

ICP-MSを用いる海藻類の微量元素の分析法に関する研究

著者	山本 真奈江
学位名	修士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2020
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00002132/

修士学位論文

ICP-MS を用いる海藻類の微量元素の分析法に関する研究

2020 年度

(2021 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋生命資源科学専攻

山本 真奈江

修士学位論文

ICP-MS を用いる海藻類の微量元素の分析法に関する研究

2020 年度

(2021 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋生命資源科学専攻

山本 真奈江

目次

緒言	1
材料と方法	9
結果	12
考察	16
謝辞	24
参考文献	25

緒言

ヒ素は自然環境中に広く存在する。純粋なヒ素は半金属と呼ばれる物質であり、そのヒ素にはほかの元素が結合してヒ素化合物となって存在する¹⁾。ヒ素化合物のうち、炭素を含むものを有機ヒ素、炭素を含まないものを無機ヒ素という。3価のヒ素をAs(III)、5価のヒ素をAs(V)と表す¹⁾。金属ヒ素は元素周期表で第 15 族に属し、化学的性質はリンに類似している¹⁾。常温の空気中では変化しない。黄色、灰色および黒色の3種の同素体がある¹⁾。自然界では無機ヒ素のメチル化が生じ、動植物中にはメチルアルソン酸 (MMA)、ジメチルアルシン酸 (DMA)、アルセノベタイン (AB)、アルセノシュガーなどが代表的なヒ素化合物として存在する¹⁾。魚介類に含まれる主なヒ素化合物はABである¹⁾。

海洋生態系に存在する有機ヒ素化合物の化学形態は多様であり、水溶性有機ヒ素化合物と脂溶性有機ヒ素化合物に大別される¹⁾。海藻では、緑藻や紅藻に比べ褐藻類はヒ素濃度が高い²⁾。さらに褐藻類の中でも、ホンダワラ科の海藻で無機ヒ素が高レベルで検出される²⁾。また、無機ヒ素は水溶性であるため、水への浸漬や煮熟によって除去効果が得られる³⁾。

ヒ素化合物の毒性は、化学形態によって大きく異なることが知られている¹⁾。貝瀬らは、海洋動物に含まれる各ヒ素化合物の LD50 を測定した⁴⁻⁶⁾。マウスに As(III)、モノメチルアルソン酸 [MMA(V)]、ジメチルアルシン酸 [DMA(V)]、

トリメチルアルシンオキシド(TMAO)を経口投与した場合のLD50値は、それぞれ34.5 mg/kg, 1,800 mg/kg, 1,200 mg/kg および 10,600 mg/kg である⁴⁻⁶⁾。魚介類に含まれる最も顕著なヒ素化合物であるABのLD50は10,000 mg/kgを超え、実質的に無毒である⁴⁻⁶⁾。これらのデータは、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)による「食品中の特定汚染物質の安全性評価」に引用され、JECFAは、As(III) > As(V) > MMA(V) > DMA(V)として相対的なヒ素毒性を報告している⁷⁾。さらに貝瀬らによるとアルセノシュガーの細胞毒性は、亜ヒ酸ナトリウムの毒性の1/2800、ヒ酸ナトリウムの1/300であった⁸⁾。

As(III)とAs(V)の生体内化学反応は、毒性への経路が異なることが推定されている⁹⁾。As(III)は、酵素やタンパク質のチオール基を酸化して細胞毒として作用することが知られている⁹⁾。As(III)の細胞毒性の症状には、皮膚の黒ずみや角化、脱毛、手足の脱力、筋萎縮、嘔吐、下痢、食欲不振などがある⁹⁾。As(V)はチオール基と結合することができないため、As(III)よりも毒性が低い⁹⁾。対照的に、生体内での研究では、As(V)はリンと競合し、酸化リン酸化のデカップリング剤として作用することが示されている⁹⁾。

飲料水に含まれる無機ヒ素は、膀胱がんや皮膚がん、肺がん、皮膚病変などのリスクの増加と関連している¹⁰⁾。ヒ素の摂取は喫煙男性の肺がんのリスクを高めることが推定される一方、海藻の接触は喫煙習慣のない人の肺がんのリスク

を低下させることが示唆された¹¹⁾。

無機ヒ素を摂取した場合、還元やメチル化などの生物変換を経て、MMA や DMA へと速やかに尿中に排泄される⁴⁾。対照的に、AB や各種アルセノシュガーなどの有機ヒ素は、摂取後の生物変換がほとんど行われず、ほとんど変化せずに排泄される⁴⁾。貝瀬らは、魚類の AB が生体内で代謝されにくいことを報告している¹⁾。福井らは、海藻に含まれるアルセノシュガーが急速に排泄されることを報告している¹²⁾。塩見らは、溶媒抽出法を用いた海洋生物中の無機ヒ素と有機ヒ素の分画定量を報告している¹³⁻¹⁵⁾。その結果、褐藻類のヒジキを除いて、ほとんどの海洋生物の無機ヒ素含有量は非常に低かった。一般にヒ素は他の重金属に比べて非常に多く含まれており、水溶性ヒ素化合物が全ヒ素含有量の80%を占めていた。

英国食品規格庁(Food Standard Agency, FSA)は、2004年、発がん性のある無機ヒ素の含有量が高いという調査結果を受けて、ヒジキを食べないように勧告した¹⁶⁾。そのため、ヒジキ製品は英国への輸出が禁止となった。FSAが調査した結果、乾燥品を水戻ししたヒジキ中の無機ヒ素は最大で22.7 mg/kgであった。また、農林水産省の有害化学物質含有実態調査によると、乾燥ヒジキ299検体の総ヒ素含量は平均値93 mg/kg (最大値160 mg/kg, 最小値28 mg/kg)、無機ヒ素含量は平均値67 mg/kg (最大値130 mg/kg, 最小値4.5 mg/kg)であった。

た¹⁷⁾。花岡らはアカモク市販品の総ヒ素濃度は $270 \pm 11 \mu\text{g/g}$ 、無機ヒ素濃度は約 50%を占めると報告した¹⁸⁾。

食品安全委員会の食品健康影響評価では、飲料水および食品からの無機ヒ素の摂取による発がんのリスクが推定された¹⁾。無毒性量 NOAEL は肺がん $4.1 \sim 4.9 \text{ mg/kg}$ 体重/日、膀胱がん $5.0 \sim 12.1 \text{ mg/kg}$ 体重/日である¹⁰⁾。国立がん研究センターの多目的コホート研究によると、日本人の総ヒ素の平均摂取量は $170 \mu\text{g/日}$ であり、総ヒ素摂取の寄与食品として大きい順から魚介類 32%、ひじき 28%、海藻類 20%、米類 16%、野菜類 1%であった¹¹⁾。無機ヒ素摂取の寄与食品として大きい順からひじき 50%、米類 35%、海藻類 5%、魚介類 4%、野菜類 3%、果物類 2%であり、ひじきの喫食は無機ヒ素の摂取のリスクを押し上げていることが判明した¹¹⁾。また、男性の喫煙者で総ヒ素、無機ヒ素ともに肺がんリスクの上昇、非喫煙者では肺がんリスクの低下が認められた¹¹⁾。2012年以降、多くの国や国際機関が $0.1 \sim 2 \text{ mg/kg}$ の範囲で無機ヒ素の規制値を発表している¹⁹⁻²⁴⁾。Codex では食用油脂や米類、食塩、ミネラルウォーターで無機ヒ素や総ヒ素の一般規格が設定されている¹⁹⁾。EU では米類やその加工品について無機ヒ素の最大基準値が設定されている²⁰⁾。中国では、米、水生動物およびその製品、乳児および幼児用の補助食品の無機ヒ素などが規制されている²¹⁾。オーストラリアとニュージーランドでは、甲殻類、魚類、軟体動物、海藻類に含まれる無機ヒ

素のレベルが規制されている²²⁾。WHO は飲料水の暫定ガイドライン値を公表している²³⁾。日本国内では食品衛生法において食品中の基準値が設定されており、農産物では残留農薬基準値として、もも、なつみかん、いちご、ばれいしょ、きゅうり、トマト、ほうれんそうで 1.0 mg/kg が設定され、ミネラルウォーターで 0.56 mg/L 以下と規制されている²⁴⁾。畜産物やヒジキを含む水産物では基準値が定められていない²⁴⁾。

わが国では、ヒジキなど海藻類はミネラル類を豊富に含む重要な栄養源である¹⁾。乾燥ヒジキは可食部 100 g あたり 139 kcal である。タンパク質 10.6 g, ナトリウム 1400 mg, カリウム 4400 mg, カルシウム 1400 mg, マグネシウム 620 mg, 鉄 55 mg, 亜鉛 1.8 mg および β カロテン 3300 μg と豊富な栄養を含み、日本ではミネラル類の摂取源として栄養学的に推奨されて食べられてきた²⁵⁾。以上のことを受けて無機ヒ素を除去したヒジキ加工品の開発が求められる中、山下は素干し原藻ヒジキの重量の 20~40 倍量の塩水を用い、30 分間の煮熟を 3 回から 4 回繰り返すことにより、無機ヒ素含量を 1 mg/kg 以下に低減したヒジキ加工品の製造法を発表した³⁾。しかしながら、このような無機ヒ素を除去した乾燥ヒジキの製造法は実用化されず、まだ普及していない。

