

平成 31～令和 2 年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	メチル水銀の脱メチル化機構における食品中の水銀／セレンのバイオジェニックナノ粒子形成（課題番号：1905） （2. 健康影響発現メカニズムの解明（1）食品中の微量化学物質・汚染物質のばく露実態と健康影響発現に関する研究）
主任研究者	研究者名：小椋 康光 所属機関：国立大学法人 千葉大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成 31 年度～令和 2 年度（2 年間）

2 研究目的

ヒトが曝露され得る水銀の化学形態には、金属水銀、無機水銀および有機水銀の 3 態があるとされるが、実際の食品、特に魚介類にはこれらに加えて、必須微量元素であるセレンと複合体を形成した水銀／セレン複合体が相当な量が含まれることが知られている。この複合体は、他の水銀化合物よりも低毒性とされているが、生体内での検出法や動態が明らかになっていないことから、そのリスクが評価されるに至っていない。本研究では、食品を含めた生体試料中の水銀／セレン複合体の検出法を確立し、その動態を明らかにすることとした。これにより、複合体そのものに加えて、メチル水銀毒性の修飾といった観点からもリスク評価に資する研究を実施する。さらに、生体内におけるメチル水銀の脱メチル化については、水銀の毒性発現機構を知る上で鍵となる生体内反応であるため、その分子機構を解明することも目的とした。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
メチル水銀の脱メチル化機構における食品中の水銀／セレンのバイオジェニックナノ粒子形成	生体内（食品となる魚介類中の体内も含む）におけるメチル水銀の脱メチル化機構の解明	小椋康光（千葉大学）
同上	食品や生体中に含まれる水銀及びセレン化合物の簡便かつ定量的な化学形態別分析法の確立	小椋康光（千葉大学） 鈴木美成（国立医薬品食品衛生研究所）
同上	水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の測定方法の確立	小椋康光（千葉大学） 鈴木美成（国立医薬品食品衛生研究所）
同上	水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の生体内動態の解明	小椋康光（千葉大学）

4 倫理面への配慮について

実験動物の使用に関しては、所属機関により定められた動物実験実施規程に則り、事前に研究計画書を提出し、認可を受けた上で実施した。計画した研究が全て終了した時には報告書を所属機関に提出する。なお、所属機関は動物実験に関する倫理規定を有している。

II 研究内容及び成果等

(1) 研究項目名：メチル水銀の脱メチル化機構における食品中の水銀／セレンのバイオジェニックナノ粒子形成

1) 個別課題名：生体内（食品となる魚介類中の体内も含む）におけるメチル水銀の脱メチル化機構の解明（研究担当者：小椋康光（所属機関名：千葉大学））

<研究成果>

事前の計画では、メチル水銀の脱メチル化を担う酵素としてシトクロム P-450 (CYP) を想定していたが、多様な CYP の分子種の中からメチル水銀の脱メチル化を特異的に触媒する CYP を酵素化学的に探索するのは、無駄が多いと考えた。そこで、CYP を含めて、脱メチル化を起こす可能性のある酵素遺伝子についてゲノムデータベースを利用して探索した。

メチル水銀を脱メチル化する酵素として、水銀に汚染された土壌中の細菌のプラスミドにコードされる Mer オペロンが単離され、その中に脱メチル化活性を有する MerB 遺伝子が含まれている。現在、脱メチル化活性を有することが確認されている酵素は、この細菌の遺伝子の MerB のみであることから、MerB のアミノ酸配列をクエリとして PSI-BLAST を用いてゲノムデータベースの解析を行った。その結果、以下に示すように古細菌と真菌類の一部に MerB のアミノ酸配列上の相同遺伝子が見出されたが、脊椎動物では相同遺伝子を見出すことはできなかった。

表 1. MerB との相同遺伝子

古細菌	
<i>Euryarchaeota archaeon</i>	ユーリ古細菌
<i>Halobacteriales archaeon</i>	ハロバクテリウム古細菌
<i>Crenarchaeota archaeon</i>	クレン古細菌
<i>Thaumarchaeota archaeon</i>	タウム古細菌
<i>Candidatus Bathyarchaeota archaeon</i>	バテユ古細菌
<i>Candidatus Heimdallarchaeota archaeon</i>	ヘイムダル古細菌
<i>Theionarchaea archaeon</i>	
<i>Halobellus limi</i>	高度好塩菌
<i>Halosimplex carlsbadense</i>	高度好塩菌
<i>Methanoregula</i>	メタン生成菌

Natrinema 好塩菌
Natronococcus 高度好塩菌
Nitrososphaera viennensis アンモニア酸化菌
Salinarchaeum 好塩菌
Candidatus Methanoperedens nitroreducens メタン還元性菌'
Candidatus Nitrososphaera evergladensis アンモニア酸化菌
Halomarina oriensis

真菌

Amorphotheca resinae
Aspergillus turcosus
Byssoschlamys spectabilis
Exophiala oligosperma
Fusarium
Metarhizium guizhouense
Metarhizium majus
Metarhizium robertsii
Metarhizium anisopliae
Metarhizium brunneum
Oidiodendron maius Zn
Penicillium antarcticum
Pyronema omphalodes

脊椎動物における相同遺伝子 (ただし、ゲノムデータベースの偽陽性のみ*)

