

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350069

研究課題名（和文） 水産廃棄物リサイクルにおける魚類中に含まれる水銀とセレンの運命

研究課題名（英文） Fate of mercury and selenium contained in fish in the recycle of fishery product wastes

研究代表者

大木 章(OHKI AKIRA)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：20127989

研究成果の概要（和文）：水産廃棄物の再資源化処理において、有毒性の高い遊離種生成の観点から水銀とセレンの運命を検討した。魚肉中に含まれるメチル水銀はセレノプロテインによって安定化および無毒化されているが、水熱処理（亜臨界水処理）によって、遊離のメチル水銀や低分子量セレン化合物が生成することを明らかにした。また、魚肉の発酵処理（堆肥化）では、メチル水銀の脱メチル化とセレンの気化が起こることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In the recycle of fishery product wastes, the fate of mercury and selenium was investigated on the viewpoint of the generation of hazardous free species. Although the methylmercury species contained in fish meat was stabilized and detoxified by selenoprotein, it was clarified that free methylmercury and low-molecular selenium species were generated when the fish meat was subjected to a hydrothermal treatment (subcritical water treatment). Also, it was found that the demethylation of methylmercury as well as the vaporization of selenium occurred during fermentation (compost) processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：水産廃棄物、廃棄物再資源化、水銀、セレン、亜臨界水処理、堆肥化処理、サイズ排除クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

魚介類中の水銀残留暫定規制値は $0.4 \mu\text{g/g}$ (総水銀) および $0.3 \mu\text{g/g}$ (メチル水銀) であるが、大型海洋魚類中には規制値を超える水銀が含まれる場合が多い。しかしながら、魚類が生育阻害を受けず、また魚を摂取した人間にも中毒症状（水俣病等）が現れない。この原因は、タンパク質（セレノプロテイン）

中のセレンを含むアミノ酸（セレノシステインなど）が水銀に結合し、安定化・無毒化しているという説が有力である。

海洋中に含まれる水銀は自然起源（海底火山よりの放出など）もあるが、最近では人為起源が注目されている。現在、地球規模における水銀の大気への最大排出源は、化石燃料（特に石炭）や廃棄物の燃焼である。中国等

東アジア諸国の経済発展により、エネルギー需要が急増している。これらの国の主要電力源は石炭火力発電であり、大量に放出された水銀が偏西風に乗って北太平洋に降下するので、2050年には北太平洋の水銀濃度は現在の2倍になるといわれている。海洋に降下した水銀は、食物連鎖により魚類中に濃縮される。マグロなど大型魚類の魚肉中には、多くの場合規制値以上の水銀が含まれており、今後海洋中の水銀濃度が上昇すれば、当然のことながら魚類中の水銀濃度も上昇すると考えられる。

毎日大量の食品廃棄物が排出され、特に新鮮さが要求される魚介類は廃棄される割合が大きい。現在、食品廃棄物リサイクルが推奨されており、水産廃棄物から発酵（堆肥化）や水熱処理（亜臨界水処理）等の過程を経て、家畜飼料や油脂・アミノ酸等の有価物製造を行うことが注目されている。前述したように、魚肉中には規制値以上の水銀が含まれており、セレンプロテインにより安定化されているが、リサイクル過程における強力な化学的・生物的処理により、有毒な遊離の水銀種やセレン種が生成する可能性がある。しかしながら、これまでにこのような観点からの研究が行われたことはない。

2. 研究の目的

本研究では、水産廃棄物リサイクルにおける魚類中の水銀とセレンの運命を、「有毒種生成の可能性」という観点から追跡する。具体的には、以下の点を検討する。

- (1) 海産魚類中に含まれる水銀とセレンについて、化学形態別分析法を特に「有毒種と無毒種の分別」という観点から確立する。配位性セレン原子をもつセレンプロテインに結合している水銀種は無毒であるが、遊離の水銀種やセレン種は有毒と考える。
- (2) 水産廃棄物リサイクル過程（亜臨界水処理および堆肥化処理）において、魚類中に含まれる水銀およびセレンの化学形態変化を追跡する。どのような処理条件において有毒種が生成するかの知見を得て、安全なリサイクル方法への提言を行う。

