

マウスを用いたヒジキ中ヒ素化合物の代謝

市川 覚士¹⁾, 貝瀬 利一¹⁾, 花岡 研一²⁾, 長岡(浜野) 恵³⁾, 米谷 民雄³⁾
(¹⁾東京薬科大学*, (²⁾水産大学校**, (³⁾国立医薬品食品衛生研究所***)

Intake and Excretion of Arsenic Compounds in Edible Brown Algae in Mice

Satoshi ICHIKAWA¹⁾, Toshikazu KAISE¹⁾, Ken'ichi HANAOKA²⁾, Megumi Hamano NAGAOKA³⁾ and Tamio MAITANI³⁾

¹⁾Laboratory of Environmental Chemodynamics, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,

1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

²⁾Department of Food Science and Technology, National Fisheries University,

2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki 759-6595, Japan

³⁾National Institute of Health Sciences,

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

A kind of edible sea brown algae, *Hijikia fusiforme*, contains high amount of inorganic arsenic. British Food Standard Agency (FSA) advised people not to eat a type of seaweed called Hijiki, on July 2004, because of the high levels of arsenic that it contains. In this study, we examined the removal of arsenic compounds by soaking procedure with water, and the excretion of arsenic contained in *H. fusiforme* was investigated in mice. The arsenic compounds were determined by hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS), and the speciation analysis of arsenic was used by high performance liquid chromatograph coupled with inductively coupled plasma mass spectrometer (HPLC/ICP-MS). It was made clear that the 28.2~58.8% of the total arsenic in alga were removed with water, 49.3~60.5% of arsenic eluted by heated cooking procedure, thus 88.7~91.5% of total arsenic is removable with cooking process. Hijiki was given to the mice, dimethylarsinic acid (DMAA) was mainly metabolized in urine. It became clear that soak with water and heated cooking procedure are effective in removal of arsenic from edible brown algae.

Key words: *Hijikia fusiforme*, arsenic, HPLC/ICP-MS, cooking process, marine food, seaweed, arsenosugar

海洋生物には多量のヒ素が含まれており、陸棲と海棲動物ではそのヒ素濃度及び化学形態に大きな違いが見られる。陸棲動物のヒ素濃度は1 µg/g (乾重量) 以上になることはほとんどないが、海棲動物では数µg/gから100 µg/gにおよぶことがある。これらには有機ヒ素化合物が主として存在し、無機ヒ素は全ヒ素の2%以下と低い。海藻など海洋植物に含まれるヒ素の大部分も有機体であり、藻類ではarsenosugarのようなジメチルヒ素化合物である。また、無機ヒ素は海棲動物と比べて多いものの10%未満である¹⁾。しかし、ヒジキには無機ヒ素が多く、50%前後含まれている。このことから2004年7月、イギリス食品規格庁は自国民に対し「ヒジキを食べるべきでない」との勧告を出した。また、カナダでは2001年10月に同様の勧告が出されており、行政指導がとられている。海産食品を多食する日本人にとってこれ

*所在地：八王子市堀之内1432-1 (〒192-0392)

**所在地：下関市永田本町2-7-1 (〒759-6533)

***所在地：世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-0098)

ら海産物摂取による食生活の安全性を確保することは重要である。

今回我々はヒジキを通して摂取されるヒ素量を把握する事を目的として、ヒジキ中ヒ素化合物の調理過程における除去ならびにヒジキに含まれるヒ素化合物のマウスにおける体内動態について検討した。

実験方法

1. 試薬・実験材料

Arsenate (Na_2HAsO_4), arsenite (NaAsO_2), methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (DMAA), arsenobetaine (AB), trimethylarsine oxide (TMAO), tetramethylarsonium (TMA), arsenocholine (AC) はトリケミカル (Yamanashi, Japan) より購入した。(R)-(2',3'-dihydroxypropyl)-5-deoxy-5-dimethylarsinoyl- β -D-ribose (arsenosugar) はMcAdamらの方法を用い1-O-acetyl-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose, (S)-1,2-O-isopropylidene glycerol, dimethylarsinous iodideより合成した²⁻⁷。本研究で使用した標準ヒ素化合物の構造式をFig. 1に示した。