Manis javanica マレーセンザンコウ 哺乳類
Oncorhynchus tshawytscha マスノスケ・キングサーモン 魚類

*ゲノムデータベースとして遺伝子の登録はあるが、染色体ごとの塩基配列とは紐付けられていない。さらに、イントロンも含めた塩基配列がバクテリアゲノムと一致していることから、恐らくバクテリアMerBが混入したものと推測できる。

従って、データベース検索では、ほ乳類の脱メチル化酵素を選び出すことはできなかった。

二年度目は、上述の遺伝子解析の結果を踏まえて、酵素に限定することなく、水銀の脱メチル化を担う分子を特定することとした。すなわち、実験動物から調製し各細胞成分を用いて、メチル水銀の脱メチル化活性を評価した。また同時に、現在唯一脱メチル化活性が報告されている MerB 遺伝子産物をコンピュータシミュレーションし、ほ乳類細胞内に同様の構造を有するタンパク質が無いか検索したところ、MerB 遺伝子産物の類縁の遺伝子も見つからなかった。そこで、もう一度、過去の論文と最近の知見から作業仮説を見直した。

細胞内に MerB のような脱メチル化酵素が存在する場合、そのことが毒性の低減に繋が
るかを検証した。既報では、MerB をほ乳類細胞で発現させると、メチル水銀に対する毒性
は増加することか報告されている (Takanezawa *et al.* Intracellular Demethylation of
Methylmercury to Inorganic Mercury by Organomercurial Lyase (MerB)
Strengthens Cytotoxicity. *Toxicol Sci.* **170**, 438-451, 2019)。また、我々の
検討でも図 1 のように大腸菌に MerB を発現させた場合もメチル水
銀 (MeHg) に対する毒性は上昇した。これらの結果から、細胞内での
MerB 等によるメチル水銀の脱メチ
ル化は、細胞毒性の低減に繋がら
ないものと考えられた。しかし、
実際に *in vivo* では脱メチル化が
起きていることから、脱メチル化
は細胞外で行われているものと
想定した。

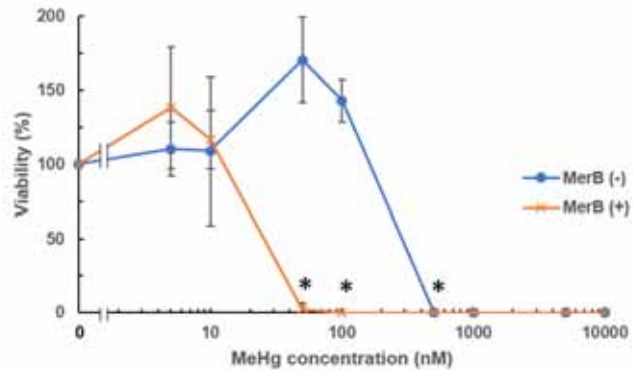


図1. MerB発現によるMeHgの細胞毒性増強

一方、イミダゾールセロン構造
を有する化合物に、メチル水銀の
脱メチル化を促進する作用があ
ることが報告されている
(Mainak and Gouriprasanna.
Cleavage of Hg-C bonds of
organomercurials induced by
Im^{OH}Se via two distinct pathways.
Inorg. Chem. **56**, 12739-12750,
2017、図 2)。

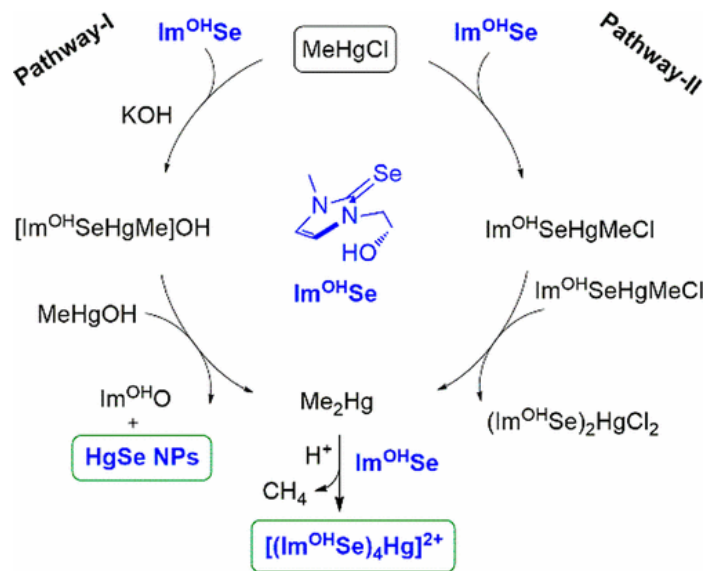


図2. イミダゾールセロン化合物によるメチル水銀
の脱メチル化反応機構

図 2 では、化学反応としてイミ
ダゾールセロン構造を有する化合物とメチル水銀が反応
することを示しているが、海洋生態系には天然にイミダ
ゾールセロン構造を有する天然セレン化合物、すなわち
セレノネインが存在している (図 3)。既報では、セレノ
ネインそのものがメチル水銀の脱メチル化を引き起こす
ことは示されていない。そこで、実際にセレノネインが化
合物の相互作用として、脱メチル化を引き起こすかを検
討したところ、セレノネインによるメチル水銀の脱メチ
ル化が観察できた。