3. 研究の方法

(1) 試料及び試薬

認証標準物質である DORM-2（サメ筋肉）および DOLT-3（サメ肝臓）はカナダ国立研究機構から、NMIJ-7402a（タラ魚肉）は（独）産業技術総合研究所より入手した。海産物の実試料として、ミンククジラ、バンドウイルカ、ミナミマグロ、キハダマグロ、メバチマグロ、サバ、イサキの筋肉部を用いた（キハダマグロは内臓部も試料とした）。これらの試料は、近隣のスーパーマーケットまたはインターネットを利用して生鮮食品業者より

購入した。凍結乾燥を行い、自動粉碎機を用いて粉碎したのち、ふるいにかけて、乾燥試料とした。超純水は、Purelab Ultra Ionic（オルガノ）を用いて製造し、すべての実験を通して使用した。各試薬は試験研究用特級に相当するグレードのものを使用した。

(2) 試料中の水銀およびセレン濃度分析

魚肉試料（鯨肉試料も含む）中の水銀濃度測定は、加熱気化原子吸光分析装置（HVAAS、日本インスツルメンツ製、MA-2000）によって行った。水銀の化学形態別分析（ Hg^{2+} と CH_3Hg^+ ）のために、2-メルカプトエタノール（2-ME）水溶液（0.1% 2-ME、0.15% KCl、0.1% HCl）による抽出を行い、抽出液について、HPLC-冷蒸気原子蛍光分析（CVAFS）を行った。水銀種の分離は ODS カラム（和光純薬製、Wakosil-II 5C18 HG、4.6 mm×150 mm）および溶離液（メタノール：水 = 1:9、0.01% 2-ME を含む）を用いた。CVAFS 測定は、PSA 10.025 Millennium（PS Analytical 製）を用いて行い、 CH_3Hg^+ の Hg^{2+} への光酸化は、メーカーのプロトコルに従った。

魚肉試料中のセレン濃度測定は、マイクロ波照射-酸分解と誘導結合プラズマ-質量分析（ICP-MS）（Agilent 7500cx）により行った。試料を HNO_3 と H_2O_2 によりマイクロ波照射装置（Milestone ETHOS 1）により、文献記載の方法で分解した¹⁻²⁾。

測定は、同一試料について少なくとも3回行い、平均値および標準偏差を求めた。

(3) 魚肉試料の亜臨界水処理

魚肉試料の亜臨界水処理は、小型の耐圧分解容器に魚肉試料（0.5 g）と蒸留水（10 mL）を添加し、電気炉にて加熱（220-250℃）することにより行った。亜臨界水処理により得られた処理液（水相）は、HVAAS により水銀濃度を測定し、HPLC-CVAFS により化学形態別分析を行った。セレンに関しては ICP-MS による濃度測定を行い、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）-ICP-MS による化学形態別分析を行った。SEC カラムは、Superdex Peptide 10/300 GL（GE Healthcare Japan）を用い、100 mM 酢酸アンモニウム（pH 8.0）の溶離液を使用した。また、SEC-UV 検出器（UVD）により水相中に溶出したペプチド種の分析も行った。水相の全有機炭素（TOC）の測定は、TOC 分析装置（島津 TOC-V CSH）により行った。

魚肉試料の堆肥化処理は、生ゴミ処理機により馴養した培養基材に魚肉試料を添加し、室温にて静置して行った。所定時間ごとに培養基材をサンプリングし、堆肥試料を作成し、HVAAS により総水銀濃度を測定し、2-ME 水溶液によって水銀種を抽出し HPLC-CVAFS により化学形態別分析を行った。

4. 研究成果

(1) 海産物試料中の水銀濃度

3種の認証標準物質 (DORM-2、DOLT-3、NMIJ-7402a) について、HVAAS による水銀濃度の測定を行った。表1に示すように、測定値は認証値とよい一致を示しており、HVAAS によりこれらの生物試料中の水銀濃度を正確に測定できることがわかった。

表1 認証標準物質中の水銀濃度

試料	認証値 (μg-Hg/g)	測定値 (μg-Hg/g)
DORM-2	4.64 ± 0.26	4.50 ± 0.09
DOLT-3	3.37 ± 0.14	3.35 ± 0.19
NMIJ-7402a	0.61 ± 0.02	0.60 ± 0.04

