

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07589

研究課題名(和文) 血合肉含有低分子セレン化合物の栄養有効性と抗がん活性の評価

研究課題名(英文) Nutritional Availability and Anti-tumor Activity of Low Molecular Weight Selenium Compound Contained in Dark Muscle

研究代表者

吉田 宗弘 (YOSHIDA, MUNEHIRO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：30158472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、今まで明らかになっていない血合肉に含まれる低分子セレン化合物の栄養有効性と抗がん活性を評価した。その結果、マグロ血合肉から希塩酸で抽出した中に含まれる低分子セレン化合物の栄養有効性は、亜セレン酸ナトリウムおよびマグロ血合肉粉末よりも低いことが示唆された。化学物質によって惹起した大腸前癌病変モデルマウスを用いて、血合肉から希塩酸で抽出した中に含まれるセレン化合物の抗がん活性を評価したが、セレン以外の化合物の影響により、セレン化合物の抗がん活性を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is evaluated nutritional availability and anti-tumor activity of selenium contained in a low-molecular weight fraction of dark muscle. This study showed that nutritional availability of selenium contained in a low-molecular weight fraction of dark muscle of tuna is low compared to selenite or selenium contained in a protein fraction of the dark muscle. In addition, due to the influence of other compound in a low-molecular weight fraction, anti-cancer activity of low-molecular weight fraction of dark muscle of tuna could not be evaluated.

研究分野：栄養化学

キーワード：セレン 血合肉 栄養有効性 抗がん活性

## 1. 研究開始当初の背景

セレン (Se) の生物学的利用能 (栄養有効性) とは、食品中セレンのうち、生体内において真に機能を発現するものの割合 (含セレンタンパク質に取り込まれる割合) をさしてあり、消化吸収率と体内利用率をあわせた概念である。申請者らはこれまでに、各食品に含まれるセレンの栄養有効性に関する研究を行っており、セレンの栄養有効性は化学構造の違いで異なり、セレン含量と栄養有効性の間にはしばしば矛盾が生じている。亜セレン酸を基準にした場合、セレン酵母、脱脂脱水処理したマグロ血合肉は高い栄養有効性を示したが、加熱カツオ血合肉、セレン強化カイワレ・カボチャは低い栄養有効性であった。その研究の中で日本人の主要なセレン供給源であるカツオやマグロ血合肉に含まれるセレンの栄養有効性について疑問が生じている。

本研究で焦点をあてるカツオやマグロ血合肉にはセレンが多く含まれており、日本人のセレン摂取割合の約 3 割を占める。魚介類血合肉に含まれるセレンは、他の食品中セレンよりもラットを用いた栄養試験において、組織中セレン濃度とグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) 活性を指標とした栄養有効性が低いことを報告してきた。しかし、申請者らは血合肉を脱水脱脂することによりセレンの栄養有効性が飛躍的に向上することを見出している。このことからカツオやマグロ血合肉中のセレンは、栄養有効性の高い構造と低い構造が共存していると考えられる。申請者は血合肉中の約 3 分の 2 を占める栄養有効性の高いセレン化合物は、タンパク質結合性のセレノシスチンであることを確認した。また山下らは、マグロ血液中から新規のセレン化合物が単離・構造決定し、「セレノネイン」と名付けた。セレノネインは低分子量かつ水溶性であるために、申請者らのこれまでの研究結果と照らし合わせると、カツオやマグロに含まれる低いセレン栄養有効性をもつ化合物がセレノネインである可能性が高い。血合肉中低分子セレン化合物の栄養有効性を明らかにすることは、現実の食生活において実質的にどの程度影響しているかを判断するエビデンスとなることが期待される。

またセレンの抗がん活性が疫学研究や動

物実験で認められており、セレンサプリメントに関心が集まっている。申請者らも、Se-メチルセレノシスチンを含むセレン強化カイワレプラウトの抗がん活性について報告した。セレン化合物は発がん抑制やがんの治療・再発防止に有効であると考えられるが、セレン自身の高毒性ゆえに、医薬品などへの応用は進んでいないのが現状である。これまで報告のあるセレン化合物の栄養有効性と毒性のデータから、栄養有効性と毒性は比例していると考えられる。