市販されているヒジキは葉の部分にあたる芽ヒジキと茎部分にあたる長ヒジキがある³⁾。国内で販売されているひじきの製法は伊勢製法と房州製法の二種類

に大別される³⁾。伊勢製法は素干しヒジキを水戻しと水洗いし後に、蒸しあげ乾燥させる製法である。房州製法は生の状態で煮熟や蒸煮の加熱を行う製法である。製造法によってヒ素や鉄などの微量元素が溶出するため、製品でのこれら濃度が異なることが推定される。

JECFA はブラジル、フランス、日本およびシンガポールで得られた食品のヒ素含有量を公表している⁷⁾。総ヒ素濃度が最も高かったのは、海藻類、魚介類、キノコ・菌類、米・米製品、一部の肉製品であった⁷⁾。ヒ素を多く含む食品群は、日本人の食生活に共通している。これに対して、キノコ類や肉製品からのヒ素の摂取量は、日本人の平均的な摂取量が比較的少ない。JECFA は、日本、フランスおよびシンガポールから入手した食品中の無機ヒ素のレベルも報告している。飲食物中の無機ヒ素濃度は通常 0.1 mg/kg を超えることはなかったが、海藻類、米および肉類は通常 0.1 mg/kg を超えていた。しかし、海藻類、米および一部の魚介類には比較的高濃度の無機ヒ素が含まれている⁷⁾。したがって、総合的な毒性を議論する際には、海藻類や魚介類に含まれる各化学形態のヒ素の濃度を考慮する必要がある。

海藻や魚介類中の無機ヒ素の濃度を測定するため、水^{26,27)}、硝酸²⁸⁾、アルカリ試薬²⁹⁾、酵素溶液^{30,31)}、メタノール/水混合物³²⁾などのさまざまな溶媒による抽出効率が評価されてきた。Taylor らは、海藻類の 1%硝酸のヒ素抽出効率

がメタノール/水(1:1)溶液よりも高いことを報告している³³⁾。Pellらは、水抽出法を用いて海藻中のアルセノシュガーの濃度を測定したが、抽出効率よりもアルセノシュガーの構造維持を優先した³⁴⁾。Jiaらは、水、メタノールと水の混合液、希硝酸を用いた魚介類からのヒ素抽出の効率を比較し、後者が最も抽出効率が高かった³⁵⁾。Pétursdóttirらは、9種類の溶媒を用いて魚介類からのヒ素抽出効率を比較した³⁶⁾。最も高い抽出効率は、2%の硝酸と3%の過酸化水素を含む混合溶媒で得られた³⁶⁾。Zmozinskiらは、0.2%硝酸に1%過酸化水素を加えた溶液を用いて高い抽出効率を報告した³⁷⁾。松本は0.3 ml/L硝酸での抽出と硝酸に酢酸を添加した抽出を比較しており、高い抽出率を報告した³⁸⁾。

成川らは無機ヒ素化合物とABにはICP-MSの分析で感度差があり、ABが高感度を示したと報告した³⁹⁾。総ヒ素量を正確に分析するためには試料中の有機ヒ素化合物を無機ヒ素に分解し、無機ヒ素を検量線基準とするのが適切であることを提案した³⁹⁾。長岡らは、0.3 mol/Lの硝酸を用いて、乾燥ブロック浴中の海藻や魚介類から無機ヒ素を抽出するのに適していることを示した⁴⁰⁾。マイクロ波加熱は100°Cで最高の抽出効率が得られたため不要であった⁴¹⁾。

柴田らの研究によると、海藻類に含まれるヒ素化合物の約半分は無機ヒ素で残りの約半分はアルセノシュガーであった⁴²⁾。柴田らは褐藻類のコンブのアルセノシュガーを三種類単離同定した⁴²⁾。また、神らは褐藻類のイシモズクで4種

類と緑藻類のミルから 2 種類のアルセノシュガーを単離精製した^{43, 44)}。このように、海藻類の主要なヒ素化合物であるアルセノシュガーの定量法および毒性を明らかにする必要がある。

そこで、本研究は、アルセノシュガーの標準物質が販売されていないが、ヒ素含量がもっとも高い食品であるヒジキ、アカモクなどの海藻加工品を研究材料として、ヒ素化合物の分析法と濃度を測定した。とくに、分析法やバイオアッセイに用いるアルセノシュガーを抽出・精製することを目指した。また、これを用いて HPLC -ICPMS による海藻類に含まれるヒ素化合物の分子種分析を行った。

材料と方法

試薬

硝酸(1.38, 有害金属測定用), 過酸化水素水(特級), マロン酸(特級), 1-ブタン
スルホン酸ナトリウム, 15%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド溶液(特
級), ヒ素 ICP 標準液(Accu Standard Inc.), アルセノベタインおよびメタノー
ル(特級)は富士フイルム和光純薬(株)から購入した。認証標準物質のひじき粉末
(NMIJ CRM 7405-a)およびヒ酸[As(V)]水溶液(NMIJ CRM 7912-a)は国立研究
開発法人産業技術総合研究所から購入した。超純水はミリ Q 超純水製造装置
(Milli-Q Simplicity, ミリポア)を用いて製造した。

材料

本研究の材料としてヒジキ *Sargassum fusiforme* の素干し品およびボイル
乾燥品を試作した。乾燥ヒジキは山下³⁾の論文に従って, 10 倍量の 1/3 海水を
用いて, 2 回煮熟して無機ヒ素を除去したのち, 冷風乾燥機を用いて乾燥し
た。アカモク *S. horneri* は生のまま冷凍保存およびボイル乾燥品を試作した。
乾燥ヒジキ, 乾燥アラメなど加工品は市販品を購入して研究材料として用い
た。

実験方法

1. 海藻市販品および採集試料の微量元素濃度測定

乾燥試料はすりつぶして粉末状にし、湿潤試料はセラミック製ハサミで細かくしたものを用いた。それぞれの試料を 15 ml ネジ付きポリプロピレン製分解チューブに 0.05 g 採取し、秤量した。これに硝酸 0.15 ml と過酸化水素 0.5 ml を加え一晩放置した後、ドライブロックバスで 100°C・5 時間を維持し分解した。分解後、10 ml に超純水でメスアップし、メンブレンフィルター(Acrodisc 0.2 μm , Pall Cooperation)を付けたシリンジでろ過した。各試料を Table 1 の条件下で ICP-MS を用いて分析し微量元素濃度を測定した。

2. ヒジキおよびアカモクの部位別微量元素濃度測定

乾燥ヒジキを超純水に浸漬したのち、ヒジキの黒い表皮部分と内側の白い芯の部分に分けた。アカモクも同様にした。各試料を 15 ml ネジ付きポリプロピレン製分解チューブに 0.05 g 採取し、硝酸 0.15 ml と過酸化水素 0.5 ml を加え一晩放置した後、ドライブロックバスで 100°C・5 時間加熱して分解した。分解後、10 ml に超純水でメスアップし、メンブレンフィルター(Acrodisc 0.2 μm , Pall Cooperation)を付けたシリンジでろ過した。各試料を Table 1 の条件下で ICP-MS を用いて分析し微量元素濃度を測定した。

3. 水溶性ヒ素化合物抽出条件の検討

乾燥ヒジキを 1.5ml チューブに 0.2 g ずつ入れ，1 ml の超純水を加えた。これを室温または 100℃で 10 分間加熱した。試料をペッスルでホモジナイズをしたのち，12000 rpm で 10 分間遠心分離し，上清を回収した。メンブレンフィルター(Acrodisc 0.2 μm, Pall Cooperation)を付けたシリンジでろ過した後，Table 2 の条件下で HPLC-ICP-MS を用いて測定した。

4. アルセノシュガーの抽出

乾燥ヒジキを煮熟し，煮熟水をロータリーエバポレーターで減圧乾固した。得られた固形物をメタノールで抽出，ろ過し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。得られた固形物を超純水に溶解し，Table 3 の条件下で分離した。逆相カラムにおいて，ヒ素化合物はメタノールグラジエントによって保持時間 18-23 分に溶出された。分離した抽出物を Table 2 の条件下で HPLC-ICP-MS を用いて測定した。

結果

1. 海藻市販品の微量元素濃度測定

ヒジキ粉末の認証標準物質のヒ素濃度を測定し、真度は103%であった (Table 4)。市販の海藻加工品の微量元素濃度を測定した (Table 5, 6)。乾燥ヒジキ市販品 9 検体の総ヒ素濃度は 32~107 mg/kg であった。乾燥アカモク市販品は 231 mg/kg とヒジキ市販品より高濃度の総ヒ素を検出した。乾燥アラメ市販品は 24~112 mg/kg の総ヒ素を検出した。乾燥ワカメ市販品は 43 mg/kg の総ヒ素を検出した。乾燥エゴノリ市販品は 5 mg/kg の総ヒ素を検出した。

乾燥ヒジキ市販品 9 検体の鉄濃度は 172~1052 mg/kg であった。乾燥アカモク市販品は 723 mg/kg であった。乾燥アラメ市販品は 43~104 mg/kg の鉄を検出した。乾燥ワカメ市販品は 84 mg/kg の鉄を検出した。乾燥エゴノリ市販品は 221 mg/kg の鉄を検出した。

