

メタロミクス研究への応用展開を目的とした  
有害金属測定法の開発

下田 康代

2014

## 目次

	頁
目的	1
本論	
第 1 章 HPLC-ICP-MS 法と HPLC-tandem MS 法を併用したヒ素化合物の形態別 分析法の開発	3
1-1. はじめに	3
1-2. 試薬および実験方法	6
1-2-1. 試薬	6
1-2-2. ヒジキ試料	6
1-2-3. ヒジキ試料の処理	7
1-2-4. アルセノシュガーの検出および同定	8
1-2-5. HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の定量	9
1-2-6. 総ヒ素濃度の測定	10
1-3. 結果	12
1-3-1. HPLC -tandem MS によるアルセノシュガーの検出	12
1-3-2. HPLC-ICP-MS法によるヒ素化合物の定量	14
1-3-3. ヒジキ中総ヒ素濃度に対する水抽出ヒ素化合物の割合	18
1-4. 考察	20

第 2 章 OCC-ICP-MS 法を用いた尿試料の迅速・高感度カドミウム測定法の確立	
2-1. はじめに	23
2-2. 試薬および実験方法	25
2-2-1. 試薬	25
2-2-2. 尿試料	25
2-2-3. ヘリウムをコリジョンガスとして用いた OCC-ICP-MS 測定	26
2-2-4. 分析手法の妥当性の確認	26
2-2-5. OCC-ICP-MS 法測定における尿試料の固相抽出の有無についての検討	27
2-3. 結果	28
2-3-1. OCC-ICP-MS 法による分析手法の妥当性および再現性の確認	28
2-3-2. OCC-ICP-MS 法における尿試料の固相抽出の有無についての検討	30
2-4. 考察	31
総括	33
引用文献	34
謝辞	40

本文中に用いた略語を以下に示す。

ArCl: argon chloride

As<sup>V</sup>: arsenic acid

AsBe: arsenobetaine

AsSug: arsenosugar

As<sup>III</sup>: arsenious acid

CFIA: Canadian Food Inspection Agency

CID: collision induced dissociation

CPS: count per second

DMA<sup>V</sup>: dimethylarsinic acid

DRC-ICP-MS: dynamic reaction cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ESI: electrospray ionization-mass spectrometry

FSA: Food Standard Agency

HPLC-ICP-MS: high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry

HPLC-tandem MS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICP-QMS: inductively coupled plasma-quadrupole mass spectrometry

JIS: Japanese Industrial Standards

KED: kinetic energy discrimination

LOD: limit of detection

MLOQ: method limit of quantification

MMA<sup>V</sup>: monomethylarsonic acid

MRM: multiple reaction monitoring

ND: not detected

NIST: National Institute of Standard and Technology

OCC-ICP-MS: octapole collision cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry

RSD: relative standard deviation

SD: standard deviation

SF-ICP-MS: sector field- inductively coupled plasma-mass spectrometry

SPE: solid phase extraction

## 【目的】

2003年にヒトゲノムの完全解読宣言がなされてから10年間、オミクスと呼ばれる網羅的研究分野が劇的に発展を遂げている。オミクス研究とは、最先端の分析・計測技術を駆使して研究対象物を網羅的に解析し、得られた情報から生命活動を統合的かつ包括的に解明するものであり、遺伝子レベルではゲノミクスやエピゲノミクス、タンパク質ではプロテオミクス、代謝物ではメタボロミクスなどが挙げられ<sup>[1]</sup>、生体関連の先端科学として世界的に精力的な研究が行われている。

オミクス研究の一つである「メタロミクス」は、生命活動における生体構成元素、特に微量元素元素の機能と役割を包括的に解明することを目的とした新領域分野である<sup>[2]</sup>。生体内の微量元素元素は、遺伝子発現、シグナル伝達および代謝反応に関わるタンパク質・酵素などの多様な生体試料に含まれており、これらの元素の含有量や化学形態を明らかにすることは他のオミクス分野とともに生命現象の解明に貢献するものと考えられている。この分野を発展させるためには微量な試料からの金属元素の同定や多元素一斉解析、あるいは試料中で多様な化学形態を示し存在する元素を解析するための新たな分析技術が求められる。これらの技術は、メタロミクスの立場からの創薬および化学治療の新規開発、また環境科学・健康科学・毒性学などの発展に寄与することが期待されている。

近年、食の欧米化が進んだとは言え、日本では依然として諸外国と比較して米や海産物を中心とした食文化が維持されている。これらの食品のうち、主食である米中に含まれるカドミウムは腎臓障害の誘発物質<sup>[3]</sup>であり、また、ヒジキ、ワカメなどの海産物中に含まれる有機ヒ素化合物の主要な代謝物であるジメチルヒ素化合物はヒトに対して発癌性が疑われる<sup>[4]</sup>ことから、これらの食品を長期に渡り摂取することによる健康影響についての関心が高まっている。

従来、カドミウムおよびヒ素化合物の測定には原子吸光光度法が用いられてき

たが、近年、これらの有害金属濃度の測定においては、より高感度分析が可能である誘導結合プラズマ - 質量分析法(ICP-MS)による分析が中心となりつつある。加えて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を組み合わせた化学形態別分析も、ICP-MS 法を用いることで高感度な分析が可能となった。しかしながら、これらの測定法については、様々な方法が提案されているもののいまだ検討の段階であり、実試料への適用にあたってはいまだ問題点も多い。例えば、尿中のカドミウムを ICP-MS 法で測定する場合においては、ヒトの尿中に含まれる食事由来のモリブデンから生成するモリブデン酸化物による干渉が特に問題となる<sup>[5-7]</sup>。一方、ヒ素化合物においては無機ヒ素 (ヒ酸、亜ヒ酸など)以外にその生体内代謝物であるメチル化ヒ素化合物 (ジメチルアルシン酸など)のほか、海産物中に含まれるアルセノベタイン、アルセノシュガー類(AsSugs、ジメチルヒ素糖化合物)など多様な化合物が存在し、その発癌リスクが化合物により異なることから<sup>[8]</sup>、正確な発癌リスク評価のためには形態別分析が必須であるが、アルセノシュガーおよびその代謝物など、標準物質を得る事が困難な化合物の分析は、これまで行われてきた HPLC-ICP-MS 法に頼る手法では限界がある。

これらのことから、本研究は、メタロミクスへの応用新技術の発展を目的に、カドミウムおよびヒ素化合物の新たな分析法の確立を目指した。具体的には、第 1 章では試料中の無機・有機ヒ素化合物の一斉分析および新規有機ヒ素化合物の同定を可能にする ICP-MS と有機質量分析法である HPLC-tandem MS を併用した分析法の確立、さらに、第 2 章では尿中カドミウム分析法の高感度化と試料処理の高速化を両立した ICP-MS 法の確立を目指し検討を行った。

## 第1章 HPLC-ICP-MS法とHPLC-tandem MS法を併用したヒ素化合物の形態別分析法の開発<sup>[9]</sup>

### 1-1. はじめに

ヒ素は主に経口および吸入経路で曝露され、ヒトに対し皮膚、肺、膀胱など様々な組織、臓器に癌を引き起こすことが報告されている<sup>[4]</sup>。ヒ素はその化学形態により発癌性のリスク評価が異なり、国際癌研究機関 (IARC) より発行された IARC Monograph vol.100C (2012)<sup>[8]</sup> の発癌性分類において、無機ヒ素は“ヒトに対する発癌性が認められる (Group 1) ”、モノメチルアルソン酸およびジメチルアルシン酸は“ヒトに対する発癌性が疑われる (Group 2B) ”、海産物中に含有されるアルセノベタインは“ヒトに対する発癌性が分類できない (Group 3) ”である。海産物を多量に摂取する日本人においては海産物由来の有機ヒ素化合物が分析を複雑困難にしている。このため、ヒ素化合物の発癌リスク評価にあたっては総ヒ素量分析のみでは不十分であり、形態別濃度の分析が必須である。