HVAAS を用いて、魚肉などの海産物に含まれる水銀濃度測定を行った。表2にその結果を示す。ミナミマグロ、キハダマグロ、サバについては、それぞれ2種の個体について測定を行った。歯鯨類であるイルカや大型魚類であるマグロ類が、筋肉中に高い水銀を含んでいることはよく知られているが、バンドウイルカやミナミマグロは高い水銀濃度を示した。メバチマグロも 1.0 μg/g-dry 以上の水銀濃度をもっていたが、キハダマグロの水銀濃度は比較的低かった。キハダマグロについては、内臓中の水銀濃度も調べたが、これは筋肉中に比べてやや高かった。中型魚類は、大型魚類に比べて筋肉中の水銀濃度が低いことが知られており、サバ-2 やイサキは比較的低い水銀濃度を示した。しかしながら、サバ-1 はマグロ類に匹敵する水銀濃度をもっていた。

表2 海産物試料中の水銀濃度

試料	Hg (μg-Hg/g-dry)
ミンククジラ	0.07 ± 0.02
バンドウイルカ	5.40 ± 0.30
ミナミマグロ-1	1.67 ± 0.12
ミナミマグロ-2	4.01 ± 0.22
キハダマグロ-1	0.12 ± 0.02
キハダマグロ-2	0.59 ± 0.04
キハダマグロ-1(内臓)	0.35 ± 0.02
キハダマグロ-2(内臓)	0.76 ± 0.06
メバチマグロ	1.04 ± 0.10
サバ-1	1.09 ± 0.13
サバ-2	0.45 ± 0.03
イサキ	0.24 ± 0.03

(2) 水銀の化学形態別分析

3種の認証標準物質 (DORM-2、DOLT-3、NMIJ-7402a) について、2-ME 抽出で得られた

抽出液を、HPLC-CVAFS に供し、水銀の化学形態別分析を行った。測定された抽出溶液中の CH₃Hg⁺ および Hg²⁺ 濃度を試料中濃度に換算した結果を表3に示す。これらの認証標準物質は、CH₃Hg⁺ 濃度の認証値をもっているが、得られた測定値は認証値に近い値であった。2-ME 抽出および HPLC-CVAFS を用いて生物試料中の水銀の化学形態別分析ができることがわかったので、海産物試料にこの方法を適用した結果を表4に示す。

表3 認証標準物質中の水銀の化学形態別分析

試料	CH ₃ Hg ⁺		Hg ²⁺
	認証値 (μg-Hg/g-dry)	測定値 (μg-Hg/g-dry)	測定値 (μg-Hg/g-dry)
DORM-2	4.47 ± 0.32	4.39 ± 0.44	n.d.
DOLT-3	1.59 ± 0.12	1.55 ± 0.08	1.67 ± 0.11
NMIJ-7402a	0.58 ± 0.02	0.53 ± 0.02	n.d.

表4 試料中の水銀の化学形態別分析

試料	CH ₃ Hg ²⁺ (μg-Hg/g-dry)	Hg ²⁺ (μg-Hg/g-dry)
バンドウイルカ	2.41 ± 0.30	1.52 ± 0.21
ミナミマグロ-2	3.35 ± 0.10	0.39 ± 0.04
メバチマグロ	0.76 ± 0.04	0.34 ± 0.03
サバ-1	0.69 ± 0.07	0.35 ± 0.04

(3) 魚肉試料の亜臨界水処理

乾燥魚肉粉末 (ミナミマグロ-2) を 220°C における亜臨界水処理 (液固比 20) に供した。図1に、水相中 TOC 値の経時変化を示すが、処理時間の経過とともに TOC 値は増加しており、亜臨界水処理によって魚肉中の有機成分が分解し、水相中へ溶解するためと考えられる。最終的に、魚肉中の約 60% の有機炭素が溶出しており、文献における結果と同様であった³⁾。なお、図1の処理時間ゼロは、電気炉が所定温度 (220°C) に達した点であり、このときには分解容器中の温度は必ずしもこの温度には達していないので、初期における TOC 値の上昇が小さいのはこのためである。