また、実験材料として用いたヒジキは、長ヒジキ及び芽ヒジキを国内産、韓国産、中国産それぞれ2検体ずつ用いた。

2. 検出方法

総ヒ素量の測定にはバリアン社製水素化物発生装置VGA-77, 原子吸光度計SpectrAA-220を用いた。マイクロウェーブ分解装置はO. I. Analytical社製Microwave Digestion Systemを使用した。形態別ヒ素化合物の測定にはHPLC/ICP-MSを用いた。HPLCはジーエルサイエンス社製であり、ヒ素の検出器であるICP-MSはパーキンエルマー社製ELAN DRC-eを用いた。HPLC/ICP-MSの測定条件をTable 1に、標準品(10 ppb, 5 μ L)のクロマトグラムをFig. 2に示した^{8,9}。

3. 水戻しによるヒジキ中ヒ素の溶出の検討

細切したヒジキ0.5 gに純水を20 mL加え、30分間浸漬した。この溶液を一定量にメスアップした後、ろ過を行い、HPLC/ICP-MSでヒ素を形態別に測定した。

4. 加熱調理によるヒジキ中ヒ素の溶出の検討

水戻ししたヒジキに純水を30 mL加え、20分間90°Cで加熱した。放冷後、溶出液は一定量にメスアップした後、ろ過を行い、HPLC/ICP-MSでヒ素を形態別に測定した。なお、残渣は総ヒ素量の分析と同様の方法で残存ヒ素量を測定した。

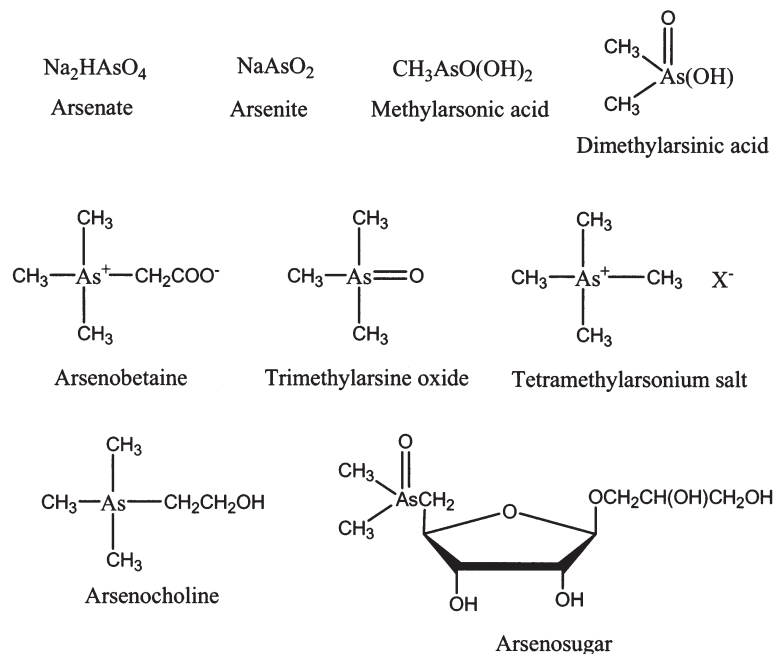
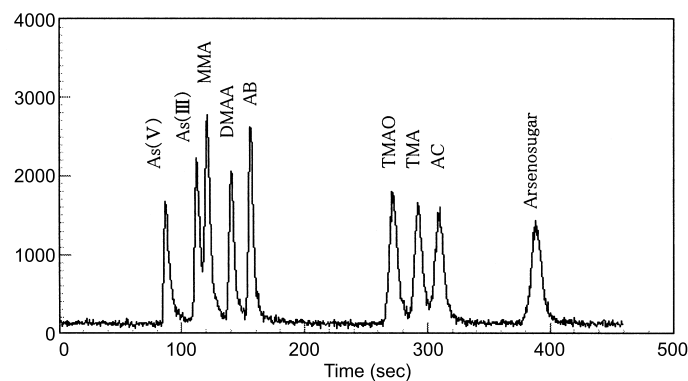


Fig. 1 Chemical forms of arsenic standard.