これまでのヒ素の形態別分析は、ヒトに対する発癌性が認められている無機ヒ素化合物の曝露、特に、飲用水に含まれるヒ素による長期の曝露を受けた場合の尿中代謝物の分析が中心であったが、近年は、食品中に含まれるヒ素化合物の安全性評価に関心が集まっており、食品中のヒ素化合物およびその尿中代謝物の形態別分析が中心になりつつある。これらの化合物には従来測定されてきた無機ヒ素、メチル化ヒ素に加え、標準物質の合成が困難なアルセノシュガー類 (**Fig. 1**) およびその代謝物のほか、未知の化合物も多く存在すると考えられている。これまでの HPLC-ICP-MS 法では構造に関する情報を得ることができず同定が困難である。一方、HPLC-tandem MS 法はヒ素を直接検出することができず、無機ヒ素を検出することができないが、構造情報よりアルセノシュガーをはじめとする有



機ヒ素化合物についての推定および同定を可能とする。

そこで今回、HPLC-ICP-MS 法と HPLC-tandem MS 法の併用により、ヒジキを試料として無機ヒ素および有機ヒ素化合物の同時一斉分析および新規有機ヒ素の検出同定を検討した。

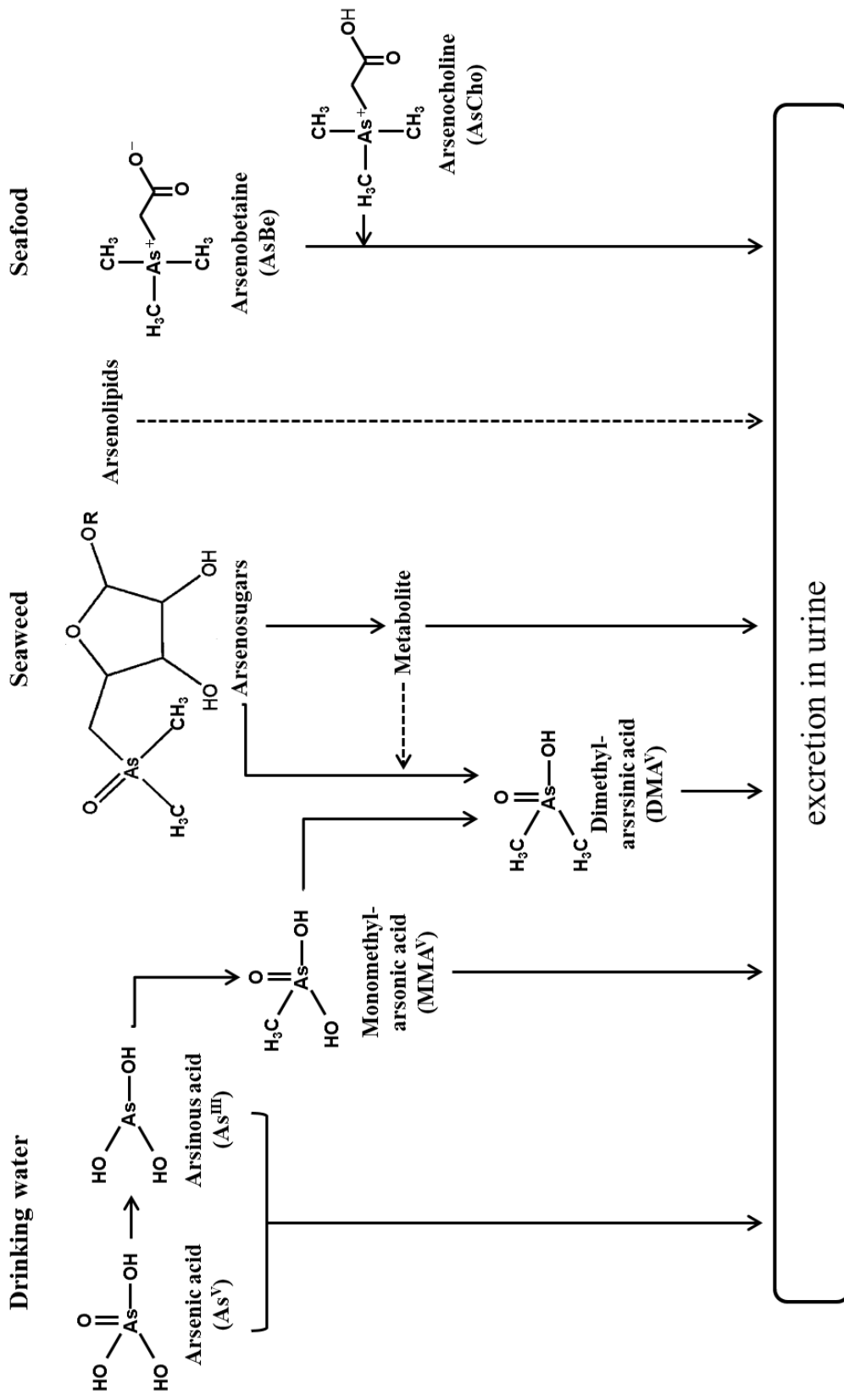


Fig.1 Arsenic compounds from drinking water and food. [10]を元で作成

## 1-2. 試薬および実験方法

### 1-2-1. 試薬

亜ヒ酸ナトリウム、ヒ酸ナトリウム、モノメチルアルソン酸、アルセノベタインは和光純薬（大阪）より購入した。ジメチルアルシン酸はトリケミカル研究所（山梨）より入手した。HPLC-ICP-MS 分析の内部標準物質としてゲルマニウム標準液（関東化学、東京）を用いた。硝酸（TAMAPURE AA-100、68 %、多摩化学、川崎）および硫酸（微量金属分析用、97 %、和光純薬）を試料処理に用いた。炭酸水素アンモニウム（ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ）は和光純薬より購入し、HPLC の移動相に用いた。超純水は Milli-Q Element A-10 with Quantum ICP cartridge（ミリポア、東京）にて調製した。標準物質 CRM No. 18（ヒト尿）は国立環境研究所（茨城）より入手し、分析のバリデーションの確認に用いた。

### 1-2-2. ヒジキ試料

産地、製法の異なるヒジキ製品、および産地の異なるヒジキ原藻を分析試料とした（**Table 1**）。ヒジキ製品は中国製（香港）、韓国製および日本製の計 7 種類、ヒジキ原藻は天津および小湊（いずれも千葉県）で収穫された 2 種類を用いた。原藻は収穫後速やかに真水で洗浄したのち、食品用真空バッグに入れ、分析まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存したものを凍結乾燥してから用いた。

**Table 1** Production districts of hijiki and production systems of their dried-product

	<b>Sample</b>	<b>Production districts</b>	<b>Production Systems <sup>a)</sup></b>
1	me hijiki (sprouts of weed)	China (Hong Kong)	unknown
2	me hijiki (sprouts of weed)	South Korea	boiling system
3	me hijiki (sprouts of weed)	Mie prefecture (Japan)	boiling system
4	naga hijiki (whole of weed)	Oita prefecture (Japan)	closed- steam system
5	me hijiki (sprouts of weed)	Oita prefecture (Japan)	closed- steam system
6	naga hijiki (whole of weed)	Amatsu (Japan)	open-steam system
7	naga hijiki (whole of weed)	Kominato (Japan)	open-steam system
8	raw hijiki (whole of weed)	Amatsu (Japan)	—
9	raw hijiki (whole of weed)	Kominato (Japan)	—

<sup>a)</sup> Their production systems were printed in their package.