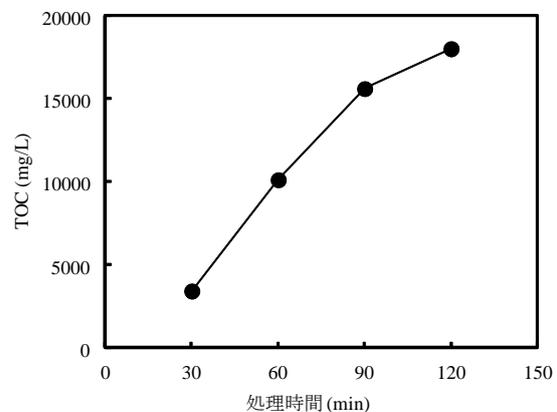


図1 亜臨界水処理における水相中のTOC

(4) 亜臨界水処理後の水相の水銀分析

上記の亜臨界水処理を行った後の水相について、水銀濃度の経時変化を図2に示す。処理時間の経過とともに水銀濃度は上昇し、その後減少した。水銀濃度上昇の速度は、処理温度が高い方が速かった。以上の結果より、亜臨界水処理により、魚肉の構成成分(タンパク質や糖類等)が分解し、水銀が溶出すると考えられ、また一部の水銀は Hg^0 に還元され気化した可能性がある。

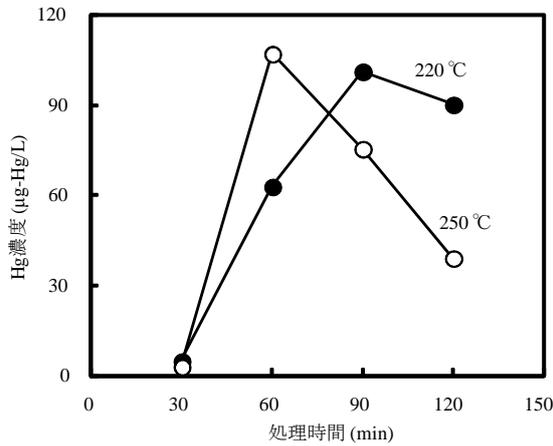


図2 亜臨界水処理における水相中の水銀濃度

魚肉の亜臨界水処理を行った後の水相について、水銀の化学形態別分析を行った結果を表5に示す。魚肉の種類にかかわらず、水相中に存在する水銀種の大部分は有毒なメチル水銀であることがわかった。

表5 亜臨界水処理 (220°C) における水銀の化学形態別分析

試料	処理時間 (min)	全Hg濃度 (µg-Hg/L)	Hg濃度 (µg-Hg/L)	
			Hg^{2+}	CH_3Hg^+
ミナミマグロ-2	90	101	5.02	93.8
	120	90.4	4.82	74.4
サバ-1	90	28.8	4.92	23.7
	120	33.7	1.40	31.4

(5) 亜臨界水処理後の水相のセレン分析

ミナミマグロ-2 魚肉中のセレン濃度は、 $3.87 \mu g/g\text{-dry}$ であった。これを亜臨界水処理 (220°C) に供した場合の水相中のセレン濃度を図3に示す。処理時間の経過とともに、セレン濃度は増加し、処理温度が高いほど増加速度は大きかった。最終的に魚肉中に含まれるセレンのほとんど全てが水相中に溶出しており、セレンの気化はなかった。

水相中に溶出したセレン種の化学形態別分析を SEC-ICP-MS により行った結果を図4に示す。亜臨界水処理初期 (30 min) には低分子量領域にのみピークが見られ、これはセレン酸、亜セレン酸、およびセレンアミノ酸と考えられる。処理時間 60 min において、1-6 kDa の領域にブロードなピークが現れ、処理時間の経過とともにこのピークは低分

子量側に移動し、120 min においては低分子量ピークと合体した。以上の結果より、魚肉中に含まれていた不溶性のセレンプロテインが、亜臨界水処理により分解し、中分子量のセレンペプチドを経て、セレンアミノ酸を生成することがわかった。図5に、水相の SEC-UVD の結果を示すが、図4の結果と類似しており、タンパク質全体の分解挙動とセレンプロテインの分解挙動が一致していることを示す。