## 2. 研究の目的

これらのことより、血合肉中のセレン栄養有効性の低いと予測される化合物は、低毒性と予測される。そのため、他のセレン化合物と比べ、安全かつ抗がん作用を有効的に発揮できる構造であると期待できる。そこで本研究では、血合肉に含まれる低分子セレン化合物の栄養有効性と抗がん活性を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) 栄養有効性の評価

#### 試料調製

メバチマグロ (*Thunnus obesus* (Bonnaterre)) の血合肉 (新鮮重量当たりのセレン濃度, 9.67  $\mu\text{g/g}$ ) を試料とした。血合肉を 20 倍量の 0.1 M 塩酸中でホモジナイズし、遠心して上清 (血合肉希塩酸抽出液) を得た。抽出液を炭酸水素ナトリウムで中和後、凍結乾燥し、細粉化した。得られたマグロ血合肉希塩酸抽出物粉末のセレン濃度は 110  $\mu\text{g/g}$  であった。また、上記とは別に血合肉全体を凍結乾燥してミルで細粉化し、血合肉乾燥粉末 (セレン濃度, 36  $\mu\text{g/g}$ ) を調製した。

#### 動物実験

本動物実験は関西大学化学生命工学部動物実験委員会の承認を得て実施した。3 週齢の A/J 雄マウス 24 匹に AIN93G 餌料からセレン酸を除去した低セレン基本餌料 (セレン濃度, 32  $\text{ng/g}$ ) を 3 週間与えた。その後、6 匹ずつ 4 群に分け、1 群にはそのまま低セレン基本餌料を、残りの 3 群には基本餌料に 100  $\text{ng/g}$  に相当するセレンを亜セレン酸ナトリウム、乾燥血合肉粉末、または血合肉希塩酸抽出物粉末の形態で添加したセレン添加食を与え、さらに 1 週間飼育した。飼育期

間終了後、イソフルラン麻酔下で肝臓と血液を採取した。

#### セレン濃度および GPX 活性

セレンの定量は、血合肉と肝臓は硝酸で灰化した試料および血清を純水で適宜希釈し、含有されるセレンを誘導結合プラズマ質量分析 (ICPMS) により定量した。内部標準元素にはテルルを用いた。

GPX 活性の測定において、血清と 10% 肝臓ホモジネート中の GPX 活性は、過酸化物の基質として *tert*-ブチルヒドロペルオキシドを用い、生成した酸化型グルタチオンをグルタチオンレダクターゼで還元する際に消費される NADPH 量を追跡する方法で測定した。

#### (2) 抗がん活性の評価

##### 試料調製

クロマグロ (*Thunnus obesus*) の血合肉 (新鮮重量当たりのセレン濃度, 1.74  $\mu\text{g/g}$ ) を試料とした。3, (1), と同様の方法で調製したマグロ血合肉希塩酸抽出物粉末のセレン濃度は 27.4  $\mu\text{g/g}$  であった。

餌料は AIN93G をもとに、タンパク質源をカゼインとする未処置群および対照群餌料、血合い肉希塩酸抽出物を添加した餌料を調製した。

##### 動物実験

4 週齢雄性 A/J マウスを未処置群は 4 匹、対照群および希塩酸抽出物群は 9 匹飼育した。水および餌料は自由摂取とした。飼育 1 週間後、未処置群以外のマウスにアゾキシメタン (AOM 10 mg/kg 体重) を腹腔内投与した。飼育 2~3 週の間、2% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水溶液を飲水として与えた。飼育 31 日後、常法により、大腸を摘出し、中性緩衝ホルマリン溶液で組織固定した。

##### ACF 測定

24 時間固定した大腸を 0.02% メチレンブルー液で 5 分間染色し、光学顕微鏡で発癌評価に有効なバイオマーカーである異常腺窩が 4 個を超えて集合して形成した ACF 数をカウントした。

#### 4. 研究成果

#### (1) 栄養有効性

低セレン飼料で 3 週間、セレン添加飼料で 1 週間飼育した各群マウスの体重は、各群間に差を認めなかった。また、解剖時の臓器重量にも各群間の有意差はなかった。

図 1 に各群の血清および肝臓のセレン濃度を示した。血清と肝臓のセレン濃度は、いずれも対照群に比較して、セレン源を添加した 3 群において上昇が認められた。しかし、上昇の程度には、セレン源の違いの影響が認められ、亜セレン酸がもっとも効果が大きく、次いで血合肉粉末であり、血合肉希塩酸抽出物の効果がもっとも小さかった。