### 1-2-3. ヒジキ試料の処理

ヒジキ製品および凍結乾燥したヒジキ原藻は食品用ミルで細かく粉砕して試料とした。

形態別分析試料は、粉砕したヒジキ試料 0.5 g に超純水 20 mL を加えて室温で放置後、超音波細胞破砕器 (Misonix, Inc., Farmingdale, NY, USA)を用いて破砕したのち、3000 rpm、15 分間遠心分離した。この上清を超純水にて 50 mL にメスアップし、HPLC-ICP-MS および HPLC-tandem MS にて分析した。

総ヒ素量分析試料は、粉砕したヒジキ試料 20 mg に硝酸 0.5 mL を加え、ドライブロックバスにて 160-170 °C で透明になるまで加熱したのち、硫酸 0.5 mL を加え 330 °C、1 時間加熱して灰化した。灰化試料は室温まで冷ましたのち 0.1 M 硝酸 で 50 mL にメスアップし、分析試料とした。測定は ICP-MS のダイナミックリ

アクションセル(DRC)モードで行った。

#### 1-2-4. アルセノシュガーの検出および同定

はじめに、HPLC (GL Science, Tokyo, Japan) を接続した Elan DRCII ICP-MS (PerkinElmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada) にてヒジキ中ヒ素化合物の検出を行った。装置条件を以下に示す。

##### HPLC 条件

カラム : PRP-X100 (250×4.6 mm i.d., Hamilton, Reno, Nevada, USA)、移動相: 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.0)、移動相流速 : 1.0 mL/min、カラムオープン温度 : 40 °C、試料注入量 : 50  $\mu\text{L}$ 。

##### ICP-MS 条件

入射電力 : 1300 W、プラズマガス流量 : 15 L/min、補助ガス流量 : 1.2 L/min、ネブライザガス流量 : 1.0 L/min、ネブライザー : 同軸型、スキマーコーンおよびサンプリングコーン : 白金製、測定質量 :  $m/z$  75 ( $^{75}\text{As}^+$ ) および 77 ( $^{77}\text{ArCl}^+$ )。

次に、PRP-X100 カラムにて、アルセノシュガー類の検出および同定のため、HPLC (Alliance 2695, Waters, USA)を接続した Quattro micro API tandem mass spectrometer (Waters, USA)のエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 陽イオンモードにて分析を行った。ただし、カラム径は 2.0 mm、移動相の流速は 0.2 mL/min、試料注入量は 10  $\mu\text{L}$  にて分析した。

##### tandem MS 条件

キャピラリー電圧 : 0.5 kV、イオン源温度 : 120 °C、デゾルベーションガス (窒素) : 温度 400 °C、流量 600 L/h、コーンガス (窒素) : 流量 50 L/h。

衝突誘起解離 (CID) はアルゴンを導入して行った。アルセノシュガー、アルセノベタイン、ジメチルアルシン酸、モノメチルアルソン酸の多重反応モニタリン

グ (MRM) は、検出された CID フラグメント(マストランジション)により最適化した。MRM のフラグメント化のパラメータを **Table 2** に示す。

**Table 2** Fragmentation parameters of MRM for arsenic compounds<sup>[11]</sup>

compounds	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
DMA <sup>v</sup>	138.9	90.8	30	24
MMA <sup>v</sup>	140.9	90.8	30	30
AsBe	179.0	119.9	30	24
AsSug 254	255.0	96.9	25	30
AsSug 328	329.0	96.9	25	32
AsSug 391	392.0	96.9	25	30
AsSug 392	393.0	96.9	25	32
AsSug 408	409.0	96.9	25	38
AsSug 482	483.0	96.9	30	36

#### 1-2-5. HPLC-ICP-MS によるヒ素化合物の定量

定量は HPLC-ICP-MS (HPLC: HP1200、ICP-MS: HP7500cx, Agilent, CA, USA) を用いて行った。アルセノシュガー濃度の推定のため、tandem-MS によるアルセノシュガー分析と同カラム (PRP-X100, 250×4.6 mm i.d.) を用いて分析した。アルセノシュガーについては標準品が入手できなかったため、一部同じ構造を持つジメチルアルシン酸の検量線を用いてアルセノシュガー量を推定した。亜ヒ酸、ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸およびアルセノベタインの標準液は、標準品を超純水に溶解し 100 mg As/L に調製した溶液を用時 5 µg/L または 50/µg L

に希釈して用いた。また、内部標準として 100 µg/L ゲルマニウム溶液をポストカラム添加法により、流速 0.2 mL/min で導入した。条件を以下に示す。

#### HPLC 条件

移動相：20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 9.5)、移動相流速：1.2 mL/min、カラムオープン温度：40 °C、試料注入量：50 µL、検出質量： $m/z$  75 (<sup>75</sup>As<sup>+</sup>)、72(<sup>72</sup>Ge<sup>+</sup>)、35(<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>)。

#### ICP-MS 装置条件

入射電力：1500 W、プラズマガス (アルゴン) 流量：15 L/min、キャリアガス (アルゴン) 流量：1.1 L/min、ネブライザー：同軸型、スキマーコーンおよびサンプリングコーン：白金製。

ヒ素化合物の検出限界 (LOD)は Gibbons らの方法<sup>[12]</sup> を用いて算出した。上記条件による HPLC-ICP-MS 法における亜ヒ酸、ヒ酸、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、アルセノベタインの LOD は、それぞれ 0.8、1.1、0.2、0.3、0.5 µg As/L であった。LOD 以下の値は非検出 (ND) とし、LOD 以下であるがピークが認められた場合は LOD の 2 分の 1 の濃度として計算した。CRM No.18 (ヒト尿)のアルセノベタインおよびジメチルアルシン酸の濃度はそれぞれ 75.3 ± 0.7 µg/L および 30.4 ± 0.4 µg/L (n=5) であり、いずれも認証値の分析許容範囲内 (69 ± 12 µg/L および 36 ± 9 µg/L)であった。

#### 1-2-6. 総ヒ素濃度の測定

灰化試料は 0.5 % アンモニア水、2 mM EDTA、0.8 mM TritonX-100 混合溶液で 1/50 に希釈したのち測定した。定量は標準添加法により行った。分析は Elan DRCII ICP-MS (PerkinElmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada)の、アンモニアをリアクションガスとして用いた DRC モードで行った。DRC モードの設定を以下に示す。

#### DRC モード設定

リアクションガス：アンモニア (>99.999 %)、アンモニア流速：0.3 mL/min、DRC  
リジェクションパラメーターq (RPq)：0.5、axial field voltage：275 V