Table 1 Analytical conditions of HPLC/ICP-MS

HPLC	
Column	Inertsil As (2.1 × 150 mm)
Column temp.	40°C
Flow rate	0.20 mL/min
Injection volume	5 µL
Mobile phase	10 mM Sodium 1-Butanesulfonate 4 mM Tetramethylammonium hydroxide 4 mM Malonic acid 0.5 % Methanol
ICP-MS	
RF power	1.5 kW
Plasma gas flow	18 L/min
Nebulizer gas flow	0.91 L/min
m/z	75 (As)

**Fig. 2** HPLC/ICP-MS chromatogram of arsenic standard compounds and arsenosugar.
Sample injection volume: 5 µL. Arsenic standard compounds: 10 µgAs/L.

5. ヒジキ中の総ヒ素量分析

破砕器により粉末にし、均一化したヒジキ粉末試料を正確に0.5 g量りとり、硝酸5 mL、過酸化水素水2 mLを加え、マイクロウェーブ分解装置で分解した。分解液をビーカーに移し、硫酸を加えてホットプレート上で加熱し、硝酸を除去した。放冷後、クエン酸水素二アンモニウム水溶液を加え、アンモニア水を用いて中和し後、塩酸、20%ヨウ化カリウム水溶液、20%アスコルビン酸水溶液を加えて還元を行った。この溶液を適宜希釈し、水素化物発生装置に導入して原子吸光度計で測定した。尚、検量線作成はあらかじめ原子吸光度用ヒ素標準試薬を用いてヒ素として5 ppb, 10 ppb, 15 ppbとなるようにした試料に塩酸、20%ヨウ化カリウム水溶液、20%アスコルビン酸水溶液を加えた後、純水を用いて100 mLとしたものを測定し、吸光度より求めた。

6. ヒジキ中ヒ素化合物の形態別分析法

破砕器により粉末にし、均一化したヒジキ粉末試料0.1 gに硝酸を1 mL加え、80°Cで1時間加熱した。放冷後、アンモニア水で中和し、純水で50 mLに定容した。測定サンプルはろ過後、HPLC/ICP-MSでヒ素を形態別に測定した。

7. ヒジキ飼料調製法

調理後のヒジキを再現するため以下の処理を行った。すなわち芽ヒジキ0.5 gを20 mLの純水を用いて水戻し後、ヒジキをろ取した。更に水戻したヒジキに30 mLの純水を加えて30分間加熱処理し、調理ヒジキとした。調理ヒジキを凍結乾燥した後、破砕しマウス用ヒジキ飼料とした。

8. マウス尿・糞試料前処理法

マウス尿はゲージ内のろ紙に吸収させ、1日ごとに採尿した。ろ紙を50%メタノールで抽出し、抽出液を減圧乾固後、純水で再溶解させ測定試料とした。

マウス糞は1日ごとに採取し、50%メタノールで抽出した。遠心分離後、上清を分取しODSカラムを用いて粗精製した。通過液を減圧乾固し、純水で再溶解させ測定試料とした。

結果及び考察

日本、韓国、中国産のヒジキを分析した結果、総ヒ素は日本産41.7～46.7 $\mu\text{g/g}$ 、韓国産65.6～79.8 $\mu\text{g/g}$ 、中国産36.0～48.6 $\mu\text{g/g}$ であった (Table 2)。これらは、これまで報告されているヒジキ中のヒ素量12.0～182.6 $\mu\text{g/g}$ の値の範囲内であり、特に高濃度のヒ素を含んでいるものではなく、産地別の違いも見られなかった¹⁰⁻¹⁴⁾。