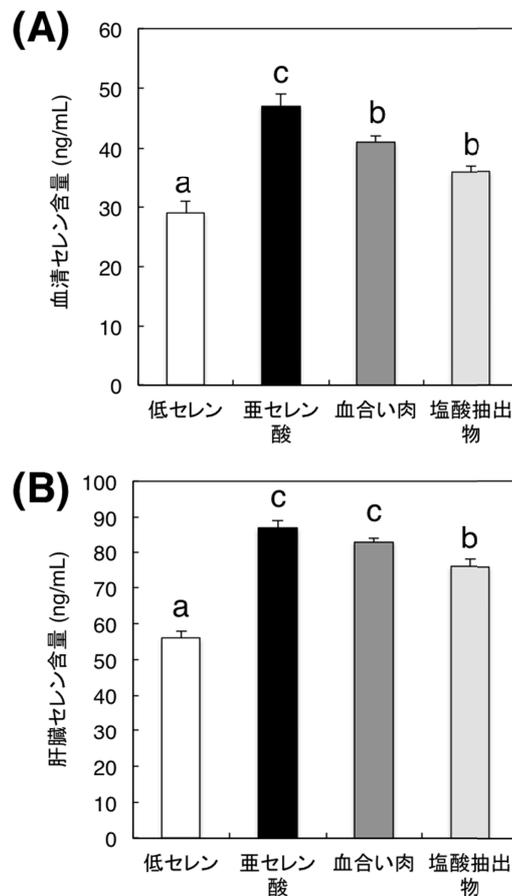


図 1 血清および肝臓のセレン濃度  
平均値  $\pm$  SEM .

異なるアルファベット間で有意差有り .

図 2 は各群の血清および肝臓の GPX 活性を示した。亜セレン酸添加飼料を与えたマウスの肝臓 GPX 活性は、低セレン飼料を継続して投与した対照群に比較して有意に上昇したが、血合肉または血合肉希塩酸抽出物粉末をセレン源として与えた 2 群の GPX 活性にはほとんど上昇が認められなかった。また、血清 GPX 活性においても、有意ではないが

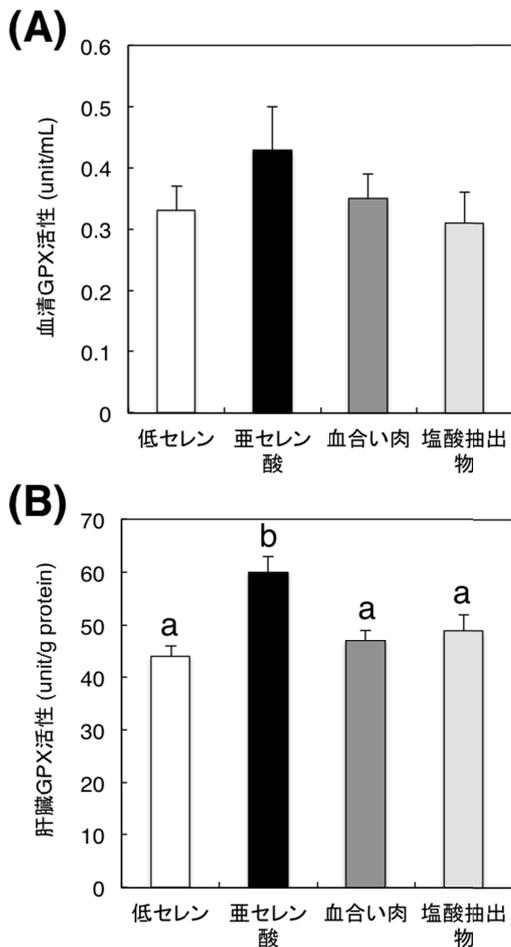


図2 血清および肝臓のGPX活性  
 平均値 ± SEM .

異なるアルファベット間で有意差有り .