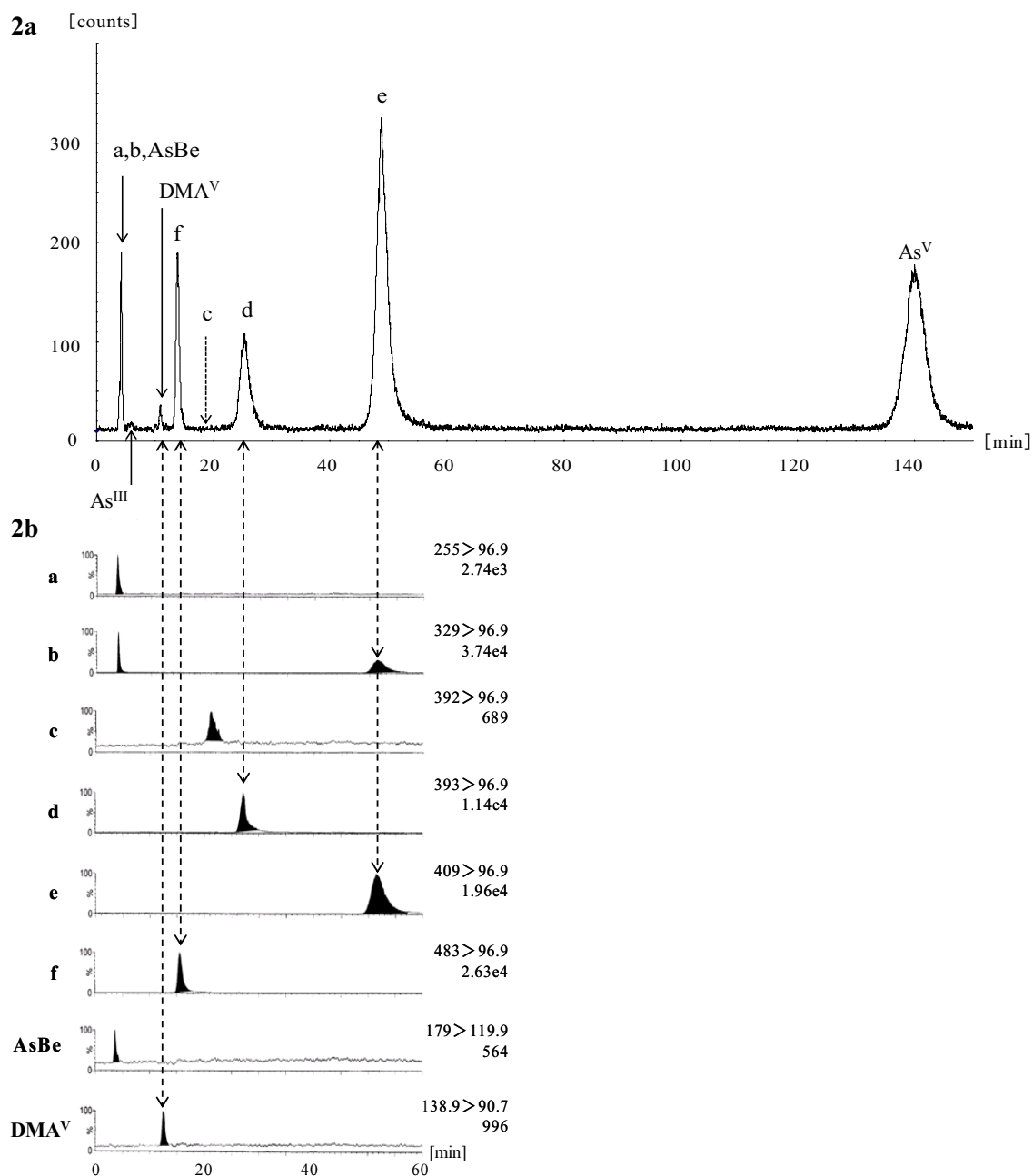
以上の条件において、 $^{75}\text{As}$  の干渉イオンである塩化アルゴンによる影響を確認するため 10-500 mM の塩化ナトリウム溶液を測定したところ、塩化アルゴンによる影響は見られなかった。ヒ素標準液の LOD および装置定量限界 (MLOQ) は日本工業規格 (JIS)<sup>[13]</sup> に従い算出した。ブランク溶液の  $m/z$  75 および 77 のカウント値は 13-17 CPS および 3-7 CPS であり、ほぼバックグラウンドレベルであった。LOD および MLOQ は 0.2  $\mu\text{g/L}$  および 1.1  $\mu\text{g/L}$  であった。この方法を用いて測定した CRM No.18 (ヒト尿) の総ヒ素濃度は  $137.5 \pm 4.2 \mu\text{g/L}$  (n=5) であり、認証値の分析許容範囲内 ( $137 \pm 11 \mu\text{g/L}$ ) であった。



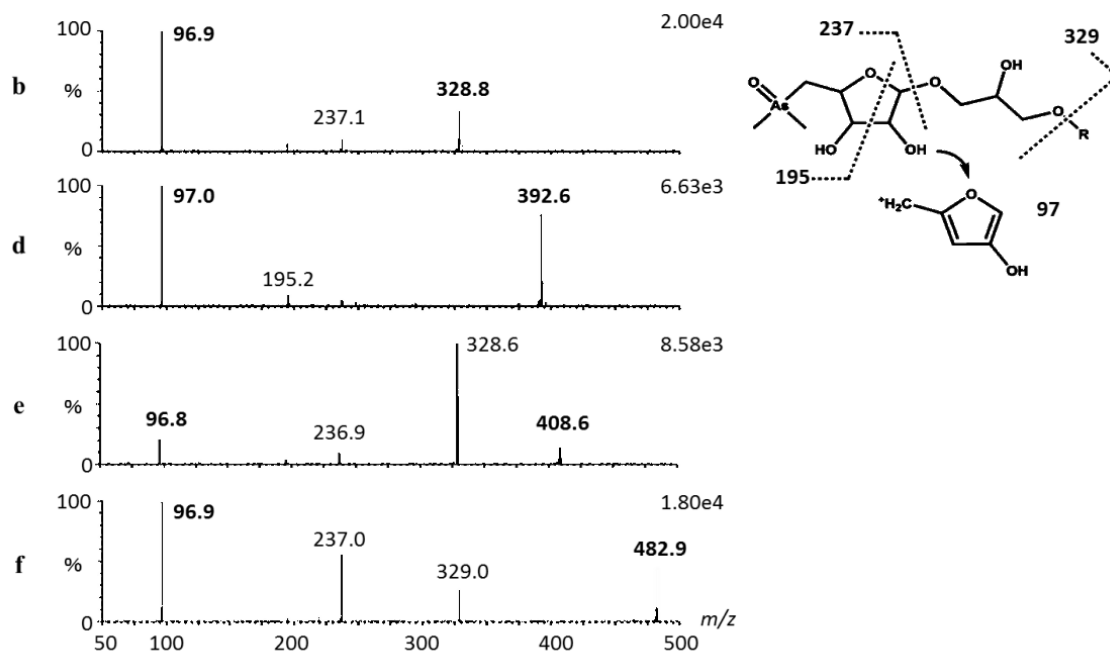
### 1-3. 結果

#### 1-3-1. HPLC -tandem MS によるアルセノシュガーの検出および同定

小湊産ヒジキ原藻 (#9) の水抽出試料のヒ素のクロマトグラム、および MRM モードによる HPLC-tandem MS のクロマトグラムを **Fig. 2** に示す。HPLC-ICP-MS 法により分析した結果、7 種類のヒ素化合物が検出された。ジメチルアルシン酸、亜ヒ酸、ヒ酸のほか、4 種類の未知ヒ素化合物ピークが確認された (**Fig. 2a**)。次いで、HPLC -tandem MS 法にて **Table 2** に示す 9 種類の有機ヒ素化合物をモニタリングしたところ、9 種類の有機ヒ素化合物のうち、モノメチルアルソン酸を除く 8 種類が検出された (**Fig. 2b**)。HPLC-ICP-MS 分析で検出された最も溶出時間の早いピークは、分子イオン  $[M+H]^+$   $m/z$  329 (AsSug 328)、AsSug 254 およびアルセノベタインの混合ピークであり、その強度から AsSug 328 が主成分であることが示された。また、AsSug 391 については、HPLC-ICP-MS 法では検出されなかったが、tandem MS 測定では検出された。さらに、**Fig. 3** に示すように濃度の高い 4 種類のアセノシュガー (AsSug 328、392、408 および 482) については tandem MS スペクトルが得られ、化合物の同定ができたが、AsSug 254、AsSug 391 およびアルセノベタインは強度が低く、スペクトルが得られなかった。ただし、アルセノベタインについては標準品を添加して確認した。中国産ヒジキ製品 (#1) および天津産ヒジキ製品 (#6) では AsSug 391 およびアルセノベタインは検出されなかった。