乾燥ヒジキ市販品 9 検体の亜鉛濃度は 0~20 mg/kg であった。乾燥アカモク市販品は 10 mg/kg であった。乾燥アラメ市販品は 17~31 mg/kg の亜鉛を検出した。乾燥ワカメ市販品は 40 mg/kg の亜鉛を検出した。乾燥エゴノリ市販品は 18 mg/kg の亜鉛を検出した。

また、ヒジキおよびアカモクの乾燥した試作品のヒ素濃度を測定した (Table 7)。ヒジキ素干し品の総ヒ素濃度は 81 mg/kg であった。ヒジキボイル乾燥品

の総ヒ素濃度は 19 mg/kg であった。ヒジキボイル乾燥品の濃度はヒジキ素干し品の 1/4 であった。また、冷凍の生アカモクは 197~275 mg/kg とヒジキ素干し品およびヒジキボイル乾燥品よりも高濃度の総ヒ素が検出された。

2. ヒジキおよびアカモクにおける部位別微量元素濃度測定

ヒジキおよびアカモクのヒ素の蓄積部位を明らかにするため、茎の部分の色が黒い表皮と白い髓層に切り分けて、組織を分別し、総ヒ素を測定した

(Table 8)。その結果、ヒジキの表皮は髓層と比べて、ヒ素を約 4 倍多く含んでいた。アカモクの表皮の場合もヒ素濃度は髓層の約 2 倍多く含んでいた。これらのことからヒジキおよびアカモクにおけるヒ素の局在部位は表皮であることが判明した。また、ヒジキの表皮は髓層と比べて鉄を約 13 倍、亜鉛を 3 倍多く含んでいた (Table 9)。

3. 水溶性ヒ素化合物抽出条件の検討

ヒジキ素干し品、冷凍生アカモク、ボイルアカモク乾燥品およびワカメ市販品からヒ素化合物を超純水または熱水で抽出したのち、イオンペア分析用の HPLC-ICP-MS を用いて無機および有機態のヒ素化合物を分子種別に測定した (Figures 1-5)。無機ヒ素(V)の分子種分析の結果を示す(Figure 6)。乾燥ヒジキの水戻し過程で無機ヒ素やアルセノシュガーが水に溶け出して除去する技術が報告されている³⁾。そこで、温度条件を変えてヒジキ素干し品からヒ素化合物

を抽出して、水中に溶出されたヒ素化合物を HPLC-ICPMS によって分析した。その結果、沸騰水浴中で抽出する方法が低温で抽出するよりも、測定できたいずれの化合物も濃度が高かった。これらのことから、ヒ素化合物の分子種別分析には乾燥した藻体から熱水で抽出する方法を採用した。HPLC-ICP-MS の分析において無機ヒ素(V)は保持時間 250 秒で溶離し、アルセノベタインは保持時間 380 秒で溶離した。素干し品の熱水抽出と水抽出では保持時間 280 秒と保持時間 600 秒でヒ素化合物が溶離した。また、冷凍生アカモク、ボイルアカモク乾燥品、ワカメ市販品の熱水抽出では保持時間 250 秒と保持時間 650 秒でヒ素化合物が溶離した。

4. アルセノシュガーの精製と分析

海藻類の主要なヒ素化合物として、アルセノシュガー、アルセノベタインおよび無機ヒ素が海藻類に含まれていることから、その分布と含有量を把握する必要があるが、アルセノシュガーに対する標準品が入手困難であることから、分析対象のヒジキからアルセノシュガーを抽出し、分析用の標品として精製した。アルセノシュガーは水溶性のヒ素化合物であるが、メタノールに可溶性であることから、乾燥ヒジキを煮熟して熱水で抽出したのち、減圧乾固して固形物を得た。これからメタノールでヒ素化合物を抽出して、減圧濃縮した。このようにして得られたアルセノシュガーと考えられるヒ素化合物は HPLC -

ICPMS において保持時間 600 秒に分画された(Figure 7)。

考察

ヒジキやアカモクなどのホンダワラ科海藻類は食品の中でも無機ヒ素濃度がもっとも高濃度である²⁾ことから、有害元素であるヒ素の分布や濃度実態、藻類や魚介類における海水からの取り込みや体内での蓄積と濃縮、分解、代謝および排泄の生化学的メカニズムを解明する必要がある。また、海洋における無機ヒ素および有機ヒ素の循環過程を知り、それぞれのヒ素化合物の生理的・生態学的意義および地球上でのそれらの進化の過程を明らかにする必要がある。本研究は、海藻類のヒ素化合物のうち、主要なヒ素化合物であるアルセノシュガーの重要性に着目した。すなわち、藻類やその加工品における含有実態や代謝過程、毒性などが十分研究されていないことから、海藻類からアルセノシュガーを抽出・精製し、その分析法を他のヒ素化合物と併せて開発した。

海藻類のヒ素分析は ICP-MS で分析のほかにも水素発生・原子吸光光度法や蛍光 X 分析などが利用される⁴⁵⁾。欧州では水素発生・原子吸光光度法が海産物中の無機ヒ素の標準的な手法として採用されている⁴⁵⁾。本実験では生物や食品試料のヒ素分析に高感度かつダイナミックレンジが広い HPLC-ICP-MS 分析法を採用して、無機および有機ヒ素化合物の分子種分析を行った⁴⁵⁾。

海藻類の有機ヒ素の分析はその主要な化学形態はアルセノシュガーであり、これまでにジメチル態 13 種および第四級アルソニオ化合物 4 種の計 17 種が報

告されている⁴⁶⁾。Francesconi と Edmonds は、褐藻類、紅藻類および緑藻類に存在するこれらのアルセノシュガーを比較し、分布特異性を調べた⁴⁶⁾。その結果、紅藻類および緑藻類ではグリセロールあるいはリン酸ジエステルをアグリコンとして有するアルセノシュガーが主であり、スルホン酸あるいはスルホン酸エステルアグリコンとして有するアルセノシュガーは微量であったが、褐藻類では属間にアルセノシュガー分布に差異のあることを指摘した。またさらには、アルセノシュガーは分類学的に重要であること、および海洋食物連鎖の高度に特異的なトレーサーとして利用し得ることも指摘した⁴⁶⁾。

成川らは、ヒジキの水溶性抽出物を測定しており、アルセノシュガーを逆相 HPLC で何種類のヒ素化合物を分画した⁴⁷⁾。今回の実験で得られたアルセノシュガーは分画時間が 600 秒であったことから、成川らが同定した Sugar-328 ではないかと考えられる。

コンブの有機ヒ素化合物の分析では、3 種類のアルセノシュガー (As⁻sug-1, As⁻sug-3, As⁻sug-4) が含まれており (Figure 8), これらの 3 種類のアルセノシュガーは生長に伴って連続的に変化していることが明らかになった⁴²⁾。総ヒ素濃度は仮根で最も高く、先端に行くにつれて濃度が 63~80% 低下すること、ヒ素化合物の濃度はほとんどがこれら 3 種類のアルセノシュガーであるこ

とが明らかにされた⁴⁸⁾。本研究で精製されたアルセノシュガーは逆相 HPLC によって分離されたことから、コンブで検出されたものと同ーまたは類縁の化合物であると考えられる。このことからアルセノシュガーの構造を質量分析などで決定するとともに、無機ヒ素と比較して毒性試験を行うことが今後の課題である。

ヒジキは煮熟することによって無機ヒ素は水中に溶出し、無機ヒ素の除去効果があることが報告されている³⁾。ヒ酸、アルセノ糖、ジメチルアルシン酸などのヒ素化合物が含まれている⁴⁹⁾。日本国内では食品衛生法において食品中のヒ素の基準値が設定されており、農産物では残留農薬基準値として、もも、なつみかん、いちご、ばれいしょ、きゅうり、トマト、ほうれんそうで1.0 mg/kgが設定され、ミネラルウォーターで0.56 mg/L以下と規制されている²⁴⁾。畜産物やヒジキを含む水産物では基準値が定められていない²⁴⁾。英国食品規格庁 (FSA)は、2004年、発がん性のある無機ヒ素の含有量が高いという調査結果を受けて、ヒジキを食べないように勧告した¹⁶⁾。FSAが調査した結果、乾燥品を水戻ししたヒジキ中の無機ヒ素は最大で22.7 mg/kgであった。また、農林水産省の有害化学物質含有実態調査によると、乾燥ヒジキ299検体の総ヒ素含量は平均値93 mg/kg (最大値160 mg/kg, 最小値28 mg/kg) , 無機ヒ素含量は平均値67 mg/kg (最大値130 mg/kg, 最小値4.5 mg/kg) であった¹⁷⁾。花岡らはアカ