水戻し液及び加熱調理液を測定した結果、水戻しにより総ヒ素の28.2～58.8%、また加熱調理により49.3～60.5%のヒ素が溶出し、水戻しと加熱調理により総ヒ素の88.7～91.5%のヒ素を除去できる事が確認された (Fig. 3)。調理過程により溶出したヒ素のうち88.7～91.5%がarsenateであったため、調理過程は無機ヒ素の溶出に有効であると考えられる。

乾燥ヒジキ及び調理ヒジキのヒ素を形態別に測定した結果のクロマトグラムをFig. 4に示した。調理過程により9割のヒ素が溶出したものの我々が食する調理ヒジキにもまだヒ素が残存していることがわかる。そこで、マウスを用いて調理ヒジキ中ヒ素化合物の体内動態について検討を行った。

調理ヒジキをマウスに10日間連続投与した結果、投与したヒ素量の63.0～84.6%が尿及び糞中に主としてジメチルアルシン酸として排泄された。排泄量の66.5～87.3%は尿中に排泄された。このことより、体内に摂取されたヒ素は比較的速やかに排泄されることが推定された。

Table 2 Total arsenic contents of *Hijikia fusiforme* ($\mu\text{gAs/g}$, dry weight)

Source	Type	Concentration ($\mu\text{gAs/g}$)	
		Sample A	Sample B
Japan	sprout Hijiki	41.7	44.4
	long Hijiki	45.8	46.7
South Korea	sprout Hijiki	71.5	65.6
	long Hijiki	79.5	79.8
China	sprout Hijiki	48.6	36.0
	long Hijiki	37.5	42.4

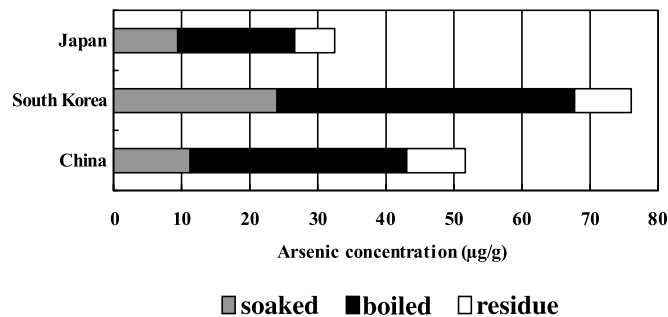


Fig. 3 Decrease of arsenic in *Hijikia fusiforme*.

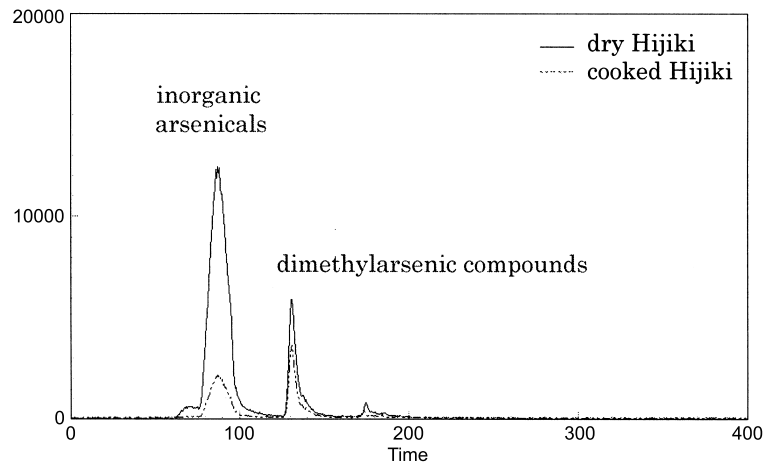


Fig. 4 HPLC/ICP-MS chromatogram of dry Hijiki and cooked Hijiki.