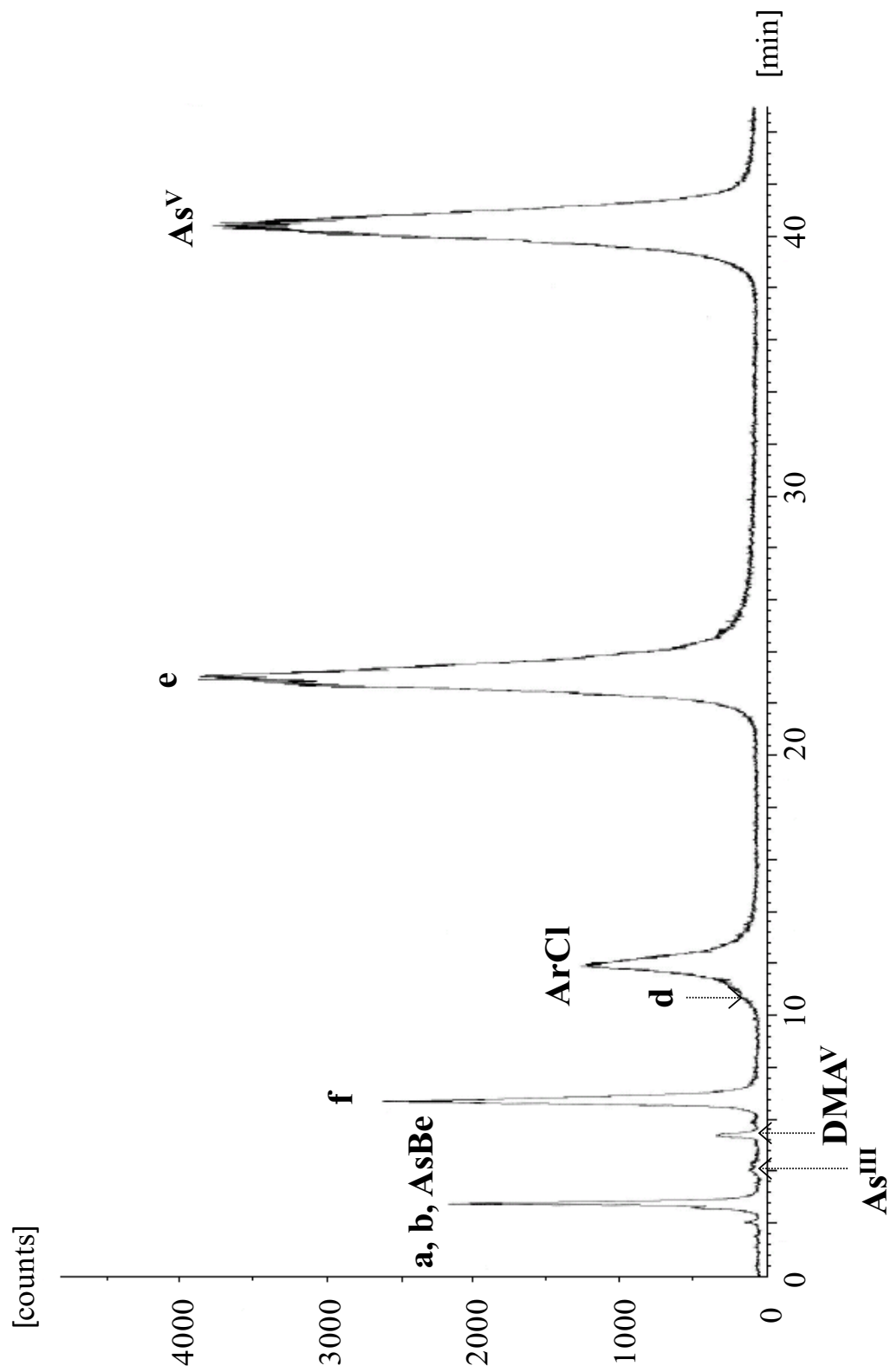
**Fig.2** HPLC-ICP-MS chromatogram (2a), and HPLC- tandem MS (MRM) chromatograms (2b) for a raw hijiki sample harvested in Kominto (Sample #9) with mobile phase at pH 8.0. Analytical conditions are described in text. The ordinates were normalized to 100 % for the base peak of each MRM chromatogram. (a), AsSug (Arasenosugar) 254; (b), 328; (c), 391; (d), 392; (e), 408; (f), 482. As<sup>III</sup>: arsinous acid, As<sup>V</sup>: arsenic acid, AsBe: arsenobetaine, DMA<sup>V</sup>: dimethylarsinic acid.



**Fig.3** The tandem MS ion spectra of AsSug 328 (b), 392 (d), 408 (e) and 482 (f).

### 1-3-2. HPLC-ICP-MS 法によるヒ素化合物の定量

アルセノシュガー検出に用いた条件ではヒ酸の溶出まで 2 時間以上を必要とするため、移動相の pH を 9.5 に変更してヒ酸の溶出時間を改善し、形態別分析を行った。この移動相の条件による小湊産ヒジキ原藻 (#9) の HPLC-ICP-MS クロマトグラムを **Fig. 4** に示す。この条件においてもヒジキ製品および原藻の全てにおいて AsSug 391 は検出されなかった。また、AsSug 328、AsSug 254 およびアルセノベタインは混合ピークとして検出されたが、**Fig. 2b** に示すように、HPLC-tandem-MS 法による分析で AsSug 254 およびアルセノベタインの含有量は AsSug 328 と比較して 1/10 以下と低いと考えられたことから、このピークを AsSug 328 として 4 種類のアルセノシュガーの定量を行った。



**Fig. 4** HPLC-ICP-MS chromatogram for a raw hijiki sample produced in Kominato (Sample #9) with mobile phase at pH 9.5. (a), AsSug 254; (b), 328; (d), 392; (e), 408; (f), 482.

9種類のヒジキ試料中のヒ素化合物の定量結果を **Table 3** に示す。アルセノシュガー濃度は、標準品の中で最も化学形態に近いジメチルアルシン酸を用いて算出した。ヒジキ試料全てにおいて最も含有量が多いヒ素化合物はヒ酸であった。ヒ酸濃度は釜ゆで法 (open steam system、#6 および#7) による製品では他の製法 (#1-5) の製品よりも低かった。また、ヒジキ原藻 (#8 および#9) 中のジメチルアルシン酸濃度は低かったが、同原藻から釜ゆで法で製造したヒジキ製品ではその3-4倍高かった。さらに、いずれの試料においても主要なアルセノシュガーは AsSug 408 であり、房総産ヒジキ (#6 および#7) において最も濃度が高く、ヒジキ原藻では AsSug 392 の濃度は製品よりも高かった。また、天津産ヒジキ原藻 (#8) においては AsSug 482 は検出されなかった。

房総産ヒジキ原藻 (#8、9)とそのヒジキ製品 (#6、7)中のアルセノシュガー含有量を比較すると、ヒジキ製品中のアルセノシュガーの含有量の減少が認められた。特に AsSug 328 の含有量は小湊産ヒジキ原藻 (#9) とその製品 (#7) とでは約 1/3、天津産ヒジキ原藻 (#8) とその製品 (#6) とでは約 1/4 に減少していた。その一方でジメチルアルシン酸の含有量は小湊産製品 (#7) では原料の 3.4 倍、天津産製品 (#6) では 4.6 倍に増加していた。AsSug 408 および AsSug 482 は塩基性下で AsSug 328 を経てジメチルアルシン酸に分解すること<sup>[14]</sup>、また、加熱によるジメチルアルシン酸の増加<sup>[15]</sup>が報告されていることから、今回、ヒジキ製品の製造工程での加熱がジメチルアルシン酸含有量の増加の原因と考えられた。