モク市販品の総ヒ素濃度は $270 \pm 11 \mu\text{g/g}$ 、無機ヒ素濃度は約50%を占めると報告した¹⁸⁾。山下は、ヒ酸を除去した乾燥ヒジキ加工品を製造するため、原藻を海水塩を含む塩水で煮熟する方法を開発した³⁾。製造した試作品を水戻し後、ヒ素含量を測定することによって、海水または希釈海水による煮熟工程によるヒ酸の除去効果を確認した³⁾。カルシウムまたはマグネシウムなどのにがり成分を含む塩水を用いて煮熟する方法がヒ素の除去に有用であったことが報告された³⁾。煮熟を4回繰り返す方法で製造した乾燥ヒジキ試作品は、ヒ酸含量が $0.5\text{-}0.7 \mu\text{g/g}$ 、水戻し後は、ヒ酸分析の検出限界 $0.3 \mu\text{g/g}$ 以下であった³⁾。この試作品には $8.6 \mu\text{g/g}$ の総ヒ素が含まれていたが、毒性の低い高分子のアルセノ糖が残存していた³⁾。生のヒジキまたは素干のヒジキ原藻を水に浸漬することによってヒ素を軽減したひじき製造法が提案されたが、乾燥ヒジキ加工品の無機ヒ素の含量は 18 mg/kg であり、この製造方法ではまだ相当量の無機ヒ素が残存していた⁵⁰⁾。松本の論文ではアカモクの水道水または1%塩水での煮熟試験で無機ヒ素の含有量が 0.5 ppm 以下まで低下した³⁸⁾。本研究で分析した試料はこれら無機ヒ素の除去法によって試作した加工品であることから、検出された有機ヒ素は、アルセノシュガーが主要なヒ素化合物であると考えられる。これらの分析から、無機ヒ素除去法で処理すると無機ヒ素が除去されてアルセノシュガーが海藻に含まれることが考えられた。

海藻の部位によっても無機ヒ素やアルセノシュガーの分布が異なることが知られている。ヒジキおよびアカモクの表皮を剥がして、ヒ素濃度を測定したところ、髄層よりも多くのヒ素が検出された。このことから、表皮に含まれるヒ素化合物が、煮熟によって、表皮に局在している無機ヒ素およびアルセノシュガーが溶出することが推定された。一方、ヒジキ市販品の総ヒ素濃度はヒジキと芽ヒジキの間や産地に大きな濃度差がみとめられた。これまで報告されているヒジキの総ヒ素濃度は12.0~182.6 mg/kgであり、とくに突出してヒ素濃度が高濃度のものは、良好な生育環境によって無機ヒ素の蓄積レベルが高いことが考えられた。

ヒジキの加工法においてボイル時に鉄鍋とステンレス鍋を用いることでボイル後の鉄の含有量が違うことが報告されている⁵¹⁾。日本人の食事摂取基準によると、成人で一日に必要な鉄分は6.0~9.0 mg/日、亜鉛は6~8mg/日であり⁵²⁾、ヒジキは必須な微量元素である鉄や亜鉛の供給源として重要である。本研究はヒ素と同時に多元素分析が可能であった。その分析結果はヒジキ市販品の鉄濃度は172~1502 mg/kg、亜鉛濃度は9.2~20.8 mg/kgであった。食品成分表に記載の鉄の濃度は550 mg/kgであった²⁵⁾。

ヒジキと同様にアカモクには、高濃度のアルセノシュガーが含まれることが明らかとなり、ボイルを行うことで無機ヒ素が低減されることがわかった。

ヒジキおよびアカモクの表皮を剥がして、ヒ素濃度を測定したところ、髄層よりも多くのヒ素が検出されたことから、海水から取り込まれた無機ヒ素は、表皮において細胞内に取り込まれ、代謝されたのち、無機ヒ素やアルセノシュガーとして細胞外に排出されて、多糖などの細胞壁部分に濃縮して蓄積されることが考えられた。これらのことから、細胞内への無機ヒ素の取り込みと代謝、細胞外への排出の過程にアルセノシュガーの生合成経路が関与することが考えられた。このような海藻類におけるヒ素代謝の経路を明らかにし、ヒ素の取り込み、代謝および蓄積経路を遮断する技術を開発することによって、ヒ素を含有しない、あるいは無毒化するような新品種を育成する技術開発が考えられる。また、海藻の加工段階では、熱水でこれらのヒ素化合物が溶出されることから、原藻を煮熟する技術は有用であるが、とくに水溶性のヒ素化合物は表皮組織に局在することが判明したことから、短時間に大量の熱水で処理することによって効率良くヒ素を除去することが可能であると考えられた。このことはヒジキやアカモクなどの加工品の新規の製造技術として活用できると考えられる。

ヒジキではヒ素同様に鉄や亜鉛でも髄層よりも表皮に高濃度で検出されたため、主な微量元素は髄層ではなく表皮に蓄積すると考えられる。

アルセノシュガーの毒性や解毒機構を明らかにするため、大量のアルセノシュガーを精製する必要があるが、本研究の手法に従って、十分量の原料を煮熟加

工することによって抽出することが可能である。大量に精製することに試薬レベルの高純度品を製造する技術を開発する必要がある。それにより、アルセノシュガーによる発がんリスクが生じるかという、慢性の生物影響を動物試験によって解析することが可能であると考えられる。貝瀬らは、海洋動物に含まれる各ヒ素化合物の LD50 を測定した⁴⁶⁾。マウスに As(III), モノメチルアルソン酸 [MMA(V)], ジメチルアルシン酸 [DMA(V)], トリメチルアルシンオキシド (TMAO) を経口投与した場合の LD50 値は、それぞれ 34.5 mg/kg, 1,800 mg/kg, 1,200 mg/kg および 10,600 mg/kg である⁴⁶⁾。魚介類に含まれる最も顕著なヒ素化合物であるアルセノベタイン(AB)の LD50 が 10,000 mg/kg を超え、実質的に無毒である⁴⁶⁾。これらのデータは、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) による「食品中の特定汚染物質の安全性評価」に引用され、JECFA は、As(III) > As(V) > MMA(V) > DMA(V) として相対的なヒ素毒性を報告している⁷⁾。さらに貝瀬らはアルセノシュガーの細胞毒性は、亜ヒ酸ナトリウムの毒性の 1/2800、ヒ酸ナトリウムの 1/300 であると報告している⁸⁾。アルセノシュガー含有量が高い海藻を常食とするヒツジの尿中および血中の主な代謝物は DMA(V) であった⁵³⁾。マウス盲腸細菌叢および盲腸組織を用いてアルセノシュガーの生体内変換について調べたところ、細菌叢を加えた反応混合液では 95% のアルセノシュガーがチオ体に変換されたが、盲腸組織ではチオ体への変換率は低かつ

た⁵⁴⁾。アルセノシュガーを摂取したヒトの尿中代謝物として、DMA(V)、チオ-DMA(V)、チオ-ジメチルアルセノエタノール、チオ-アルセノシュガーなどが検出された。これらの尿中ヒ素代謝物はDMA(V)を除いて高濃度曝露（10 mM）においても細胞毒性は認められなかった⁵⁵⁾。アルセノシュガーの急性毒性試験は、細胞死を誘導するとともに、ジメチル態、モノメチル態への分解が予想されることから、ヒ素化合物の分子種分析とマウスやゼブラフィッシュ、培養細胞などを用いるバイオアッセイを行い⁸⁾、アルセノシュガーの二次代謝物としてMMA(V)、DMA(V)などを測定する必要性がある。

また、ヒ素の発がん性のメカニズムとして血液中の3価のヒ素がメチル化されたMMA(V)、MMA(III)、DMA(V)、DMA(III)が生成され、これらの過程で活性酸素が生じて、酸化ストレスを誘発するとともに、ジメチルアルシンと分子状酸素からヒ素ラジカルが生じて発がんが誘発されることが推定される¹⁰⁾。このような発がんメカニズムを研究する上では精製されたアルセノシュガーを用いて変異原性試験を行う必要がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり,ご指導をいただいた山下倫明教授に感謝する。

参考文献

- (1) 農林水産省(日本). 「食品中のヒ素に関する基礎情報」.
https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/basic.html#1
- (2) 神和夫. 北海道産海藻中のヒ素濃度 総ヒ素濃度の定量ならびに三価, 五価無機ヒ素, モノメチルヒ素, およびジメチルヒ素の分別定量. 道衛研究所所報, 1983, 33, p. 26-27.
- (3) 山下由美子. 無機ヒ素を除去した乾燥ヒジキ加工法の製造法. 日本水産学会誌. 2014, 80(6), p. 973-978.
- (4) Kaise, T., Watanabe, S., and Itoh, K. The acute toxicity of arsenobetaine. *Chemosphere*. 1985, 14, p. 1327-1332.
- (5) Kaise, T., Yamaguchi, H., Horiguchi, Y., Tani, T., Watanabe, S., Hirayama, T., Fukui, S. A comparative study on acute toxicity of methylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide in mice. *Appl. Organomet. Chem.* 1989, 3, p. 273-277.
- (6) Kaise, T., Fukui, S. The chemical form and acute toxicity of arsenic compounds in marine organisms. *Appl. Organomet. Chem.* 1992, 6, p. 155-160.
- (7) Safety evaluation of certain contaminants in food(Seventy-second

meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), p.
155-288

(8) 貝瀬利一, 海藻中に含まれる有機ヒ素化合物・アルセノ糖の培養細胞を用いた毒性学的研究, 食品衛生学雑誌, 1996, 37(3), P.135-141.

(9) 衛生分析法. 日本薬学会編. 金原出版株式会社. 2010, p. 428-431

(10) 内閣府食品安全委員会, 「食品中のヒ素」, URL

<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya2009031900k>.

(11) Sawada, N., Iwasaki, M., Inoue, M., Takechi, R., Sasaki, S., Yamaji, T., Shimazu, T., Tsugane, S. Dietary arsenic intake and subsequent risk of cancer :the Japan Public Health Center based Prospective Study. 2013, 24, p. 1403-1415.

(12) 福井昭三, 平山晃久, 野原基司, 阪上嘉彦. 数種の海産食品中のヒ素の存在形態とそれら食品摂取後の尿中ヒ素代謝物について. 食品衛生学雑誌. 1981, 22(6), p. 513-519.