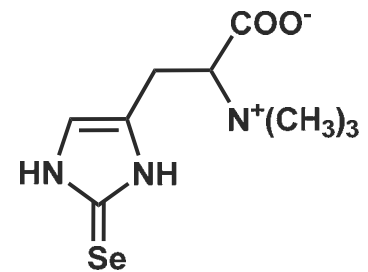


図3. セレノネインの構造

さらに、細胞レベルでセレノネインが脱メチル化を引き起こすかを検討した。ヒト肝癌由来 HepG2 細胞にセレノネインとメチル水銀を曝露し、細胞内の水銀を有機層に抽出されるもの（メチル水銀）と水層に抽出されるもの（無機水銀イオン）に分けて測定したところ、セレノネインの存在量に応じて、水層に回収される水銀の量が上昇した（図 4）。また、水銀イオンとメチル水銀の細胞毒性に与えるセレノネインの影響を調べたところ、無機水銀に対してセレノネインは防御的に働き、メチル水銀に対して毒性を増強させる効果を示した（図 5）。このことは、無機水銀の毒性に対しては、セレン化合物に共通した解毒機構を示すものの、メチル水銀に対しては、図 1 に示した MerB を発現した細胞と同様に、細胞内でセレノネインが脱メチル化を誘導し、メチル水銀の毒性を上昇させたと考えられた。従って、*in vivo* ではメチル水銀の脱メチル化は、細胞内で起こっていると想定するよりも、セレノネインの存在が豊富とされている赤血球中のような水銀の標的臓器外で起こっていると想定された。

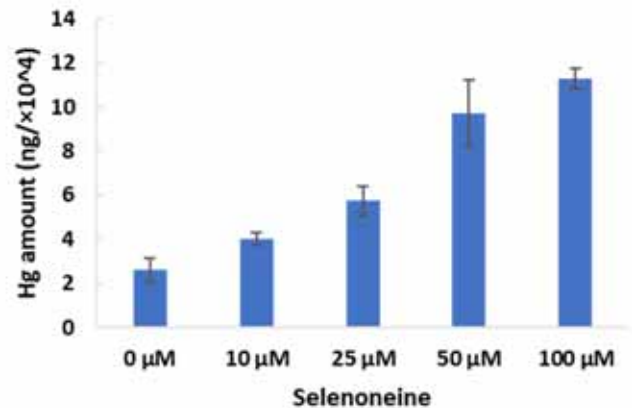


図4. メチル水銀曝露後のHepG2細胞から水層に抽出される水銀量に与えるセレノネインの効果

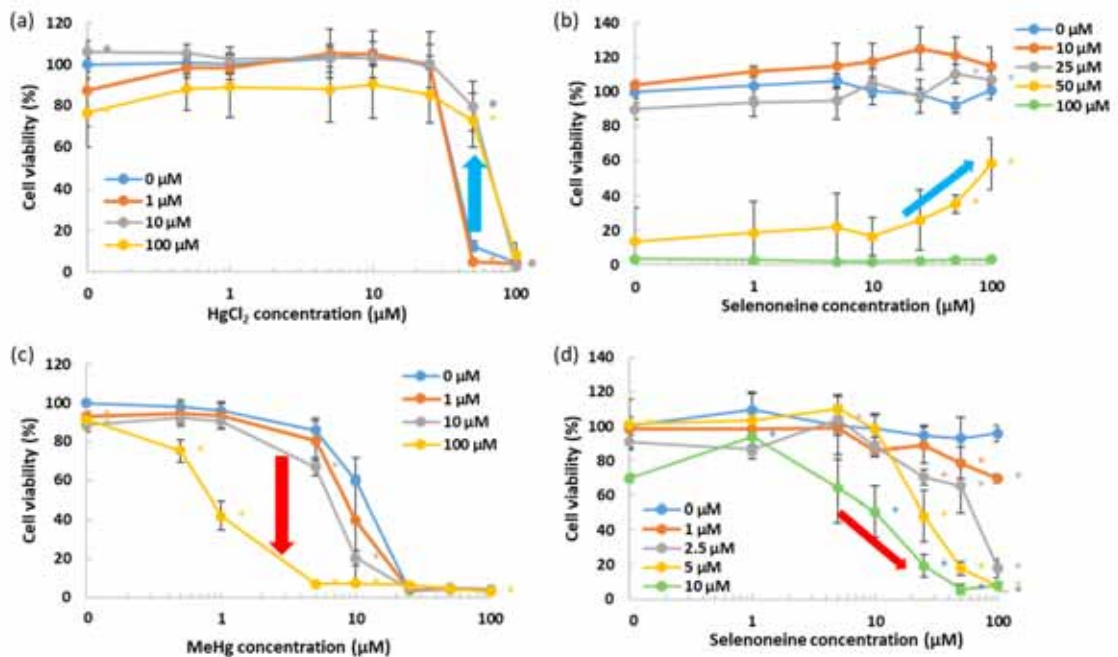


図 5. 無機水銀 (a, b) 及びメチル水銀 (c, d) の細胞毒性に与えるセレノネインの影響

セレノネインによるメチル水銀の脱メチル化の反応機構を考えると、脱メチル化を進行させる際に、システインが存在すると、極めて効率よく脱メチル化が促進することを見出

した（図 6、7）。その効率は、既報のミトコンドリアで引き起こされるとされた脱メチル化に比べても格段に効率が良いものであった。また、当初は非酵素的にセレノネインが脱メチル化を促進しているものと考えられたが、この反応に関与するシステインが酵素の活性中心を構成し、セレノネインを補因子として要求するような反応機構も想定できる。今後は、より詳細な反応系の解明と *in vivo* における効果を検証する必要がある。

