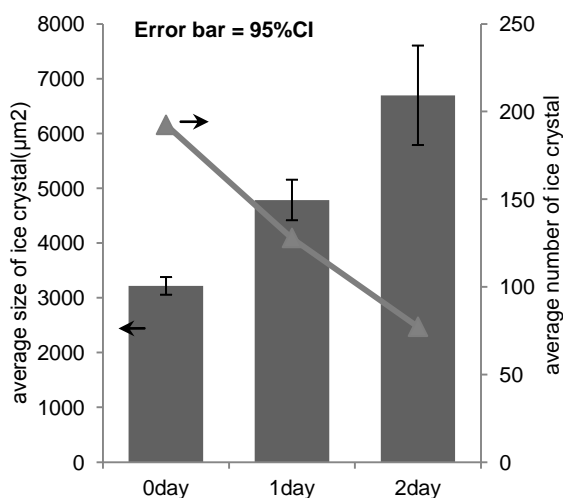


Fig.7 The average size and the number of ice crystal in the frozen dorsal muscle tissue of horse mackerel

4. 考 察

本研究の結果から、凍結前の冷蔵保存期間によって凍結時の筋肉組織内氷結晶形態に差異があることが定量的に示された。とくに、凍結前冷蔵保存期間が長くなるにつれて凍結時に筋肉組織内で巨大な氷結晶による細胞破壊が多く見られた(図5, 図6, 図7)。

凍結前の組織において、冷蔵保存に伴う ATP 残存量の減少及び ATP 分解物の増加があったことから死後変化の進行が示された(図2)。そして、死後の生化学的変化や死後硬直に伴って保水力が低下し、結合組織が脆弱化していた(図3, 図4)。保水力の低下は筋肉組織内の水の束縛度の低下を示し、また結合組織の脆弱化は筋細胞の変形に対する抵抗力の低下を示しているといえる。

本研究で得られた結果を統合すると、凍結前冷蔵保存期間中の魚類筋組織では、死後変化の進行によって組織内で水が移動し易くなるので発生した個々の氷結晶に対して周囲の水が集まり易く、氷結晶が粗大化し易くなり、同時に結合組織の脆弱化によって氷結晶による細胞破壊が容易になるので、顕著に氷結晶が粗大化すると考えられる。

本研究の結果より、魚類筋肉組織では凍結前冷蔵保存期間によって凍結時の氷結晶生成様態が明らかに異なることが定量的に示された。したがって、凍結組織中の氷結晶形態によって種々の凍結手法の評価を行う際、魚類筋肉組織を用いる場合には筋肉組織の死後変化に留意する必要があるといえる。

5. 結 論

マアジ筋肉組織では4°Cでの保存中に ATP 分解生成物が増加することから死後変化の進行が確認され、また保水力の低下や結合組織の脆弱化がみられた。そして、即殺直後に凍結した組織では氷結晶の成長が細胞内に留まっている様子が観察されたのに対し、凍結前に2日保存した組織では細胞サイズを超えた粗大な氷結晶が観察された。さらに、画像解析の結果から凍結前保存期間の差によって凍結時の氷結晶のサイズ及び数が異なっていることが分かった。これらの結果から、魚類筋肉組織において凍結前冷蔵保存期間中に生ずる組織変化は凍結時の氷結晶生成に深く関係していることが定量的に示された。

謝 辞

本研究では安藤正史教授(近畿大学)に結合組織観察に関するご指導を賜った。ここに深謝の意を表す。また、株式会社キーエンスの飯草英明様にご協力頂いた。感謝申し上げる。

文 献

- 1) 福田裕; 中央水研報, **8**, 77(1996).
- 2) E. Bilinski, R. E. E. Jonas, Y. C. Lau and G. Gibbard: J. Fish. Res. Board Can., **34**, 1431(1977).
- 3) T. A. Gill, R. A. Keith and B. S. Lall: J. Food Sci., **44**, 661(1979).
- 4) A. M. Herrero, P. Carmona, M. L. García, M. T. Solas and M. Careche: J. Agric. Food Chem., **53**, 2558(2005).
- 5) L. Foucat, R. G. Taylor, R. Labas and J. P. Renou: American Laboratory, **33**(16), 38(2001).
- 6) I. G. Aursand, E. Veliyulin, U. B öcker, R. Ofstad, T. Rustad and U. Erikson: J. Agric. Food Chem., **57**, 46(2009)
- 7) 加藤舜郎: 「食品冷凍の理論と応用」, pp.358-362, 光琳書院,東京(1966).
- 8) R. M. Love: J. Sci. Fd. Agric., **17**, 465(1966).
- 9) 小南友里, 渡辺学, 鈴木徹: 農化要旨集, 3J15P14(2012).
- 10) T. Mishima, T. Nonaka, A. Okamoto, M. Tsuchimoto, T. Ishiya, K. Tachibana and M. Tsuchimoto: Fisheries Science, **71**, 187(2005).
- 11) Y. Hu, J. Zhang, K. Ebitani and K. Konno: Nippon Suisan Gakkaishi, **79**, 219(2013). (in Japanese)
- 12) P. N. Kocher and E. A. Foegeding: J. Food Science, **58**(5), 1040(1993).
- 13) M. Ando, Y. Yoshimoto, K. Inabu, T. Nakagawa and Y. Makinodan: Fisheries Science, **61**(2), 327(1995)
- 14) O. Ohtani, T. Ushiki, T. Taguchi, A. Kikuta: Arch. Histol. Cytol., **51**(3), 249(1988)
- 15) Y. Kominami, M. Watanabe and T. Suzuki: Trans. JSRAE, **29**(2), 307(2012). (in Japanese)
- 16) 渡辺学, 兼坂尚宏, 鈴木徹: 日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 129-130(2012)
- 17) S. Charoenrein, N. Preechathamwong: J. Food Eng., **100**, 310(2010)
- 18) H. R. Horton, L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn and K. G. Scrimgeour (鈴木絃一, 笠井猷一, 宗川吉汪 監訳): 「ホートン 生化学 第3版」, pp. 231-273, 東京化学同人, 東京(2005).
- 19) 内山均, 江平重男, 加藤登, 橋本周久: 「魚の品質」, 水産学シリーズ [4], pp.81-103, 恒星社厚生閣, 東京(1992).
- 20) 岡崎恵美子: 「新版 食品冷凍技術」(新版 食品冷凍技術 編集委員会 編), pp.67-104, 社団法人 日本冷凍空調学会, 東京(2009)
- 21) S. Watabe, H. Ushio, M. Iwamoto, H. Yamanaka and K. Hashimoto: J. Food Science, **54**(5), 1107(1989).
- 22) L. Marcucci and T. Yanagida: PLoS ONE, **7**(7), e40042(2012)
- 23) E. H. Lonergan and S. M. Lonergan: Meat Science, **71**, 194(2005)
- 24) S.Mochizuki and A. Sato: Nippon Suisan Gakkaishi, **60**(1), 125(1994). (in Japanese)
- 25) N.C. Voermans, C.G. Bönnemann, P.A. Huijing, B.C. Hamel, T.H. van Kuppevelt, A. de Haan, J. Schalkwijk, B.G. van Engelen and G.J. Jenniskense: Neuromuscular Disorders, **18**(11), 843 (2008).
- 26) Y. Shigemura, M. Ando, K. Harada and Y. Tsukamasa: Fisheries Science, **70**, 703(2004).
- 27) M. Kubota, M. Kinoshita, K. Takeuchi, S. Kubota, H. Toyohara and M. Sakaguchi: Fisheries Science, **69**, 1053(2003).