本研究の結果、ヒジキ中のヒ素は調理過程により約9割が除去されること、調理後のヒジキをマウスに投与した結果、約8割が速やかに排泄されることが明らかとなった。これらの結果はヒジキが安全な食品であることを示していると考えられる。しかし、高濃度投与ではあるものの、ジメチルアルシン酸の発癌性を示唆する実験結果も存在することから、今後はジメチルアルシン酸をはじめとするジメチルヒ素化合物の生体影響について検討を行う予定である。

参考文献

- 1) Yasui, A, Tsutsumi C, Toda S (1978) Selective determination of inorganic arsenic (III), (V) and organic arsenic in biological materials by solvent extraction-atomic absorption spectrophotometry. *Agricultural and Biological Chemistry* 42(11): 2139-2145.
- 2) Sakurai T, Kaise T, Ochi T, Saitoh T, Matsubara C (1997) Study of in vitro cytotoxicity of a water-soluble organic arsenic compound, arsenosugar, in seaweed. *Toxicology* 122(3): 205-212.
- 3) McAdam D P, Stick R V (1986) The synthesis of (*R*)-2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl- β -D-ribose, a naturally-occurring, arsenic-containing carbohydrate. *Tetrahedron Letters* 27(2): 251-254.
- 4) McAdam D P, Perera A M A, Stick R V (1987) The synthesis of (*R*)-2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinyl- β -D-ribose, a naturally occurring arsenic-containing carbohydrate. *Australian Journal of Chem* 40(11): 1901-1908.
- 5) Kaise T, Oya-Ohta Y, Ochi T, Okubo T, Hanaoka K, Jrgolic K J, Sakurai T, Matsubara C (1996) Toxicological study of organic arsenic compound in marine algae using mammalian cell culture technique. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 37(3): 135-141.
- 6) Oya-Ohta Y, Kaise T, Ochi T (1996) Induction of chromosomal aberrations in cultured human fibroblasts by inorganic and organic arsenic compounds and the different roles of glutathione in such induction. *Mutation Research* 357(1,2): 123-129.
- 7) Hanaoka K, Goessler W, Yoshida K, Fujitaka Y, Kaise T, Irgolic K J (1999) Arsenocholine- and dimethylated arsenic-containing lipids in star-spotted shark *Mustelus manazo*. *Appl Organomet Chem* 13(10): 765-770.
- 8) Kaise T (2002) Speciation of arsenic compounds in biological samples by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry system. *Purazuma Kaku Yugo Gakkaishi* 78(7): 646-652.
- 9) Shibata Y, Morita M (1989) Speciation of arsenic by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* 5: 107 - 109.

- 10) Laparra J M, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R (2004) Bioaccessibility of inorganic arsenic species in raw and cooked *Hizikia fusiforme* seaweed. *Appl Organomet Chem* 18(12): 662 - 669.
- 11) Laparra J M, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R (2003) Estimation of Arsenic Bioaccessibility in Edible Seaweed by an in Vitro Digestion Method. *J of Agricul and Food Chem* 51 (20): 6080 - 6085.
- 12) Hanaoka K, Goessler W, Ohno H, Irgolic K J, Kaise T (2001) Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals. *Appl Organomet Chem* 15(1): 61 - 66.
- 13) Raab A, Fecher P, Feldmann J (2005) Determination of Arsenic in Algae - Results of an Interlaboratory Trial: Determination of Arsenic Species in the Water-Soluble Fraction. *Microchimica Acta* 151 (3 - 4): 153 - 166.
- 14) Narukawa T, Kuroiwa T, Inagaki K, Takatsu A, Chiba K (2005) Decomposition of organoarsenic compounds for total arsenic determination in marine organisms by the hydride generation technique. *Appl Organomet Chem* 19 (2): 239 - 245.