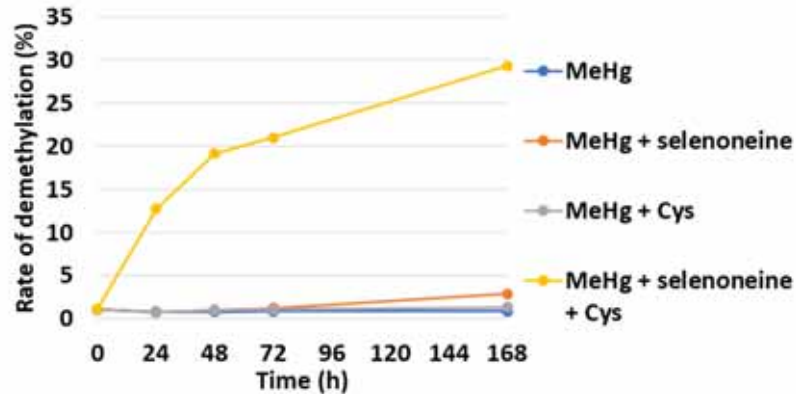


図6. メチル水銀のセレノネインによる脱メチル化へシステインが与える効果

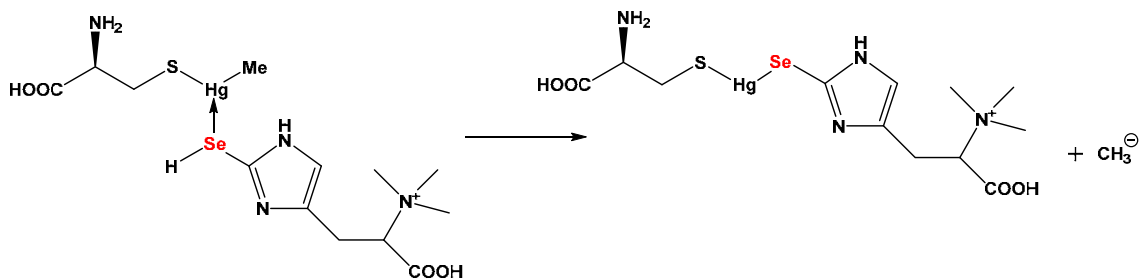


図7. セレノネインによるメチル水銀の脱メチル化の反応機構

以上の成果から、以下のことが想定できた。

- ・脱メチル化が組織内で起こると、毒性が増すことから、組織外で脱メチル化が起こる。
- ・脱メチル化には、セレノネインに加えて、システイン（残基）が関与する。すなわち、脱メチル化は、セレノネインが非酵素的に、あるいは酵素反応の補因子として関与する。
- ・セレノネインは組織外、特に赤血球に豊富であるため、赤血球が脱メチル化の場である可能性が高い。
- ・海洋生態系の中に存在するセレノネインの生物学的意義／毒性学的意義は、メチル水銀の脱メチル化であると示唆される。

<今後の課題>

今後は、今回観察された現象が *in vivo* で起こるのかを引き続き明らかにすることを目指している。

- 2) 個別課題名：食品や生体中に含まれる水銀及びセレン化合物の簡便かつ定量的な化学形態別分析法の確立（研究担当者：小椋康光（所属機関名：千葉大学）及び鈴木美成（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

< 研究成果 >

食品や生体試料中の複雑なマトリクス存在下で、メチル水銀と無機水銀を分別定量する手法を検討するが、分担者は主に誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）および加熱気化型水銀計を、主任者はICP-MSおよび冷蒸気還元気化原子吸光光度計（CV-AAS）を用いた方法について検討を行い、両機関でのバリデーションの評価も行った。初年度に、水銀／セレンナノ粒子を効率的に生物試料から抽出可能な手法を構築し、二年度はリスク評価に寄与することを考慮して、魚介類中の水銀／セレンナノ粒子の測定を実施した。

従来メチル水銀の分析に用いてきた GC-MS/MS は煩雑な前処理を伴うため分析に時間を要した。より多くの検体に Hg 化学形態分析を行うために、Narukawa ら(2018)の報告を基に、より簡便な前処理と LC-ICP-MS を用いた Hg の化学形態分析法を構築した。試料 0.25 g に 10% TMAH を 5mL 添加し 80°C で 2 時間加熱した。遠心を行い得られた上清 1 mL に溶離液 (0.5 g/L L-Cys, 5% メタノール, pH 2.3) 4 mL を加えた。CAPCELL PAK ADME カラム (粒子径 3 μm, 4.6×150 mm) を用いて、溶離液を流速 0.75 mL/min イソクラティックの条件で無機水銀 (iHg)、MeHg、EtHg の 3 種の水銀化学種を 15 分以内に分離・定量可能であった。本測定法を、市場で購入した魚介類 60 試料に適用し、総水銀及びメチル水銀を分析した。これまで報告されているように、メカジキおよびクロマグロで総 Hg および MeHg 濃度が高かった。メカジキと比較するとクロマグロの方が MeHg の割合が低かった。