**Table 3** Concentrations of water-extracted arsenic compounds in hijiki samples by speciation analysis

Sample	As <sup>III</sup>	DMA <sup>V</sup>	As <sup>V</sup>	AsSugs					Total
				328 <sup>a)</sup>	391	392	408	482	
1	0.10	2.61	27.61	0.95	ND <sup>b)</sup>	0.12	1.79	0.08	2.96
2	0.44	2.71	55.33	1.48	ND	0.29	4.77	0.09	6.64
3	0.08	1.21	51.10	1.25	ND	0.22	3.85	0.05	5.39
4	0.13	2.72	50.93	0.85	ND	0.46	2.99	0.06	4.36
5	0.79	1.88	70.52	1.50	ND	0.48	5.75	0.05	7.79
6	0.26	0.74	8.94	0.32	ND	0.27	7.77	0.04	8.41
7	0.09	0.85	13.55	0.42	ND	0.27	10.15	0.05	10.90
8	0.25	0.16	17.15	1.44	ND	0.50	12.81	ND	14.78
9	0.16	0.25	17.21	1.39	ND	0.56	18.10	0.04	20.09

Values represent means of concentration of arsenic compounds as As (mg As/g dw, n = 3).

<sup>a)</sup> The values are estimated from a peak of ArSug 328 containing AsBe and AsSug 254.

<sup>b)</sup> ND ; not detected by HPLC-ICP-MS.

### 1-3-3. ヒジキ中総ヒ素濃度に対する水抽出ヒ素化合物の割合

**Table 4** に灰化試料にて測定した総ヒ素濃度、および形態別分析から求めた水抽出試料中のヒ素濃度を示す。ヒジキ試料の総ヒ素濃度は 37- 119  $\mu\text{g As/g dw}$  (dry weight)であった。最もヒ素濃度の高い試料は大分産の芽ヒジキ (#5) で、最も低い天津産長ヒジキ (#6) の約 3 倍であった。水抽出試料中のヒ素濃度は 18.4-81.0  $\mu\text{g As/g dw}$  であり、総ヒ素濃度の 41-68 % (平均 約 60 %) であった。総ヒ素に対する無機ヒ素の割合は 25-60 % であり、最も無機ヒ素の割合が低いのは天津産製品 (#6) であった。房総産ヒジキ製品は、他の地域の製品に比べて無機ヒ素の割合は低かった。

**Table 4** Total As and water-extracted inorganic As, ArsenoSugars, and total As in hijiki samples and their ratio to Total As

Sample	Acid-digested Total-As ( $\mu\text{gAs/g dw}$ ) (A-TAs)	Water-extracted As ( $\mu\text{gAs/g dw}$ )					
		Total-As (W-TAs) <sup>a)</sup>	Total-inorganic As (W-iAs) <sup>b)</sup>	Total-AsSugs (W-AsS) <sup>c)</sup>	W-TAs / A-TAs (%)	W-iAs / A-TAs (%)	W-AsS / A-TAs (%)
1	80.9 $\pm$ 9.4	33.4 $\pm$ 2.0	27.7 $\pm$ 1.7	3.0 $\pm$ 0.0	41.3	34.3	3.7
2	112.6 $\pm$ 1.5	65.1 $\pm$ 2.7	55.8 $\pm$ 2.0	6.6 $\pm$ 0.6	57.8	49.5	5.9
3	86.7 $\pm$ 6.7	59.0 $\pm$ 3.3	51.2 $\pm$ 2.9	5.4 $\pm$ 0.3	68.0	59.0	5.9
4	86.3 $\pm$ 5.7	58.1 $\pm$ 1.8	51.1 $\pm$ 1.5	4.4 $\pm$ 0.3	67.4	59.2	5.1
5	118.6 $\pm$ 11.3	81.0 $\pm$ 2.6	71.3 $\pm$ 2.0	7.8 $\pm$ 0.7	68.3	60.1	6.6
6	37.1 $\pm$ 1.2	18.4 $\pm$ 0.7	9.2 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.4	49.5	24.8	22.7
7	48.7 $\pm$ 2.4	25.4 $\pm$ 1.3	13.6 $\pm$ 0.5	10.9 $\pm$ 0.7	52.1	28.0	22.4
8	59.3 $\pm$ 8.4	32.4 $\pm$ 1.2	17.4 $\pm$ 0.1	14.8 $\pm$ 1.2	54.6	29.3	24.9
9	72.8 $\pm$ 1.8	37.7 $\pm$ 1.7	17.4 $\pm$ 0.3	20.1 $\pm$ 1.5	51.8	23.9	27.6

Each sample solution was measured in 3 replicates. Each value represents mean  $\pm$  SD (n = 3).

<sup>a)</sup>Sum of the concentrations of water-extracted inorganic As, arsenosugars and DMA<sup>v</sup> indicated in Table .

<sup>b)</sup>Sum of the concentrations of inorganic arsenic compounds As<sup>III</sup> and As<sup>v</sup> indicated in Table .

<sup>c)</sup>Sum of the concentrations of arsenosugars indicated in Table 3.



#### 1-4. 考察

ヒ素化合物の形態分析には HPLC-ICP-MS が一般的に用いられており、HPLC の条件なども概ね確立されている。しかしながら、HPLC-ICP-MS 法の最大の欠点は標準物質を得ることが困難なヒ素化合物の同定・定量が不可能である点である。実際にヒジキ試料を HPLC-ICP-MS 法により分析すると溶出時間順に亜ヒ酸、ジメチルアルシン酸およびヒ酸が検出され、それら以外にヒ素化合物として認識されるピークが 4 種類検出された (**Fig. 2a**)。そこで、これらの未知ヒ素化合物の同定を目的に、HPLC-ICP-MS 法で得られたヒ素化合物の溶出順序と同一になるように HPLC-tandem-MS の HPLC の条件を設定してヒジキ原藻あるいは製品中に含まれるヒ素化合物を MRM モードにより分析した。その結果、**Fig. 2b** に示すように 6 種類のアルセノシュガー、ジメチルアルシン酸およびアルセノベタインなどの有機ヒ素化合物が検出された。しかしながら、AsSug 254、AsSug 391 およびアルセノベタインはヒジキ中より検出されたものの含有量が非常に少なく、tandem-MS スペクトルは AsSug 328、AsSug 392、AsSug 408 および AsSug 482 のみ得られた (**Fig. 3**)。そこで、HPLC-tandem-MS の MRM モードで得られたアルセノシュガーの溶出時間と分子量のデータ (**Fig. 2**)を HPLC-ICP-MS のクロマトデータ (**Fig. 4**)に併用することでヒジキ中のヒ素化合物の迅速一斉形態別分析を行った。

産地・製造法の異なる 7 種のヒジキ製品およびその製品前の 2 種のヒジキ原藻中に含まれるヒ素化合物を **Table 3** に示す。アルセノシュガー類については、AsSug 328、AsSug 392、AsSug 408 および AsSug 482 が検出され、AsSug 391 は HPLC-tandem-MS では検出されたが、HPLC-ICP-MS では検出できなかった。このことから、アルセノシュガーの分析は HPLC-tandem-MS の方が感度の高いことが明らかになった。ヒジキ中アルセノシュガーのうち、AsSug 408 の含有量は原藻