(13) 塩見一雄. 海産生物に含まれるヒ素の化学形・毒性・代謝. 食品衛生学雑誌. 1992, 33(1), p. 1-10.

(14) 品川明, 塩見一雄, 山中英明, 菊池武昭. 海産生物における無機態ヒ素(III), (V)および有機態ヒ素の分別定量. 食品衛生学雑誌. 1983, 49(1), p. 75-78.

(15) 小林隆輔, 塩見一雄, 山中英明, 菊池武昭. 数種の魚種におけるヒ素の存在状態. 日本水産学会誌. 1980, 46(10), p. 1265-1268.

(16) Food Standard Agency (英国). 「Agency advises against eating hijiki seaweed.」.

<http://www.food.gov.uk/news/pressreleases/2004/jul/hijiki>

(17) 農林水産省. 「食品に含まれるヒ素の実態調査」. URL

https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_as/occurrence.html

(18) 花岡研一, 宮本真至, 臼井将勝. アカモクに含まれるヒ素濃度に及ぼす熱湯処理の影響. 水産大学校研究報告. 2012, 61(1), p. 23-26.

(19) Codex. General standard for contaminants and toxins in food and feed CODEX STAN. 1995, 193.

(20) EU. Commission regulation No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.

(21) National Standard of the People's Republic of China(GB2762-2012)

(22) Food Standard Australia New Zealand.

(23) WHO. 飲料水水質ガイドライン. URL

https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/who_gdwq_japanese_4thed.pdf

(24)厚生労働省. 「食品中の残留農薬等」. URL

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/index.html

(25)香川芳子. 食品成分表 2015. 女子栄養大学出版部. 2015, p. 118-119.

(26) Narukawa, T., Inagaki, K., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Narusjima, I., Chiba, K., Hioki, A. Preparation and certification of hijiki reference material, NMIJ-CRM 7405-a, from the edible marine algae hijiki. *Anal. Biochem. Chem.* 2012, 402, p. 1713-1722.

(27) Leufroy, A., Noel, L., Dufailly, V., Beauchemin, D., Guerin, T. Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data. *Talanta.* 2011, 83, p. 770-779.

(28) Foster, S., Maher, W., Krikowa, F., Apte, S. A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues. *Talanta.* 2007, 71, p. 537-549.

(29) Petursdottir, A. H., Gunnlaugsdottir, H., Raab, A., Krupp, E. M., Feldman, J. Determination of inorganic arsenic in seafood: Emphasizing the need for

certified reference materials. *Pure Appl. Chem.* 2012, 84(2), p. 191-202.

(30) Sanz, E., Murioz-Olivias, R., Camara, C. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1097, p. 1-8.

(31) Reyes, L. H., Guzman Mar, J. L., Mizanur Rahman, G. M., Seybert, B. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta.* 2009, 78, p. 983-990.

(32) Ciardullo, S., Aureli, F., rggi, A., Cubadda, F. Arsenic speciation in freshwater fish on extraction and mass balance. *Talanta.* 2010, 81, p. 213-221.

(33) Taylor, V. F., Jackson, B. P. Concentration and speciation of arsenic in New England seaweed species harvested for food and agriculture. *Chemosphere.* 2016, 163, p. 6-13.

(34) Pell, A., Kokkins, G., Malea, P., Pergantis, S. A., Rubio, R., Lopez-Sanchez, J. F. Gulf

(35) Jia, Y., Wang, L., Ma, L., Yang, L. Speciation analysis of six arsenic species in marketed shellfish: Extraction optimization and health risk assessment. *Food, Chem.* 2018, 244, p. 311-316

- (36) Petursdottir, A.H., Gunnlaugsdotir, H., Krupp, E. M., Feldman, J. Inorganic arsenic in seafood: does the extraction method matter? *Food Chem.* 2014, 150, p. 353-359.
- (37) Zmozinski, A.V., Llorente-Mirandes, T., Lopez-Sanchez, J. F., da Silva, M. M. Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. *Food Chem.* 2015, 173, p. 1073-1082.
- (38) Tanibuchi-Matsumoto, E. Studies on the analytical method of arsenic compounds in food. 東京海洋大学博士学位論文. 2018, 495.
- (39) 成川千弘, 黒岩貴芳, 千葉光一. 原子スペクトル分析におけるヒ素化合物の化学形態に依存する分析感度差. 2009, 58(4), p.185-195.
- (40) 長岡(浜野)恵, 花岡研一, 臼井将勝, 西村勉, 米谷民雄. ヒジキ中の無機ヒ素を正確に抽出・定量するための硝酸を用いた産部分分解法の検討および水戻しヒジキへの応用. *食品衛生学雑誌.* 2008, 49(2), p.88-94.
- (41) Narukawa, T., Inagaki, K., Hioki, A., Chiba, K. Aqueous Extraction of Water-soluble Inorganic Arsenic in Marine Algae for Speciation Analysis. *Anal. Sci.* 2012, 28, p. 773-779.
- (42) Shibata, Y., Morita, M., Edmonds, S. J. Purification and identification of arsenic-containing ribofuranosides from the edible brown seaweed,

Laminaria japonica(MAKONBU). Agric. Biol. Chem.,1987, 51(2), p. 391-398.

(43) Jin, K., Shibata, Y., Morita, M. Isolation and identification of arsenic-containing ribofuranosides from the edible brown seaweed, *Sphaerotrichia divaricate*(ISHIMOZUKU). Agric. Biol. Chem. 1988, 52, p. 1965-1971.

(44) Jin, K., Hayashi, T., Shibata, Y., Morita, M. Arsenic-containing ribofuranosides and dimethylarsenic acid in green seaweed, *Codium fragile*(MIRU). Appl. Organomet. Chem. 1988, 2, p. 365-369.

(45)食品安全委員会. 「化学物質・汚染物質評価書 食品中のヒ素」. 2013. URL <https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya2009031900k&fileId=503>

(46)Francesconi, K, A., Edmonds, J, S. Arsenic and marine organism. Adv Inorg Chem. 1997, 44, p. 147-189.

(47) Narukawa, T., Raber, G., Itoh, N., Inagaki, K. A new candidate reference material for inorganic arsenic and arsenosugar in Hijiki seaweeds: First results from an inter-laboratory study. Anal Sci. 2020, 36, p. 233-239.

(48) 神和夫, 佐藤千鶴子, 加藤聡, 西沢信. ミツイシコンブ及びコンブ仮根加工食品素材中のヒ素の化学形態. 道衛研所報. 2012, 62, p. 21-25.

- (49) Hanaoka K, Yoshida K, Tamano M, Kuroiwa T, Kaise T, Maeda S. Arsenic in the prepared edible brown alga, *Hizikia fusiforme*. Appl. Organometal. Chem. 2001, 15, p. 561–565.
- (50) 北村裕司. ヒ素を軽減したひじきの製造方法. 特開 2007-295911, 2007.
- (51) 松本義信, 津崎智之, 奥和之, 小野章史. ひじき加工時の加熱時間の違いによる鉄含有量の変化. 川崎医療福祉学会誌, 2017, Vol. 27, No. 1, p. 147–152.
- (52) 厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準 2015 年版」. URL <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000041955.pdf>
- (53) Feldmann J, John K, Pengprecha P. Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland. Fresenius J Anal Chem. 2000, 68(1), p. 116-121.
- (54) Conklin SD, Ackerman AH, Fricke MW, Creed PA, Creed JT, Kohan MC, Herbin-Davis K, Thomas DJ. In vitro biotransformation of an arsenosugar by mouse anaerobic cecal microflora and cecal tissue as examined using IC-ICP-MS and LC-ESI-MS/MS. Analyst. 2006, 131(5), p. 648-655.

(55) Raml R, Goessler W, Traar P, Ochi T, Francesconi KA. Novel thioarsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar, 2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl-beta-D-ribose. *Chem Res Toxicol.* 2005, 18(9), p. 1444-1450.

Table 1. ICP-MS conditions

RF power	1.6kW
Plasma gas flow rate	Ar 15 L/min
Carrier gas flow rate	Ar 0.7 L/min
Monitoring ion	m/z 75
Dwell time	0.5 s

Table 2. HPLC-ICP-MS conditions

HPLC conditions

Column CAPCELL PAK C₁₈MG, 4.6 mm i.d. × 250 mm, particle size 5 μm (Osaka Soda Co., Ltd)

Mobile phase 10 mM sodium 1-butanedisulfonate, 4 mM malonic acid, 4 mM tetramethylammonium hydroxide, 0.05 % methanol, pH adjusted with HNO₃.