従来のGC-MS/MS法に代わるより簡便な分析法としてLC-ICP-MS法を確立した。

< 今後の課題 >

水銀／セレンナノ粒子以外の化学形態の水銀に関する簡易分析法は、概ね問題なく使用できるものと考えられた。しかし、LC-ICP-MS法を利用しても、水銀／セレンナノ粒子を直接測定するのは困難であるため、クロマトグラフィーに代わる分離手段として担体を用いないフィールドフローフラクショネーション (FFF) を用いたFFF-ICP-MSを構築する必要があると考えられた。

- 3) 個別課題名：水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の測定方法の確立（研究担当者：小椋康光（所属機関名：千葉大学）及び鈴木美成（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

<研究成果>

ヒトが曝露され得る水銀の化学形態には、金属水銀、無機水銀および有機水銀の3態があり、食品を介した曝露としては魚介類由来のメチル水銀による健康リスクが最も高い。最近になり海棲ほ乳類臓器中で、マイクロサイズの水銀／セレン粒子が蛍光 X 線顕微鏡により検出されたことから、魚介類中にも水銀／セレン粒子が生成されていることが予想されている。水銀／セレン粒子の生成過程において、生体内でナノサイズの水銀／セレンナノ粒子が生合成されるメカニズムが想定される。しかしながら、水銀／セレンナノ粒子の生体内での検出法や動態が明らかになっていないことから、そのリスクが評価されるに至っていない。そこで、本研究では水銀／セレンナノ粒子として存在する水銀（水銀含有ナノ粒子）の検出法を開発し、食品中の水銀含有ナノ粒子の実態とその蓄積傾向について調査した。また、水銀含有ナノ粒子の経口曝露量についても推定を行った。後述するが、現在のところナノ粒子中の水銀は検出可能であるが、セレンについてはイオン化の効率など検出感度の問題で検出に至っていない。そのため、本項では水銀／セレンナノ粒子とせずに、水銀含有ナノ粒子とした。

2020年にインターネットを通じて、生魚として魚介計90試料を入手した。その内訳は、まぐろ・かじき:44, さけ・ます:10, あじ・いわし類:4, たい・かれい類:2, いか・たこ類:11, えび・かに類:3, 貝類:3, その他の生魚:13試料であった。

総水銀は加熱気化型水銀計で、セレンはマイクロ波分解した後 ICP-MS で、メチル水銀は LC-ICP-MS 法を用いて分析を行った。水銀含有ナノ粒子はパンクレアチンとリパーゼを含む溶液を試料に添加し超音波処理を行い、37°C 60 分で分解を行った後、限外濾過フィルターを用いて水銀含有ナノ粒子画分を分離した。適宜希釈した後 sp-ICP-MS 法を用いて、水銀含有ナノ粒子の粒子質量濃度 (Hg として)、粒子数濃度、単一粒子質量 (Hg として) を測定した。sp-ICP-MS での試料輸送効率、粒径 60 nm の銀ナノ粒子を用いて測定ごとに算出した値を用いた。

初年度検討した前処理方法を基により温和な条件で処理を行うことにより、魚介類試料から sp-ICP-MS 法で過渡的な Hg の信号を多数検出することが出来た (図 8)。食品として流通している魚介類試料中に水銀含有ナノ粒子が存在していることが明らかとなった。しかしながら、ナノ粒子様のセレンの信号は観測できなかった。

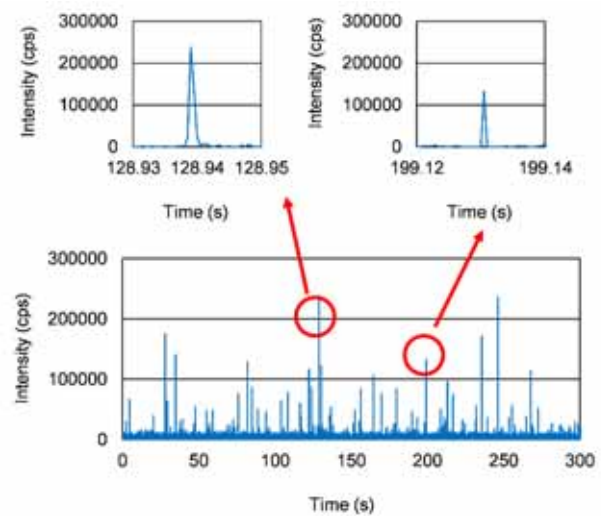


図8. まぐろ (総水銀: 2221 ng/g, メチルHg: 2028 ng/g) 中に含まれるナノ粒子状Hgの解析例. 水銀含有ナノ粒子の質量濃度: 90 ng/g, 水銀含有ナノ粒子の数濃度: 1.1×10^9 粒子/g, 平均単一粒子質量: 0.081 fg.