ならびに産地・製法の異なるいずれのヒジキ製品においても最も多く、次いで AsSug 328、AsSug 392、AsSug 482 の順であった。

近年、海藻中のヒ素は様々な方法により分析が試みられており<sup>[16,17]</sup>、アルセノシュガーが海藻中の主要な有機ヒ素化合物として同定されている<sup>[18-20]</sup>。Shibata<sup>[18]</sup>らは、ヒジキ中には AsSug 408 が最も多く、AsSug 392 は少量、AsSug 482 と 391 は微量であると報告している。Almela<sup>[21]</sup>、Raab<sup>[22]</sup>らもヒジキ製品中の AsSug 328、392、408、482 について報告している。Schmeisser<sup>[19]</sup>らもヒジキから 4 種類のアルセノシュガーを検出し、そのうち AsSug 408 がもっとも多く 11.3 mg As/kg であったと報告している。これらのデータと比較して、今回分析したヒジキ中に含まれる主なアルセノシュガーの種類と含量について差異は認められなかった。一方、今回の分析で微量ながらはじめて検出された AsSug 254 は酸性下で AsSug 328、392、408 および 482 から分解し生成するとの報告があり<sup>[23]</sup>、ヒジキ固有のアルセノシュガーであるかは今のところ明確でない。また、アルセノベタインについても、近年、ヒジキ以外の 6 種類の海藻から検出されたとの報告があるが<sup>[24]</sup>、海藻表面に付着している動物プランクトンなどからのコンタミネーションの可能性があり、ヒジキ中にアルセノベタインが含まれるか否かについてはより詳細な検討が必要である。以上の結果から、今回開発したヒ素分析法は、アルセノシュガー類を高感度で検出でき、標準品得られない場合においてもヒ素化合物の同定が可能であることが示された。

ヒジキ中には発癌性の指摘されている無機ヒ素化合物の含有量が多いことから、2001 年にカナダ食品検査庁 (Canadian Food Inspection Agency: CFIA)<sup>[25]</sup>、2004 年には英国食品規格庁 (Food Standards Agency : FSA) が国民に対してヒジキを食べないように勧告した経緯がある<sup>[26]</sup>。今回の結果では、**Table 4** に示すように、ヒジキ 7 製品中の無機ヒ素濃度は 9.2-71.3 mg/kg、平均で約 40 mg/kg であり FSA が示

した結果 (77 mg/kg) より低い値であった。製造法別に製品中の無機ヒ素濃度を比較すると open-steam system (ヒジキを解放下で蒸す製造法) により製造された商品中の濃度が顕著に低かった。調理法によりヒジキ中の無機ヒ素濃度を減少させることは知られているが<sup>[27, 28]</sup>、製造法の工夫により調理前に無機ヒ素を低減させることも可能であると考えられた。一方で、ヒジキ中にはアルセノシュガーも総ヒ素濃度の 3.7-27.6 %存在することが示されたが、アルセノシュガーのヒトにおける主要な代謝物はジメチルアルシン酸とされている<sup>[29]</sup>。ジメチルアルシン酸はげっ歯類において発癌性が指摘されており<sup>[4]</sup>、ヒトによるヒジキの安全な摂取については、総ヒ素濃度および無機ヒ素濃度のみならず、アルセノシュガーおよびその代謝物を含め考慮する必要がある。

また、これら 4 種類のアルセノシュガー類については、tandem-MS よりも高分解能である HPLC-TOF-MS によっても確認できた (unpublished data)。以上より、今回検討した HPLC-tandem-MS 法と HPLC-ICP-MS 法を併用したヒ素化合物の一斉分析法は、標準物質が入手できないアルセノシュガーについても高感度に検出しかつ量の推定にも利用可能であることが示された。この手法は食品中のヒ素化合物分析のみならず尿中代謝物の分析法としても応用展開が可能であり、ヒ素化合物のリスク評価に大きく寄与できると考えられる。

## 第 2 章 OCC-ICP-MS 法を用いた尿試料の迅速・高感度カドミウム測定法の確立<sup>[30]</sup>

### 2-1. はじめに

カドミウム曝露は精錬、工業的利用による職業的曝露、公害による曝露のほか、食品、喫煙による日常的な曝露がある。特に、職業的な吸入曝露によりヒトに肺癌を起こすことが疫学的に報告されており、IARC の発癌性リスク評価においては第 1 章で述べた無機ヒ素化合物と同様 **Group 1** に分類されている<sup>[31]</sup>。しかしながら、経口曝露については疫学研究および動物実験ともに発癌の増加を示す報告はなく、カドミウムのヒトに対する有害影響としては、長期間曝露による近位尿細管の再吸収機能障害による低分子タンパク質、 $\beta_2$ -ミクログロブリンの排泄量増加が特徴とされる。その典型的な事例が、富山県神通川流域のカドミウム汚染が著しい地域で発生したイタイイタイ病である。この公害病の症状は、近位尿細管機能障害に加えて、その機能障害により引き起こされるカルシウム代謝異常の結果生じるとされる骨軟化症が特徴である<sup>[32]</sup>。

通常環境下における主要なカドミウム曝露経路は食品である。ほとんどの食品中に環境由来のカドミウムが微量に含まれているが、日本人は主食である米摂取によるカドミウム曝露の割合が高い<sup>[33]</sup>。また、日本人のカドミウム摂取量は世界的な水準と比較して高く<sup>[34]</sup>、腎臓皮質中のカドミウム濃度は他国に比べて高濃度であると報告されている<sup>[33]</sup>。体内のカドミウムは、糸球体からカドミウム-メタロチオネインとして濾過されるが、近位尿細管障害がない場合にはほぼ 100 %再吸収され、腎皮質に蓄積される一般環境における長期間の低濃度の定常的曝露では、尿中カドミウム排泄濃度は腎皮質へのカドミウム負荷量と正の相関を示すため、曝露指標として広く用いられている。

従来、尿試料をはじめとする生体試料および食品中のカドミウム濃度測定は原

子吸光光度法が用いられてきたが、近年ではより高感度に多元素を同時に測定法できる ICP-MS 法による分析が中心になりつつある。しかし、ICP-MS 法で尿中カドミウムを測定する場合、尿中に多量に存在するモリブデンから生成する酸化モリブデンに由来するスペクトル干渉が問題となる<sup>[5-7]</sup> (Table 5)。モリブデンは主に食品中から摂取され、尿中モリブデン濃度はヨーロッパ人で 10-120  $\mu\text{g/L}$ <sup>[35]</sup>、日本人で 10-200  $\mu\text{g/L}$ <sup>[36]</sup>である。通常環境下における尿中カドミウム濃度は日本人女性 0.99 $\pm$ 2.34  $\mu\text{g/L}$ <sup>[37]</sup>、アメリカ人 0.229  $\mu\text{g/L}$ <sup>[38]</sup>であり、モリブデン濃度の 1/10-1/100 である。この酸化モリブデンとカドミウムは、ICP-MS の中で高い分解能を持つ二重収束型マスフィルターを有する ICP-MS (SF-ICP-MS) の高分解能モード(分解能  $m/\Delta m > 8000$ )においても分離が困難である<sup>[39-41]</sup> ことに加え、SF-ICP-MS の高分解能モードでの測定はコストが高く、多数の試料を測定するにあたって実用的ではない。このため、現在は SF-ICP-MS 法の低分解モード ( $m/\Delta m = 300$ )にて測定し、妨害イオンの影響を算術的に補正してカドミウム濃度を算出する方法<sup>[39]</sup>、および比較的共存物の影響を受けにくい同位体希釈法を併用した手法<sup>[42]</sup>が多用されている。また、ICP-MS の干渉イオン除去システムの一つであるダイナミックリアクションセル (DRC) を備えた DRC-ICP-MS 法も用いられる。この方法は SF-ICP-MS 法と同程度の感度を有するが、固相抽出 (SPE) 法による前処理を必要とする<sup>[43]</sup>。上記の手法はいずれも高い分析費用ないしは煩雑な処理を必要とする方法であり、多数の試料を取り扱う上での障害となる。