Flow rate 0.5 ml/min

Injection volume 20 μL

Column temperature Room temperature, 20-30°C

ICP-MS conditions

RF power 1.6 kW

Plasma gas flow rate Ar 15 L/min

Carrier gas flow rate Ar 0.7 L/min

Monitoring ion m/z 75

Dwell time 0.5 s

Table 3. Separation of arsenosugar from dried Hijiki

Column	Xselect CSH Fluoro-Phenyl OBD Prep Column, 130Å, 5µm, 19 mm×50 mm, 1/pk, (Nihon Waters K.K.)
Mobile phase	0.1 % acetic acid/methanol gradient (0-5 min: 0%, 5-25 min: 0-80 %)-
Flow rate	2 ml/min
Injection volume	5µl

Table4. Trueness of CRM measured value

Total arsenic concentration(mg/kg)	Certified value(mg/kg)
Mean	Mean
37.1 ± 1.1	35.8 ± 0.9
Trueness(%)	
103.5	

Table 5. Total arsenic concentration of the seaweed products

Product	Location	Total arsenic conc. (mg/kg dry matter)
<i>"Hijiki" Sargassum fusiforme</i>		
Hijiki	Yamaguchi Pref.	31.9 ± 0.1
Hijiki	Yamaguchi Pref.	31.9 ± 1.5
Hijiki	Yamaguchi Pref.	47.1 ± 6.6
Hijiki	Ehime Pref.	80.3 ± 1.3
Mehijiki	Yamaguchi Pref.	107.5 ± 3.0
Mehijiki	Yamaguchi Pref.	61.5 ± 0.2
Mehijiki	Ehime Pref.	45.4 ± 1.8
Mehijiki	Mie Pref.	82.3 ± 0.2
Mehijiki	China	36.4 ± 0.4
<i>"Akamoku" Sargassum horneri</i>		
	Ehime Pref.	231.1 ± 21.7
<i>"Arame" Eisenia bicyclis</i>		
	Japan	111.5 ± 3.4
	Mie Pref.	23.9 ± .12
	Mie Pref.	24.4 ± 0.2
<i>"Wakame" Undaria pinnatifada</i>		
	Japan	42.9 ± 1.0
<i>"Egonori" Campylaephora hypnaeoides J.Agardh</i>		
	Japan	5.0 ± 0.2

Table 6. Total iron and zinc concentration of the seaweed products

Product	Location	Total iron conc. (mg/kg dry matter)	Total zinc conc. (mg/kg dry matter)
<i>"Hijiki" Sargassum fusiforme</i>			
Hijiki	Yamaguchi Pref.	460.6 ± 8.6	20.8 ± 0.5
Hijiki	Yamaguchi Pref.	172.2 ± 8.2	19.2 ± 1.6
Hijiki	Yamaguchi Pref.	596.5 ± 21.2	9.2 ± 1.6
Hijiki	Ehime Pref.	563.6 ± 0.6	20.8 ± 0.3
Mehijiki	Yamaguchi Pref.	303.8 ± 160.6	3.4 ± 1.1
Meihijiki	Yamaguchi Pref.	637.1 ± 0.2	0.0
Mehijiki	Ehime Pref.	1502.4 ± 89.1	15.7 ± 0.8
Mehijiki	Mie Pref.	596.3 ± 10.6	1.0 ± 0.4
Mehijiki	China	628.5 ± 0.9	0.0
<i>"Akamoku" Sargassum horneri</i>			
	Ehime Pref.	723.0 ± 50.0	10.9 ± 0.5
<i>"Arame" Eisenia bicyclis</i>			
	Japan	104.9 ± 8.1	31.1 ± 1.4
	Mie Pref.	59.6 ± 3.7	21.3 ± 1.8
	Mie Pref.	43.4 ± 2.5	17.8 ± 0.1
<i>"Wakame" Undaria pinnatifada</i>			
	Japan	84.4 ± 2.8	40.9 ± 3.0
<i>"Egonori" Campylaephora hypnaeoides J. Agardh</i>			
	Japan	221.1 ± 9.1	18.2 ± 0.8

Table7. Total arsenic concentration of the seaweed samples

Samples	Total arsenic conc.(mg/kg dry matter)
<i>"Hijiki" Sargassum fusiforme</i>	
Raw hijiki	80.6 ± 9.0
Boiled hijiki	19.3 ± 1.5
<i>"Akamoku" Sargassum horneri</i>	
Frozen akamoku-1	197.1 ± 4.3
Frozen akamoku-2	275.0 ± 12.6

Table8. Total arsenic concentration of seaweed's epidermis and medulla layers

Sample	Total arsenic conc. (mg/kg dry matter)
<i>"Hijiki" Sargassum fujiforme</i> (n=3)	
Epidermis	81.0±9.6
Medulla layer	18.7±4.2
<i>"Akamoku" Sargassum horneri</i> (n=1)	
Epidermis	83.5±0.9
Medulla layer	47.1±6.6

Table9. Total iron and zinc concentration of seaweed's epidermis and medulla layers

Sample	Total iron conc. (mg/kg dry matter)	Total zinc conc. (mg/kg dry matter)
<i>"Hijiki" Sargassum fujiforme</i> (n=3)		
Epidermis	556.2±234.6	53.5±19.5
Medulla layer	42.6±114.0	15.7±7.1

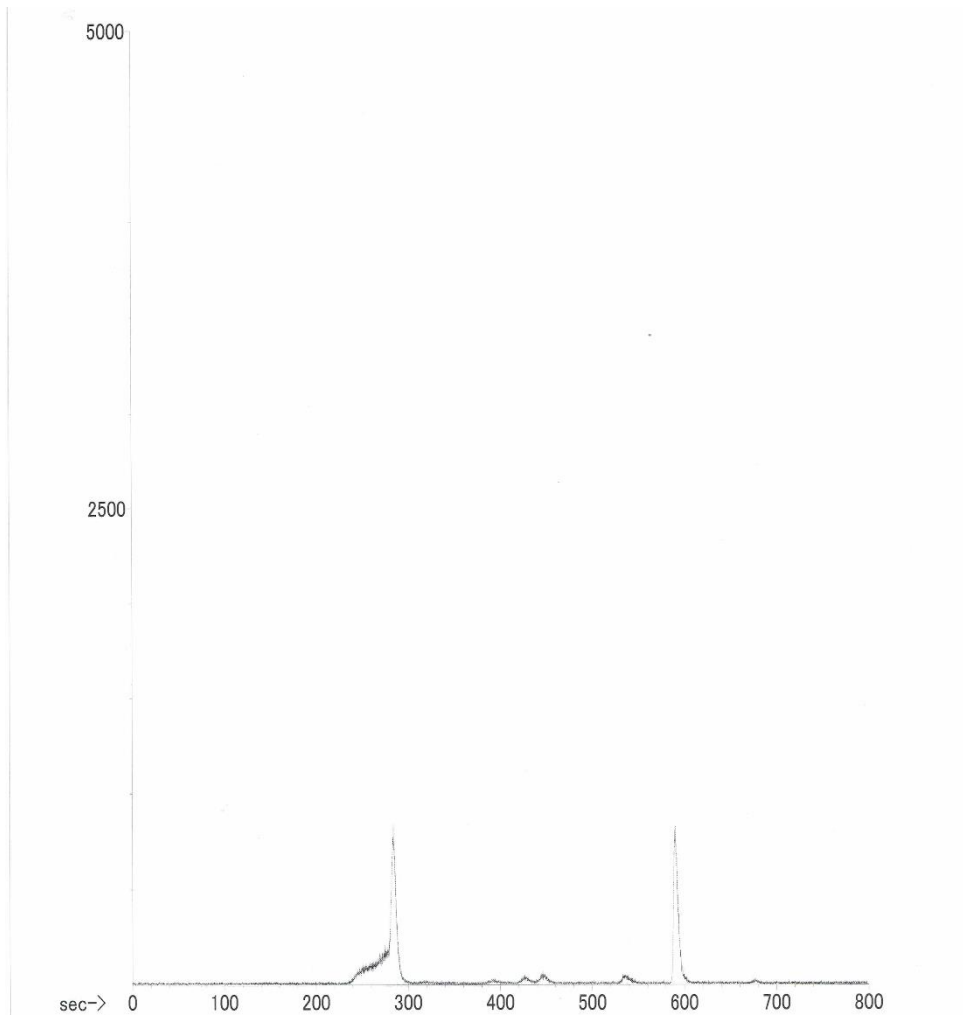


Figure 1. Chromatogram of boiled extraction of raw hijiki sample.