まぐろ・かじきグループには、 12.0 ng/g および $1.78 \times 10^8 \text{ particle/g}$ と水銀含有ナノ粒子が最も蓄積していた (図 9)。一方で、単一粒子質量の平均値にはグループ間の差異は認められず、その質量は平均で $0.079 \pm 0.028 \text{ fg}$ であった。総水銀濃度が高くなると水銀含有ナノ粒子の粒子質量濃度および粒子数濃度が増加する傾向が認められた。総水銀濃度が高くなると、単一粒子質量の最大値が大きくなる傾向が認められたが、増加傾向は粒子数濃度に比べて緩やかであった。一方で、総水銀濃度が高くなっても、単一粒子質量の平均値は一定の範囲内であった。また、水銀含有ナノ粒子の粒子質量濃度および粒子数濃度は、メチル水銀割合との相関は認められなかった。セレン:水銀濃度のモル比が 10 以上の試料では、水銀含有ナノ粒子は粒子質量濃度および粒子数濃度ともに一定の範囲であったが、セレン:水銀濃度のモル比が小さくなるにつれて水銀含有ナノ粒子濃度が増加していた。

2019 年の国民健康栄養調査の各魚介類の 1 日平均摂取量を用いて水銀含有ナノ粒子の曝露量を推定したところ、 $0.067 \mu\text{g/person/day}$ および $9.6 \times 10^8 \text{ particle/person/day}$ と推定された。また、総水銀およびメチル水銀の曝露量は 5.6 および $5.3 \mu\text{g/person/day}$ と推定され、これまで国立医薬品食品衛生研究所 食品部で行ってきたトータルダイエット調査の結果と同レベルであった。

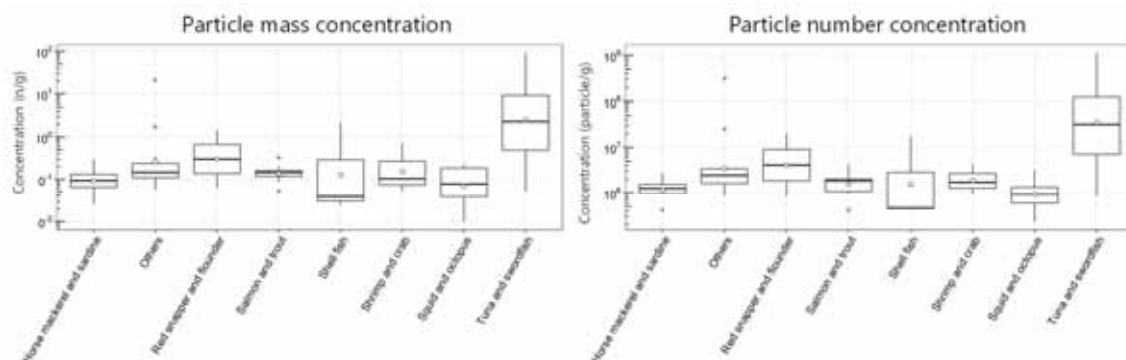


図9. 魚介類グループ別の水銀ナノ粒子濃度の比較

< 今後の課題 >

水銀含有ナノ粒子濃度と総水銀およびメチル水銀濃度との関係から、水銀含有ナノ粒子の粒径を大きくすることよりも、水銀含有ナノ粒子の粒子数を増やす過程の方が優先的であると考えられた。ナノ粒子様のセレンの信号は観測できなかったが、セレン:水銀濃度のモル比が 10 以下になると水銀含有ナノ粒子濃度が増加する傾向が認められたことから、水銀含有ナノ粒子の生成にはセレンが消費されている可能性が示唆された。検出された水銀含有ナノ粒子がセレン化水銀 (密度 8.266 g/cm^3) として球系の粒子として存在していたと仮定すると、平均的な粒径は $29 \pm 3 \text{ nm}$ であると推定された。

水銀含有ナノ粒子としての水銀の曝露量は $0.067 \mu\text{g/person/day}$ と推定され、この値は総水銀の 1.2% およびメチル水銀の 1.3% に相当した。しかしながら、sp-ICP-MS で観測できない単一粒子質量が 0.043 fg 未満のナノ粒子が多数存在している可能性もあるため、水銀含有ナノ粒子の曝露量を過小評価している可能性もある。現在のところ、水銀含有ナノ粒子に関する毒性影響に関する情報がないため、リスク評価を行うには至らなかった。

しかしながら、ナノ粒子は非ナノ粒子とは異なる組織・細胞へ輸送されることがあるため、水銀含有ナノ粒子の毒性評価とともに暴露実態を詳細に検討する必要がある。またsp-ICP-MSによるセレンの検出についても今後の課題である。

4) 個別課題名：水銀／セレンナノ粒子の生体内動態の解明（研究担当者：小椋康光
（所属機関名：千葉大学））

< 研究成果 >

水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の食品中からの摂取を想定し、化学合成した水銀／セレンナノ粒子を経口的にラットに投与し、その生体内動態を明らかにする検討を行った。すなわち、水銀／セレンナノ粒子が生体内で可溶化し、HgまたはSeとして挙動するかについて、これまでに主任研究者が開発してきたセレン欠乏ラットを用いた方法により検討した。これにより、水銀／セレンナノ粒子の溶解に伴って発生するSeの挙動を捕捉することにより、間接的に水銀／セレンナノ粒子の溶解を判定した。