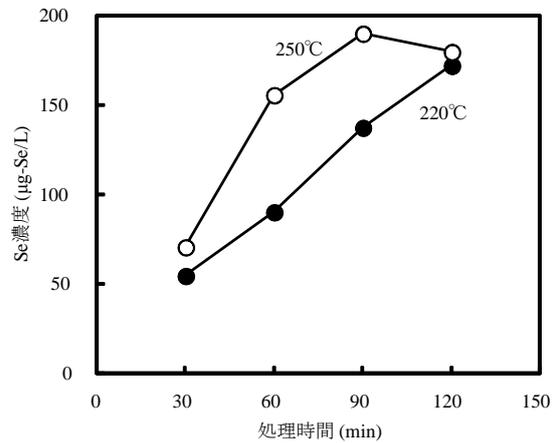


図3 亜臨界水処理における水相中のSe濃度

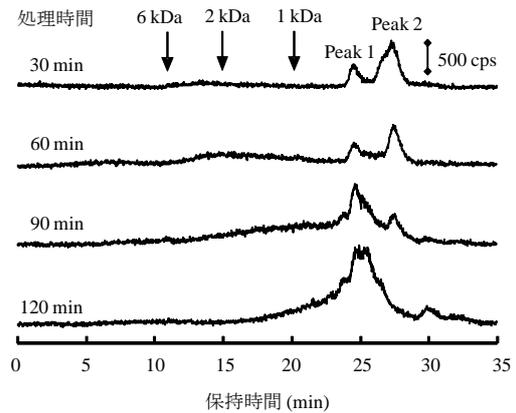


図4 亜臨界水処理における水相中セレン種のSEC-ICP-MS

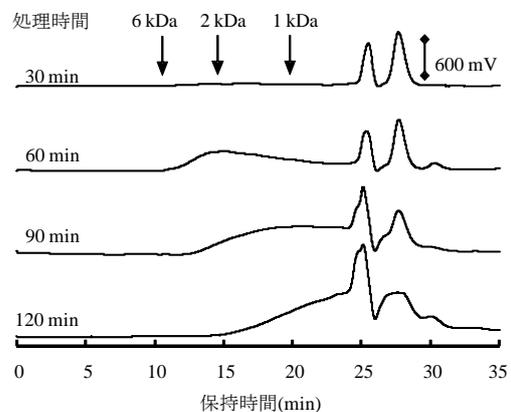


図5 亜臨界水処理における水相のSEC-UVD

(6) 魚肉の堆肥化処理

図6に、サバ-1を堆肥化処理した場合の、堆肥中の水銀およびセレン濃度を示す。水銀濃度はほとんど変化しないが、セレン濃度は、初期値より3割程度減少した。堆肥中に亜セレン酸塩を加えた場合も明らかにセレン濃度の現象が観測されるので、一部のセレンは H_2Se の形で気化していると考えられる。

図7に、メバチマグロを堆肥化処理した場合の堆肥中水銀の化学形態別分析の結果を示す。前述の場合と同様に、総水銀濃度はほとんど変化しないが、 CH_3Hg^+ 濃度が減少し、 Hg^{2+} 濃度が増加した。すなわち、魚肉中に含まれる CH_3Hg^+ が堆肥化の過程で、脱メチル化し Hg^{2+} を生成すると考えられる。

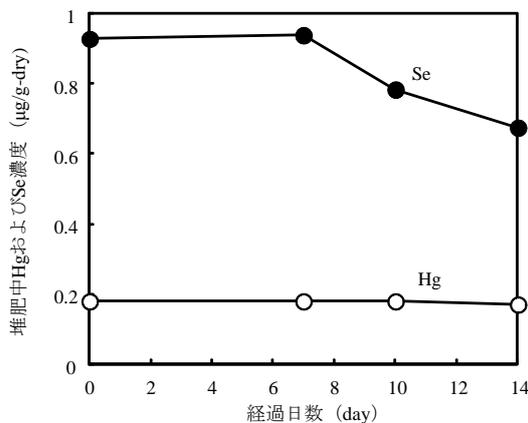


図6 堆肥化処理における水銀およびセレンの分析

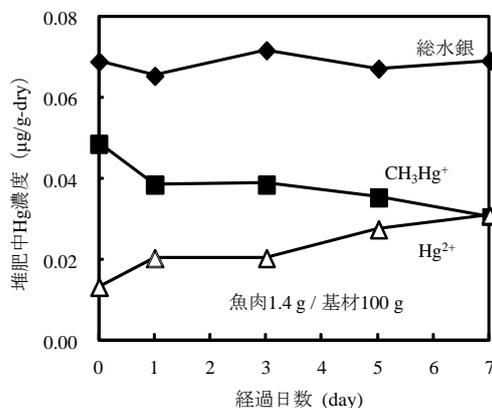


図7 堆肥化処理における水銀の化学形態分析

(7) 研究成果のまとめ

水産廃棄物の再資源化処理において、有毒性の高い遊離種生成の観点から水銀およびセレンの運命を検討した。再資源化処理の結果、水溶性の水銀やセレン種が生成すれば、これらは遊離種と考えられるが、生成した遊離種について、HPLC-CVAFSやSEC-ICP-MSにより化学形態別分析を行う手法を確立した。