( $p = 0.092$ )、同様の傾向を認めた。血合肉または血合肉抽出物による血清と肝臓のセレン濃度、および肝臓 GPX 活性の増加量を亜セレン酸による増加量を 100 とした相対的な数値で示すと、肝臓セレン濃度では血合肉粉末が 86.9、血合肉希塩酸抽出物が 63.4、血清セレン濃度では血合肉粉末が 64.1、血合肉希塩酸抽出物が 34.1、肝臓 GPX 活性では血合肉粉末が 15.5、血合肉希塩酸抽出物が 26.1 となった。以上のことは、血合肉に含まれるセレンの栄養有効性が亜セレン酸に比較して低く、血合肉希塩酸抽出物の有効性が血合肉全体よりもさらに低いこと示している。血合肉から希塩酸で抽出される成分は低分子化合物であると推定できる。セレノネインは構造的に極性が高く、エタノールやアセトンには可溶であると考えられる。アセトン処理によって低分子成分を除去してタンパク質画分のみとした脱脂血合肉の栄養有効性が亜セレン酸に匹敵したという過去の研究結

果と今回の結果をあわせると、血合肉全体のセレンの低有効性の原因は、希塩酸によって抽出されるセレノネインをはじめとする低分子性のセレンにあると推定できた。このことから、マグロ血合肉から希塩酸で抽出した中に含まれるセレンの栄養有効性は、亜セレン酸ナトリウムおよびマグロ血合肉粉末よりも低いことが示唆された。

## (2) 抗がん活性

AOM 投与後に約 20%の体重減少がみられ、その後体重は増加に転じた。また、対照群および希塩酸抽出物群において、DSS 投与時とともに 9 匹中 3 匹の死亡が確認された。これ以降は、6 匹で実験を続けた。

解剖時の体重および臓器重量について、対照群および希塩酸抽出物群に有意な変化は確認されなかった。解剖時に取り出した大腸を用いて、粘膜をメチレンブルーによって染色を行い、計測した ACF 数を図 3 に示した。

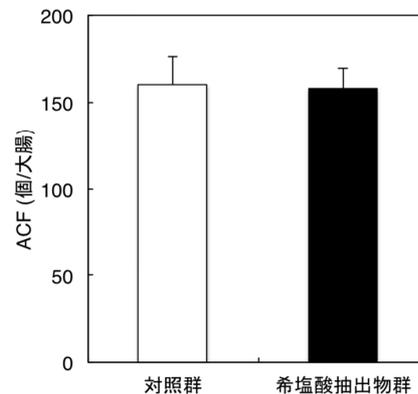


図3 大腸のACF数  
 平均値 ± SEM .

未処置群では ACF は確認されなかった。ACF 数は、対照群と比較して、希塩酸抽出物群では、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。希塩酸抽出物群で ACF 数が減少しなかった理由として、クロマグロ血合肉に含まれている低分子セレン化合物を単離することが出来なかったため、血合肉を 0.1 M 塩酸でホモジナイズした上清 (希塩酸抽出物、セレン濃度 27.3  $\mu\text{g/g}$ ) を用いたことが原因と考えられる。希塩酸抽出物には、低分子セレン化合物以外にも、ミオグロビン由来と考えられる鉄が含まれていたため、鉄が大腸組織の損傷を促進したことが予測される。本実験では、鉄が含有する粗画分を用い

たために、鉄の影響が大きく、低分子セレン化合物の抗がん活性を評価することは叶わなかった。

<引用文献>

M. Yoshida, Biomed Res Trace Elem, 2008

M. Yoshida *et al.*, Food Addit Contam, 2002

M. Yoshida *et al.*, Trace Nutr Res, 2003

Y. Yamashita *et al.*, J Biol Chem, 2010

M. Yoshida *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem, 2007

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

由上文子, 吉田宗弘, 細見亮太, 福永健治, 加熱調理が牛肉中の鉄とセレンの栄養有効性に及ぼす影響, 日本健康医学会誌, 26(1), 17-22, 2017 . 査読有

廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸またはセレノメチオニンの栄養有効性に及ぼす投与期間の影響, 微量栄養素研究, 33, 9-12, 2016 . 査読有

廣瀬侑太郎, 崔懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の希塩酸抽出物に含まれるセレンの栄養有効性, 微量栄養素研究, 32, 1-3, 2015 . 査読有

〔学会発表〕(計3件)

廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸とセレノメチオニンの有効性に及ぼす投与期間の影響, 第33回日本微量栄養素学会, 2016.

由上文子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 生およびローストした牛肉に含まれる鉄とセレンの栄養有効性, 日本ビタミン学会第68回大会, 2016.

廣瀬侑太郎, 崔懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性, 第32回日本微量栄養素学会, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://ku-food-lab.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 宗弘 (YOSHIDA, Munehiro)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：30158472

(2)研究分担者

福永 健治 (FUKUNAGA, Kenji)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：30278634