セレン欠乏餌を3週間与えたセレン欠乏ラットを作成し、水銀／セレンナノ粒子及び対照化合物として塩化メチル水銀あるいは亜セレン酸ナトリウムをそれぞれ経口投与した。セレン欠乏状態からの回復を血清中セレンタンパク質の回復から評価し、水銀／セレンナノ粒子のセレン源としての機能を調べた。すなわち、水銀／セレンナノ粒子が溶解によって、HgやSeを放出し、毒性を発揮するか否かについて評価を行った。加えて、この際における各臓器及び尿、糞中のSeとHgの含有量を測定した。

水銀／セレンナノ粒子投与時にはセレン欠乏状態からの回復は観察されず、水銀／セレンナノ粒子はSeの栄養源として機能しないことが示された（図10）。すなわち、水銀／セレンナノ粒子を摂取しても、消化によってHgが放出されないことが示唆された。また、Hgの臓器等における蓄積度合と糞便中含量から水銀／セレンナノ粒子は消化管での吸収量が極めて低いことが示された。しかし、大腸に水銀／セレンナノ粒子の若干の蓄積が見られた。

今回の結果から水銀／セレンナノ粒子による急性毒性及び水銀／セレンナノ粒子から溶解により放出されるHgやSeによる毒性は生じていないものと考えられた。

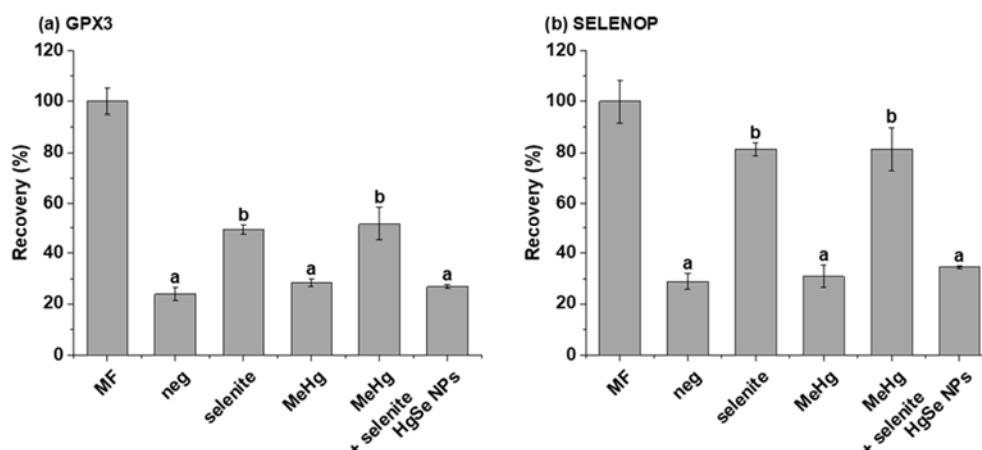


図10. セレン欠乏ラットに水銀/セレンナノ粒子やメチル水銀あるいは亜セレン酸を与えた時の血中セレンタンパク質 (GPX3及びSELENOP) の変化. MF: セレン適正餌摂取群、neg: セレン欠乏餌摂取群

<今後の課題>

今回の検討から、水銀/セレンナノ粒子には想定される摂取量では、急性毒性を發揮することは無いものと思われた。一方、長期にわたる摂取を継続した場合に発現し得る慢性毒性については、今後の検討課題となる。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究の第一の目的であるメチル水銀の脱メチル化については、当初、CYPやMerBオルソログによって進行するものと想定したが、遺伝子の検索やこれまでの報告を精査したところ、それらの酵素が関与することは無いものと結論した。一方、化学的な反応機構からも裏付けられる通り、海棲生物に濃縮されているセレノネインという特殊なアミノ酸が、メチル水銀の脱メチル化に関与していると考えられた。セレノネインは、生物濃縮を受け、食物連鎖の上位にいる動物ほどその体内存在量が多いことから、やはり生物濃縮を受けるメチル水銀の脱メチル化を促進し、水銀/セレンナノ粒子形成に寄与し、メチル水銀毒性を低減するという機構が示唆できる。すなわち、メチル水銀の存在量が多くても、セレノネインの存在量が同時に高いような食物連鎖の上位にいる魚類あるいは海棲哺乳類を喫食する場合は、同程度のメチル水銀量を含むものの、セレノネインの存在量が少ない食物連鎖の低位にいる魚類を喫食する方が、メチル水銀毒性のリスクが高まることを示唆できる。このことを確実にするためには、*in vivo*での評価が必要となるが、現在、本研究の成果を引き継いで、独自に*in vivo*での検討を行っているところである。

*in vivo*でメチル水銀の脱メチル化とセレノネインの関係が明らかとなれば、海洋生態系における水銀の関与する環境毒性学のパラダイムシフトに繋がる知見を提供できると考えている。

食品中の水銀/セレンバイオジェニックナノ粒子を直接分析する方法については、Hgを検出することについては確立ができた。この分析技術は、総水銀とメチル水銀に加え

て、食品中の第 3 の存在形態である不溶性の水銀量を示すことが可能となるため、食品衛生学上の有用な分析法となり得る。水銀のリスク評価という観点では補完的な位置付けとはなるが、今後は Se の検出もできるように分析技術の向上を目指す。

