

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07948

研究課題名(和文) 野菜の水銀吸収阻害作用を利用した養殖魚水銀量の低減化とヒト向けサプリメントの開発

研究課題名(英文) Reduction of mercury levels in cultured fish and development of human supplements using the inhibitory effect of vegetables on mercury absorption

研究代表者

安藤 正史 (Masashi, Ando)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80247965

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)：研究全体を通じて、あくまでもモデル実験のレベルではあるが、様々な野菜に分子量や電気的性質の異なる多種類の水銀吸収阻害効果をもつ物質が存在する可能性が認められた。最終的に飼育実験において有効性が認められなかった点が残念である。しかしながら、物質を単離したのち、餌への混入率を上げることができれば魚体の水銀レベルを低減させることが大いに期待される。物質の単離のための評価系については様々な改善点が浮かび上がってきており、今後さらに精度を上げて研究を進めていくための土台ができたこともまた本研究の大きな成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル水銀の吸収は特に胎児にとって問題となる。これを軽減するため野菜汁の有効性を検討してきたが、多くの野菜がメチル水銀の吸収をある程度抑えられることが明らかとなった。これが養殖魚の餌に混入されることで、魚自身の水銀濃度を下げることができ、将来的にはヒト向けのデトックスサプリメントの材料になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Throughout the study, although it was only at the level of model experiments, it was recognized that there may be many kinds of substances with different molecular weights and electrical properties that have an inhibitory effect on mercury absorption in various vegetables. It is unfortunate that the final results did not show efficacy in breeding experiments. However, if we can isolate the substances and increase the rate of incorporation into the diet, it is highly expected to reduce the mercury level in fish. Various improvements have been made to the evaluation system for the isolation of the substance, and the fact that a foundation for further research with higher precision has been established is also a major achievement of this study.

研究分野：水産化学

キーワード：メチル水銀 野菜 養殖魚 デトックス

1. 研究開始当初の背景

近年、着実に人々の健康を脅かしていることのひとつに水銀の問題がある。平成 16 年には厚生労働省がキンメダイなどに含まれる水銀の危険性を発表した。また国際的には水銀の使用を制限する水俣条約の締結が先進国を中心に進みつつある。

ところで、このような状況にはあるものの、日本国内での関心はそれほど大きいとはいえない。その理由として、現状の水銀汚染レベルでは致命的な問題とはならないことが大きい。しかしながら、水銀中毒は神経系に影響を及ぼすため、胎児への影響はもとより、成長期にある幼児への影響も無視できない。実際、この点に関しては厚生労働省から妊婦に対して魚介類の過剰摂取に関する注意喚起が行われている。

日本人の水銀摂取量の約 90% は魚介類由来である(厚生労働省, 2004)。よって魚介類の摂取量を減らせば解決する問題にも見えるが、魚介類は良質な栄養源であり、摂取量を減らすのは好ましい対策ではない。そこで、水銀の摂取量を減らすためには、魚介類に含まれる水銀量を減らすことが重要なポイントとなる。この点に関する国際的な動きを見た場合、水銀汚染は環境問題として捉えられることが多いため、魚介類の汚染状況に関する報告例は非常に多いが、その汚染レベルを下げる試みを具体的に行う研究例はきわめて少ない。食品学的にはツナ缶などの高水銀量を明らかにし、その摂取量への注意を喚起する研究例は多いが、材料が天然のマグロ類であるためか、原料までさかのぼって製品の水銀量の低減化を試みた研究例は見当たらなかった。

2. 研究の目的

申請者は、魚体内への水銀の吸収を阻害できれば養殖魚の水銀レベルを低下させ得ると考え、野菜類の搾液を用いて研究を進めてきた(科学研究費基盤研究(C), 2012-2015)。野菜類を材料としたのは、食品廃棄物に大量に含まれるくず野菜の有効利用を促進し、ごみ量の削減を将来的な目標としたためである。その結果、現在までに 10 種類の野菜が水銀吸収の阻害効果をもつことを、複数のモデル実験および飼育実験により明らかにしている。