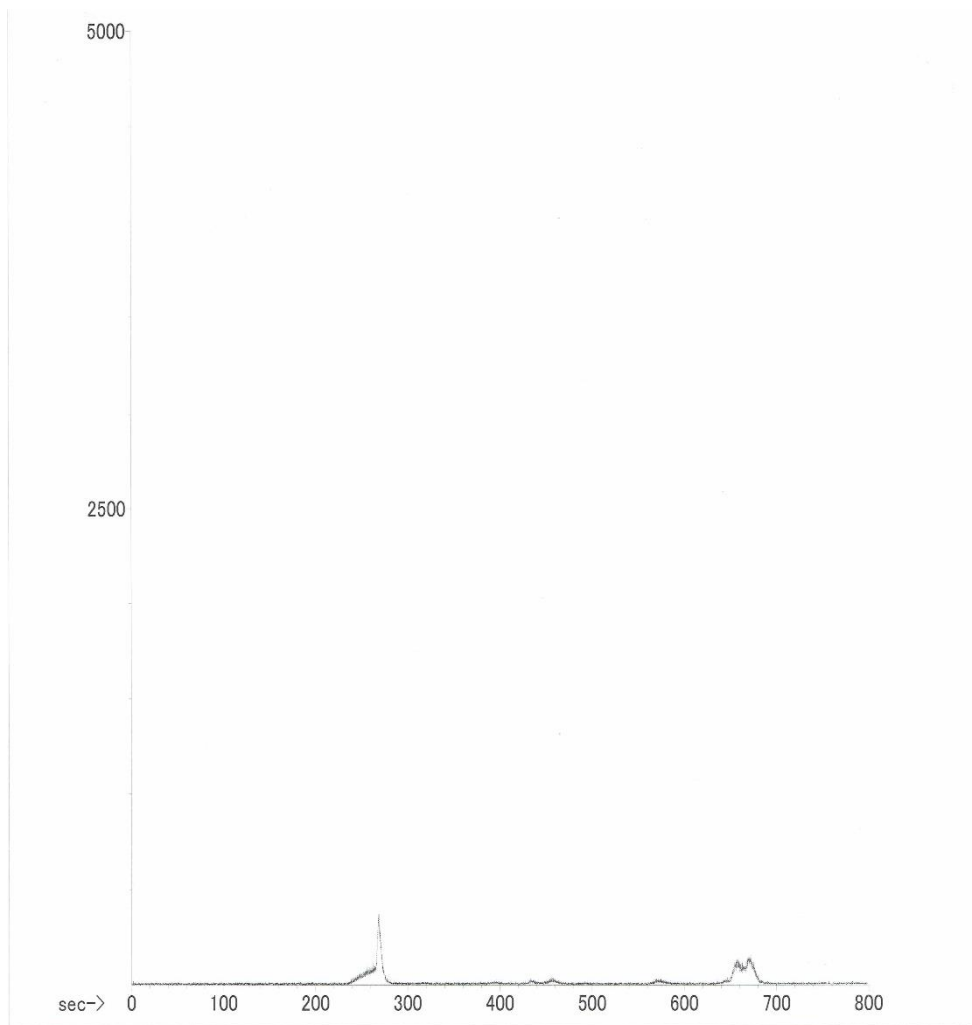


Figure 2. Chromatogram of water extraction of raw hijiki sample.

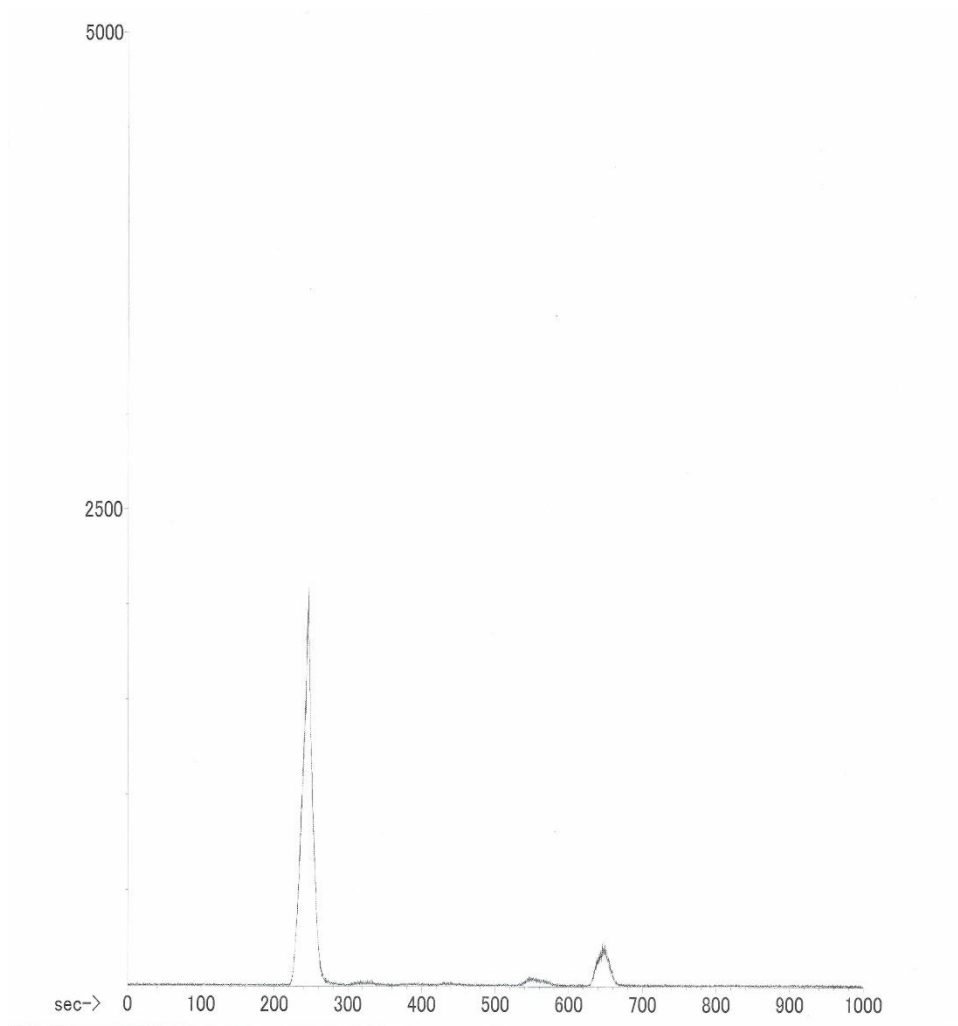


Figure 3. Chromatogram of boiled extraction of raw akamoku sample.

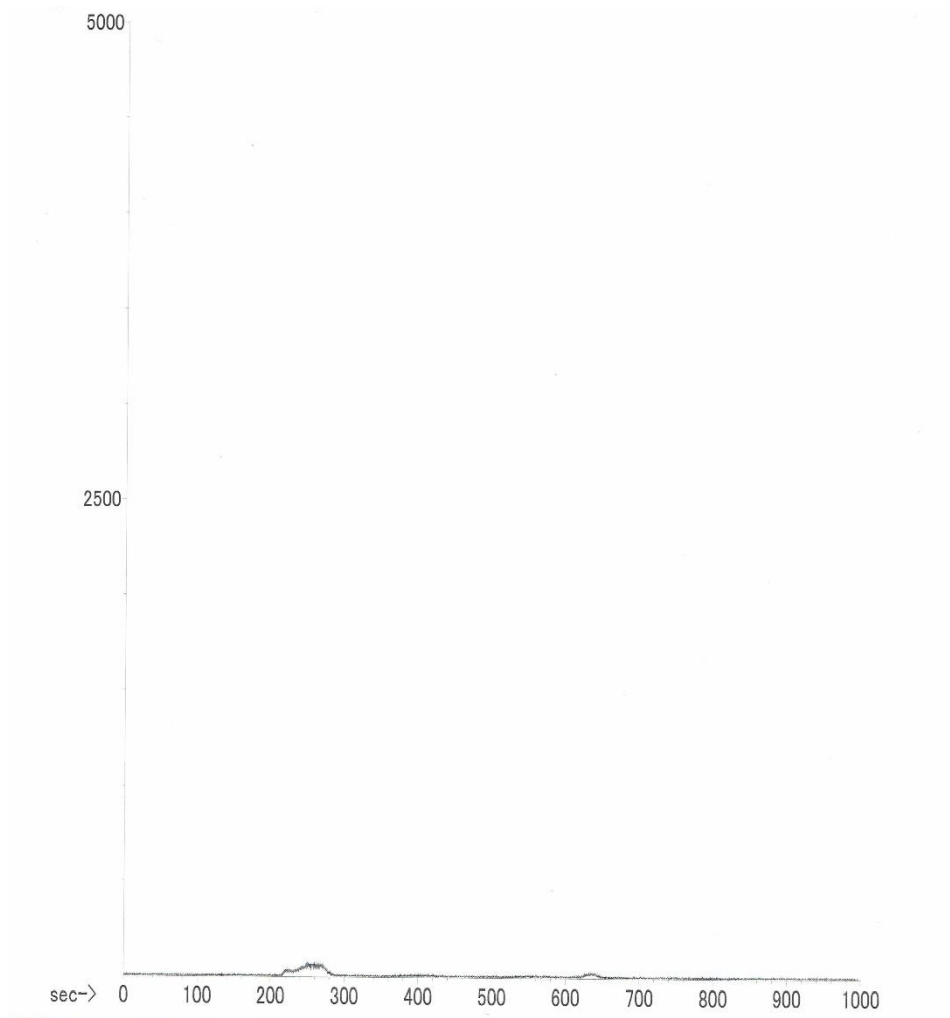


Figure 4. Chromatogram of boiled extraction of boiled akamoku sample.