魚肉を亜臨界水処理した場合、水相中にはメチル水銀が溶出した。また、セレノプロテ

インが加水分解したと考えられるセレノペプチドが溶出し、処理時間の経過とともに、低分子量化合物へ変化した。以上の結果より、魚肉中においてセレノプロテインによって安定化・不溶化されていたメチル水銀が、亜臨界水処理によるセレノプロテインを含むタンパク質の分解により、水相中へ遊離種として溶出したと考えられる。魚肉の堆肥化処理においても水溶性の水銀種が生成し、またメチル水銀は無機水銀(Hg^{2+})へ脱メチル化した。セレンについては、堆肥化処理中に一部気化することがわかったが、共存物質の妨害等により、セレノペプチドの検出はできなかった。

魚肉等の水銀やセレンを含む水産廃棄物を再資源化処理に供した場合、水相中に遊離の水銀種やセレン種が溶出することがわかった。すなわち、亜臨界水処理や堆肥化処理のように、タンパク質の加水分解を伴う再資源化処理においては、遊離の有毒元素が溶出する可能性があり、排水管理や製品中への混入防止などを注意せねばならない。

[参考文献]

- 1) Y.-H. Xu, A. Iwashita, T. Nakajima, H. Yamashita, H. Takanashi, A. Ohki, *Talanta*, **66** (2005) 58-64.
- 2) A. Ohki, K. Yamada, T. Furuzono, T. Nakajima, H. Takanashi, *Energy Fuel*, **25** (2011) 3568-3573.
- 3) H. Yoshida, M. Terashima, Y. Takahashi, *Biotechnol. Prog.*, **15** (1999) 1090-1094.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① A. Ohki, K. Hayashi, J. Ohsako, T. Nakajima, H. Takanashi, "Analysis of mercury and selenium during subcritical water treatment of fish tissue by various atomic spectrometric methods", *Microchemical Journal*, Vol. 106, pp. 357-362 (2013), DOI: 10.1016/j.microc.2012.09.008, 査読有.
- ② 林健太郎, 大迫謙滋, 中島常憲, 高梨啓和, 大木 章, "HPLCと冷蒸気原子蛍光分析を用いる生物試料中の水銀種別定量", *分析化学*, Vol. 61(12), pp. 1073-1077 (2012), URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/61/12/61_1073/article/-char/ja/, 査読有.

〔学会発表〕(計8件)

- ① 西村 彩, “重金属の淡水産生物に対する毒性と配位性化合物による毒性緩和”, 第21回環境化学討論会, 2012年7月12日, 愛媛県県民文化会館(愛媛市).
- ② 林 健太郎, “魚肉中に含まれる水銀とセレンの再資源化処理による化学形態変化”, 第21回環境化学討論会, 2012年7月12日, 愛媛県県民文化会館(愛媛市).
- ③ 林 健太郎, “魚類試料中に含まれる水銀とセレンの分析と水熱処理による化学形態変化”, 第72回分析化学討論会, 2012年5月19日, 鹿児島大学(鹿児島市).
- ④ 西村 彩, “キレート剤共存下における淡水産生物に対する重金属毒性と生物取込”, 日本水環境学会九州支部研究発表会, 2012年3月10日, 北九州市立大学ひびきのキャンパス(北九州市).
- ⑤ 大迫譲滋, “HPLC法と抽出法を用いる魚類中の水銀およびセレンのスペシエーション”, 日本分析化学会第60年会, 2011年9月16日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋市).
- ⑥ 大迫譲滋, “魚肉中に含まれる水銀およびセレンの存在形態解明と発酵過程における運命追跡”, 第20回環境化学討論会, 2011年7月16日, 熊本県立大学(熊本市).
- ⑦ 大迫譲滋, “HPLC法および抽出法を用いる生物試料中の水銀スペシエーション”, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日, 東北大学川内北キャンパス(仙台市).
- ⑧ 古園拓也, “アニオン交換クロマトグラフィを用いるヒ素およびセレンのスペシエーション”, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日, 東北大学川内北キャンパス(仙台市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 章 (OHKI AKIRA)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 20127989

(2) 研究分担者

中島 常憲 (NAKAJIMA TSUNENORI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号: 70284908