そこで本研究では、この研究をさらに発展させ、有効な成分を野菜ごとに単離し、その作用機序を明らかにする。また、その成分を利用して養殖魚の水銀レベルを低減化するとともに、水銀の蓄積を阻害するヒト向けサプリメント開発のための基礎的知見の獲得をめざした。

3. 研究の方法

1. 水銀吸収阻害物質の単離

これまでに水銀吸収阻害効果が認められたシントウ、ゴボウなど 10 種類の野菜の水溶性画分から有効成分の単離を行うが、水銀吸収率の測定方法は以下の 2 つを用いる。

(1) マダイ活魚の腸管による評価系

養殖マダイの活魚を即殺後、ただちに腸管を取り出して用いる。採取した腸管の内部を生理食塩水で洗浄後、図 1 のように腸管に生理食塩水・メチル水銀(1ppm)・野菜成分を入れ、腸管の両端を結紮する。メチル水銀を用いるのは魚介類に含まれる水銀の 80% 以上がメチル水銀の形で存在するためであり、1ppm の濃度は天然クロマグロ筋肉の平均値に近い条件である。外部の生理食塩水は攪拌しながら水温を 25℃ に保ち、1 時間放置した後、腸管内に残った水銀量を測定する。実験開始時に腸管内に投入した全水銀量に対して腸管に吸収された水銀量の割合を計算し、水銀吸収率とする。この数値が小さいほど吸収阻害効果が大いであると判断する。

(2) ヒト腸管細胞による評価系

市販キット上にヒト腸管細胞を培養し、約 2 週間をかけて腸壁のモデルを形成させる。次に、上部に培地・メチル水銀(1ppm)・野菜成分、下部に培地をそれぞれ入れ、最大 24 時間まで培養する。培養後、上部・腸管細胞層・下部を回収し、それぞれを硝酸で分解後、還元気化法により総水銀量を測定する。得られた数値から、投入した全水銀量に対して腸管細胞を通過した水銀量の割合を算出し、水銀吸収率とする。この数値が小さいほど腸管における水銀の吸収率が小さく、吸収阻害効果が大いであると判断する。

各種分画操作によって分離された成分について上記 2 種の方法により吸収阻害効果を評価し、有効成分の探索を試みた。

4. 研究成果

Caco-2 細胞を用い、メチル水銀の吸収阻害効果を 25 種類の野菜(ダイコン、レンコン、サト

イモ、カブ、ゴボウ、トウモロコシ、アボカド、ゴーヤ、シシトウ、サンチェ、ニラ、ネギ、トウモロコシ、コマツナ、チンゲンサイ、フキ、レタス、ニンニク、ニンニクの芽、レッドオニオン、ミズナ、オオバ、ワサビ、ミョウガ) 汁について検討した。最初に、評価系として一般的なキットであるトランスウェル(培養期間2週間)と市販の24穴プラスチックプレート(培養期間3週間)の比較を行った。まず透過型電子顕微鏡による形態観察を行い、両者ともに特徴的な微絨毛の構造の発達が認められ、その構造に差異は認められなかった。次に、形成された組織上にメチル水銀および野菜汁を投入してから測定までの時間を1・3・6・24時間としてメチル水銀の吸収阻害効果を測定した。この場合、野菜汁の代わりに生理食塩水を入れたものを対照区とした。その結果、両者において同様の結果が得られたため、約50分の1となるコストダウンの観点から、市販24穴プレートを用いて今後の評価を行うこととした。

野菜汁投入から反応停止までの時間により有意なメチル水銀吸収阻害効果を示す野菜の数は異なり、それぞれ1時間では0種、3時間では7種、6時間では3種、24時間では0種であった。この結果から、今回認められた効果は永続的なものではなく、時間的なものであることが明らかとなった。なお、将来的にヒトサプリメントの開発を目指すことを考慮すると効果の持続時間が長い方が望ましいので、今後は反応時間を6時間とすることとした。

マダイ腸管を用いる評価系において、腸全体を用いると試料が大量に必要なことが問題となっていた。そこで、必要な試料の量を減らすことを目的として、腸を4分割して吸収阻害効果を評価した。その結果、最も頭側の部位に最も鋭敏な吸収阻害が認められたため、今後はこの部位を用いることとした。