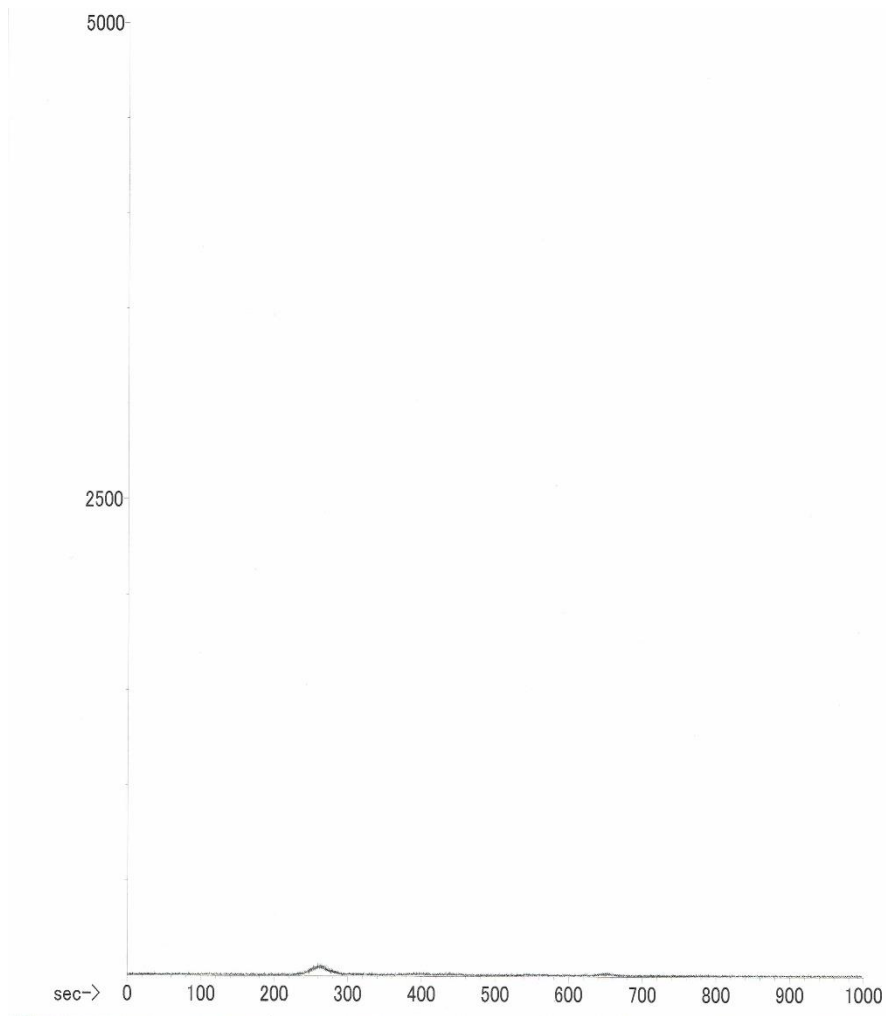


Figure 5. Chromatogram of extraction of wakame product.

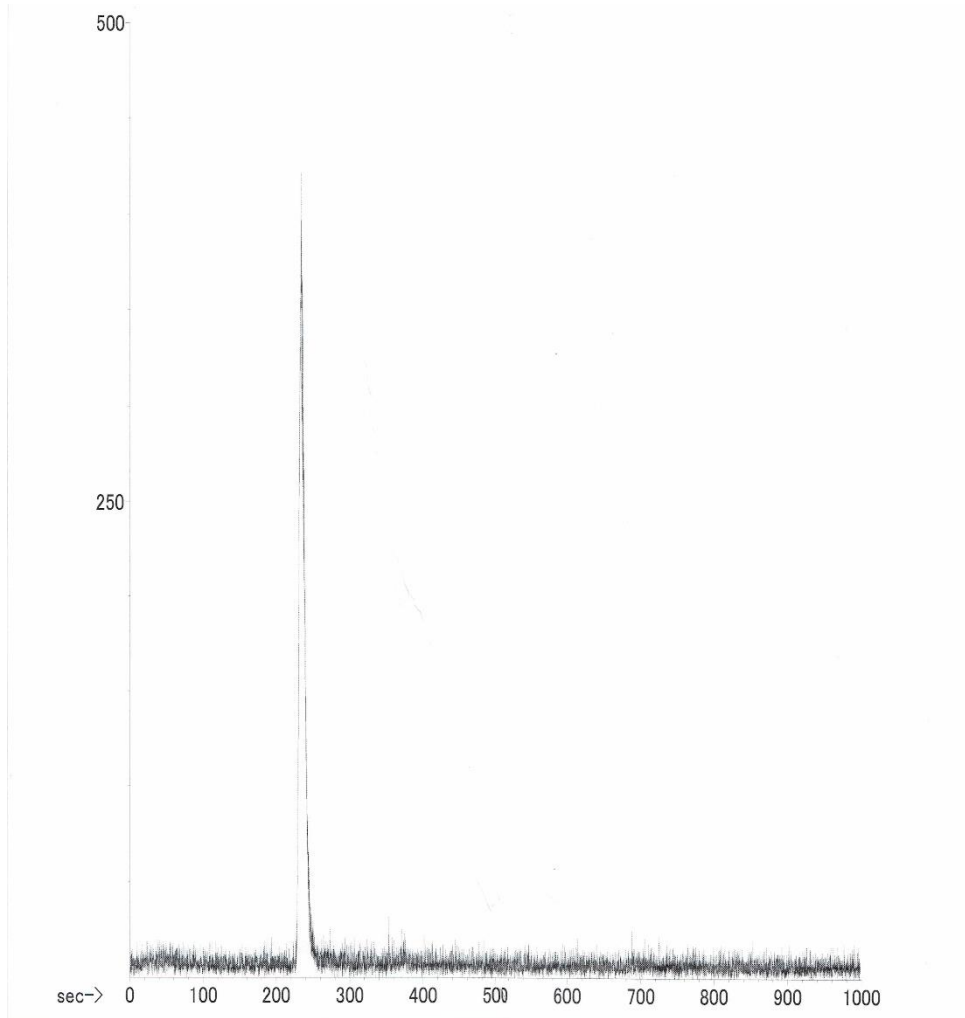


Figure 6. Chromatogram of arsenate(V) solution.

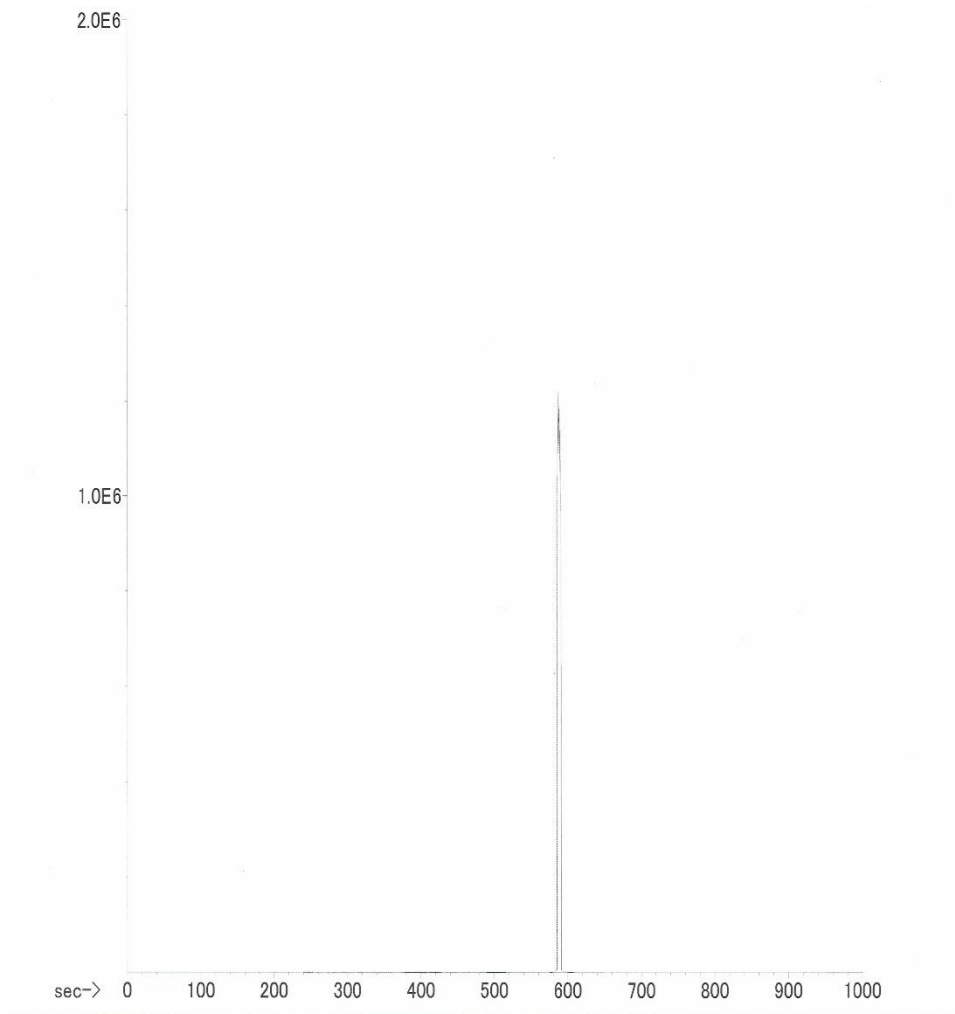
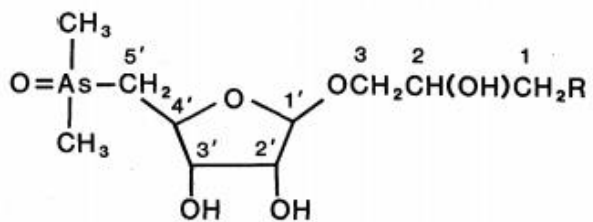


Figure 7. Chromatogram of arsenosugar.



1a: R=OH

1b: R=O⁻_{1''} _{2''} _{3''}
 $\begin{matrix} \text{O}^- & 1'' & 2'' & 3'' \\ | & | & | & | \\ \text{O} & \text{O} & \text{O} & \text{O} \\ | & | & | & | \\ \text{O} & \text{O} & \text{O} & \text{O} \end{matrix}$
 OCH₂CH(OH)CH₂OH

1c: R=SO₃⁻

Figure 8. Chemical structural formula of arsenosugar⁵⁵.