マーケットバスケット方式で採取した魚介類について、2019 年の国民健康栄養調査の各魚介類の 1 日平均摂取量を加味して、水銀含有ナノ粒子の曝露量を推定したところ、水銀含有ナノ粒子の水銀としての曝露量は 0.067 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ であり、ナノ粒子の曝露個数としては $9.6 \times 10^8 \text{ particle}/\text{person}/\text{day}$ と算出できた。これは魚介類に含まれる水銀含有ナノ粒子の曝露量を示した初めての結果である。

今回実施した *in vivo* の曝露実験では、水銀/セレンナノ粒子は生体内で全くと表現して良いほど、可溶化せず、水銀/セレンナノ粒子からの Hg や Se の放出が無かった。すなわち、水銀イオンや無機セレンに由来する急性毒性は無いものと考えられた。一方、慢性毒性については、下部消化管内に水銀/セレンナノ粒子の蓄積が見られたことから、今後の課題として検討していく必要がある。

III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト (◎は査読付き)
 - ◎ Kazuaki Takahashi, Jorge Ruiz Encinar, José M. Costa-Fernández, Yasumitsu Ogra: Toxicokinetics of mercury selenide nanoparticles in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, submitted.
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
 - 高橋 一聡、小椋 康光：セレン化水銀ナノ粒子の生体内挙動の解析 第31回日本微量元素学会学術集会、2020年11月、静岡
 - 鈴木 美成、岡本 悠佑、近藤 翠、谷 泉美、田中 佑樹、小椋 康光、穂山 浩：sp-ICP-MS法によるナノ粒子の特性解析へのベイズ推定の有効性 生命金属に関する合同年会2020、2020年11月、オンライン
 - 高橋 一聡、福本 泰典、小椋 康光：レーザーアブレーション (LA) -ICP-MS を利用したメチル水銀代謝性細菌のスクリーニング フォーラム 2020：衛生薬学・環境トキシコロジー、2021年9月、オンライン
- 3 特許及び特許出願の数と概要
なし
- 4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)
なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1)メチル水銀の脱メチル化に関する分子機構の解明を行う。シトクロム P-450 をターゲットとして、酸化的脱メチル化の機構について、シトクロム P-450 の分子種の特定を目指す。	5	メチル水銀の脱メチル化にセレノネインが関与する可能性を分子レベルで明らかにした。このことは海洋生態系にセレノネインが存在することの意味を示す画期的な成果であると自己評価している。 <i>in vivo</i> でその効果を示すことができれば、インパクトの高い成果を公表できるものと考えられ、またその成果は食品のリスク評価をはじめ、多くの波及効果を生むものと思われる。
(2)食品や生体中に含まれる水銀及びセレン化合物の簡便かつ定量的な化学形態別分析法の確立を行う。水銀やセレンの脱メチル化の有無を評価するための分析法として、従来法に比べ、短時間かつ低コストで多検体を扱えるような方法を開発する。	4	GC-MS/MS 法に代わる簡便な食品中の水銀の化学形態分析法として、改変型の LC-ICP-MS 法を開発した。魚介類中で分析可能であることを示した。 また前年度から検討してきた溶媒抽出による簡易法も実用化して、本研究における種々の検討に利用している。
(3)食品及び生体試料中の水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の測定法の確立を行う。食品や生体試料などの高マトリクス試料を分析可能とする方法を確立し、ばく露量の推定に用いることのできる方法を確立する。	4	食品試料中の水銀含有ナノ粒子(水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子と考えられる)の測定に成功した。確立した方法のバリデーションも問題ないと考えられ、食品中の水銀含有ナノ粒子の標準的な分析法として利用できると考えている。今後は、補完的に Se を同様に測定できるように分析技術の向上を図る必要がある。
(4)水銀／セレンナノ粒子の生体内動態の解明と、効果的なメチル水銀毒性低減を図る予防薬学的検討を行う。つまり水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の生成機構から、毒性回避法を推定し、 <i>in vivo</i> で検証する。	4	経口投与した水銀／セレンナノ粒子の体内動態を、Se の動態に着目することにより、間接的に明らかにした。その結果、水銀／セレンナノ粒子には想定される摂取量においては、急性毒性は無いものと考え得る結論を得た。一方、水銀／セレンナノ粒子の一部は主に大腸に蓄積したことから、下部消化管を中心に慢性毒性評価を今後する必要がある。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	メチル水銀の脱メチル化の機構について、全貌を明かにすることによりかなり近づいたと考えている。最終的に <i>in vivo</i> で想定している機構を証明できれば、大きなインパクトを持った成果に繋がると考えている。
(2) 研究成果の有用性	4	水銀/セレンナノ粒子が、極めて吸収されにくい状態であることを明らかにしたことから、食品由来の水銀/セレンバイオジェニクナノ粒子が直ちに憂慮すべきリスクには成り得ないものと判断できる科学的根拠を示した。しかし、慢性毒性については、下部消化管への影響を中心に今後さらなる検討が必要である。
<p>総合コメント</p> <p>海洋生態系におけるメチル水銀の脱メチル化の機構において、環境毒性学上のパラダイムシフトにつながる知見を得ることができた。また、食品中のナノ粒子中の水銀を分析する方法を確立できたことから、食品衛生学上及びレギュラトリーサイエンスに貢献する成果を得たと評価した。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。