ゴボウ汁から凍結乾燥粉末を作成したところ、粉末にせず凍結状態にして長期保管した際には阻害効果は消失したが、粉末状態では阻害効果が継続して認められた。

ゴボウ汁を分画分子量10万の限外ろ過により分画したところ、2画分ともに有意な阻害活性が認められたが、分子量10万以上により強い阻害活性が認められた。さらに分子量10万位以下の画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したところ、40k~70kおよび1.5k~6.5kの画分に有意な阻害活性が認められた。1.5k~6.5kの画分を陽イオン交換樹脂に吸着させ、0~0.5MNaClにより溶出したところ、0.2~0.4MNaCl画分において有意な阻害活性が認められた。最後にこれらの画分をMS分析したところ、18262Daの質量を有する物質が検出された。

有効な阻害活性は広範囲な成分に広がっており、目標達成のための有望な知見が得られた。

通常のシシトウの他、それに比べて身が数倍の大きさになる万願寺シシトウを用いて腸管モデル実験を行った。その結果、小さいシシトウには吸収阻害効果が認められたものの、万願寺シシトウには全く認められなかった。万願寺シシトウは辛味が少ないことが特徴であるため、辛味成分が吸収阻害効果に影響している可能性が考えられた。次にゴボウ汁の分子量1万以下の画分をゲルろ過したところ、アミノ酸に相当する部分に大きな吸収ピークが得られた。そこでアミノ酸分析を行ったところ、アルギニンが大部分であった。そこで、アルギニンを用いて腸管モデル実験を行ったが、アルギニンには吸収阻害効果は見られなかった。

腸管およびCaco-2細胞によるモデル実験において、比較的高い吸収阻害効果を示したシシトウを餌に混入させ、グッピーに給餌しながらメチル水銀の蓄積を評価した。混入率は0, 1, 5%とし、メチル水銀濃度は1ppmとした。肝臓とその他にわけて水銀濃度を測定したが、5週間飼育後においても有意な水銀濃度の違いは認められなかった。肝臓の組織観察も行ったが、シシトウ混入率の違いによる肝臓の構造の違いは認められなかった。

研究全体を通じて、あくまでもモデル実験のレベルではあるが、様々な野菜に分子量や電気的性質の異なる多種類の水銀吸収阻害効果をもつ物質が存在する可能性が認められた。最終的に飼育実験において有効性が認められなかった点が残念である。しかしながら、物質を単離したのち、餌への混入率を上げることができれば魚体の水銀レベルを低減させることが大いに期待される。物質の単離のための評価系については様々な改善点が浮かび上がってきており、今後さらに精度を上げて研究を進めていくための土台ができたこともまた本研究の大きな成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masashi Ando, Takahiro Yamada, Yoichiro Okinaga, Etsuko Taguchi, You Sugimoto, Akiko Takeuchi, Tomohiro Itoh, Takashi Fukuda, Yasuyuki Tsukamasa	4. 巻 303
2. 論文標題 Evaluation of the inhibition of mercury absorption by vegetable juices using a red sea bream intestine model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 12535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2019.125351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤正史
2. 発表標題 Caco-2細胞モデルによる野菜汁からの水銀吸収阻害物質の探索
3. 学会等名 メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤正史・中山貴生・數山裕人・眞野彰太 福田隆志・塚正泰之
2. 発表標題 完全養殖クロマグロの水銀に関する研究 - XIII - メチル水銀吸収阻害効果を有するゴボウ成分の探索 -
3. 学会等名 令和2年度度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤正史
2. 発表標題 野菜類からのメチル水銀吸収抑制物質の探索
3. 学会等名 メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤正史・朴 世朱・箱谷一樹・福田隆志・塚正泰之
2. 発表標題 完全養殖クロマグロの水銀に関する研究 - 1 2 - ゴボウ成分のメチル水銀吸収阻害効果に及ぼす影響 -
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤正史・福田隆志・塚正泰之
2. 発表標題 野菜成分のメチル水銀吸収阻害効果に及ぼす凍結操作の影響
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関