そこで、DRC-ICP-MS 法とは異なる ICP-MS の干渉イオン除去システムであるオクタポールコリジョンセル (OCC) を備えた OCC-ICP-MS を用い、尿中カドミウムの高感度分析と試料の前処理が不要な迅速分析を両立した ICP-MS 法の確立を目指した。

**Table 5** Spectral interferences for cadmium analysis using ICP-MS

Mass number of cadmium	Isotopic abundance (%)	Interfering ions
108	0.89	<sup>108</sup> Pd, <sup>92</sup> MoO
110	12.49	<sup>110</sup> Pd, <sup>94</sup> MoO
111	12.80	<sup>95</sup> MoO
112	24.13	<sup>112</sup> Sn, <sup>96</sup> MoO
113	12.22	<sup>113</sup> In, <sup>97</sup> MoO
114	28.73	<sup>114</sup> Sn, <sup>98</sup> MoO
116	7.49	<sup>116</sup> Sn, <sup>100</sup> MoO

## 2-2. 試薬および実験方法

### 2-2-1. 試薬

原子吸光用カドミウム標準溶液 (101.0 mg/L ; 和光純薬、大阪)は TAMAPURE AA-100 硝酸 (68% ; 多摩化学、神奈川)より調製した 0.15 M 硝酸にて希釈し、検量線作成および標準添加法に用いた。内部標準である原子吸光用ロジウム標準溶液 (1000 mg/L) および原子吸光用モリブデン標準液 (1000 mg/L) は和光純薬より購入し、0.15 M 硝酸で希釈して用いた。試料の希釈は TAMAPURE AA-100 アンモニア溶液 (20% ; 多摩化学)、Triton X-100 (scintillation grade; ACROS ORGANICS, Antwerp, Belgium)、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA; TiTriplex2, Merck, Darmstadt, Germany) 混合溶液を用いた。微量元素分析用の超純水は超純粋製造装置 (Milli-Q-ICP-MS; ミリポア、東京)を用いて調製した。

### 2-2-2. 尿試料

1. 標準尿 アメリカ国立標準技術研究所 (NIST, Gaithersburg, MD, USA)

SRM2670a (Toxic Elements in Urine) low urine および high urine 試料を用い

た。

2. 尿検体 尿試料は東京在住の健康な 20 人の女性ボランティア (26-43 歳、平均  $31.7 \pm 4.0$  歳) より得た。尿試料は朝の最初の尿を避けて採取し、プラスチックチューブに密閉して分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。この研究は国立癌センターの治験審査委員会の許可を得て行った。

#### 2-2-3. ヘリウムをコリジョンガスとして用いた OOC-ICP-MS 測定

標準尿および尿検体は 0.5 % アンモニア水、0.5 g/L Triton X-100、0.5 g/L EDTA 混合溶液にて 1/50 に希釈したのち、ICP-MS に導入した。ただし、SRM2670a low urine のみはカドミウム濃度が低いため、1/5 に希釈して測定した。

測定は Agilent 7500cx ICP-MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) の OCC モードにて行った。装置条件を以下に示す。

##### ICP-MS 装置条件

入射電力：1550 W、サンプル位置：8.0 mm、キャリアガス流量：0.9 L/min、メイクアップガス流量：0.23 L/min、サンプル流量：0.4 mL/min、コリジョンガス：ヘリウム ( $\text{He} > 99.999\%$ ): コリジョンガス流速：4.5 mL/min、運動エネルギー差別 (kinetic energy discrimination、KED) 3 V、スキマーコーンおよびサンプリングコーン：ニッケル製、設定質量： $m/z$  111 ( $^{111}\text{Cd}^+$ )、 $m/z$  98 ( $^{98}\text{Mo}^+$ )、 $m/z$  103 ( $^{103}\text{Rh}^+$ )。

#### 2-2-4. 分析手法の妥当性の確認

カドミウム標準液の LOD および尿中カドミウムの MLOQ は JIS の定義に従って算出した<sup>[13]</sup>。LOD および MLOQ は、ブランク溶液の 10 回繰り返し測定の標準偏差にそれぞれ 3 および 14.1 を乗じて算出した。測定の正確度は SRM 2670a high urine および low urine (カドミウム濃度は 4.862 および 0.0591  $\mu\text{g/L}$ ) を用いて求め

た。手法の再現性は、同標準尿試料を3日間連続して、かつ、日内変動を確認するため毎日5回繰り返して測定し、評価した。

#### 2-2-5. OCC-ICP-MS 法における尿試料の固相抽出の有無についての検討

ボランティア尿検体について SPE 前処理を Suzuki らの方法<sup>[43]</sup>に従って行い、前処理の有無によるカドミウム感度の差異について検討した。処理には機能性キレート樹脂カラム (NOBIAS Chelate PA-1; 日立ハイテクノロジー、樹脂充填量 240mg)を用いた。次に、プレコンディショニングを、樹脂にアセトン 10mL、超純水 15 mL、3 M 硝酸 5 mL、超純水 15 mL、0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 8.6) 5 mL の順に添加して行った。次に、尿試料 2 mL を 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 8.6) 10 mL で希釈し、超純水で 20 mL にメスアップしたのち樹脂に添加した。樹脂を超純水 10 mL で洗浄したのち、樹脂とキレートを作ったカドミウムを、1 M 硝酸 1 mL および超純水 1 mL で溶出させた。得られた溶出液 2 mL にロジウム標準液 (5 µg/L) 0.1 mL を混合し、測定溶液とした。カドミウムの回収率はカドミウムを添加した尿試料で確認した。



## 2-3. 結果

### 2-3-1. OCC-ICP-MS 法による分析手法の妥当性および再現性の確認

本法によるカドミウム標準液の LOD は 0.0002 µg/L であり、尿中カドミウムの LOD および MLOQ は 0.0097 および 0.038 µg/L であった。

手法の再現性を評価するため、低濃度および高濃度のカドミウムを含む SRM 2670a 標準尿試料を 3 日間連続して、かつ、日内変動を確認するため毎日 5 回繰り返して分析したところ、**Table 6** に示すように十分な再現性が得られた。

**Table 6** Inter-day reproducibility of the proposed method obtained from 3-day repeated experiments

Day	Cadmium concentration (µg/L)	
	Low (0.0591)	High (4.862)
1	0.0584 ± 0.0037*	4.940 ± 0.0711*
2	0.0628 ± 0.0020*	5.089 ± 0.0654*
3	0.0573 ± 0.0033*	4.971 ± 0.0794*
Mean	0.0595	4.980
SD	0.0029	0.045
RSD** (%)	4.9	0.9
Accuracy (%)	100.7	102.4

\* : The values are expressed as mean ± SD (n = 5)

\*\* : Relative standard deviation

次に、この手法を用いて同標準尿試料を分析したところ、**Table 7** に示すように低濃度、高濃度ともにカドミウムおよびモリブデン濃度は許容濃度の誤差の範囲内であり、この手法は尿中カドミウムの分析手法として妥当であることが示された。この値は SPE 処理後に DRC-ICP-MS で測定した試料の測定値とほぼ変わらない。

かった (Table 7)。

**Table 7** Analysis of cadmium and molybdenum in NIST reference urine SRM 2670a (Toxic Elements in Urine) by OCC-ICP-MS and DRC-ICP-MS with SPE method

Methods	Cadmium		Molybdenum	
	Low level urine	High level urine	Low level urine	High level urine
OCC-ICP-MS (He)	0.058 ± 0.004	4.940 ± 0.071	16.9 ± 0.1	113.8 ± 0.5
DRC-ICP-MS with SPE*	0.056 ± 0.003	4.897 ± 0.068	—	—
Certified value	0.059 ± 0.003	4.862 ± 0.084	17**	114.1 ± 4.8

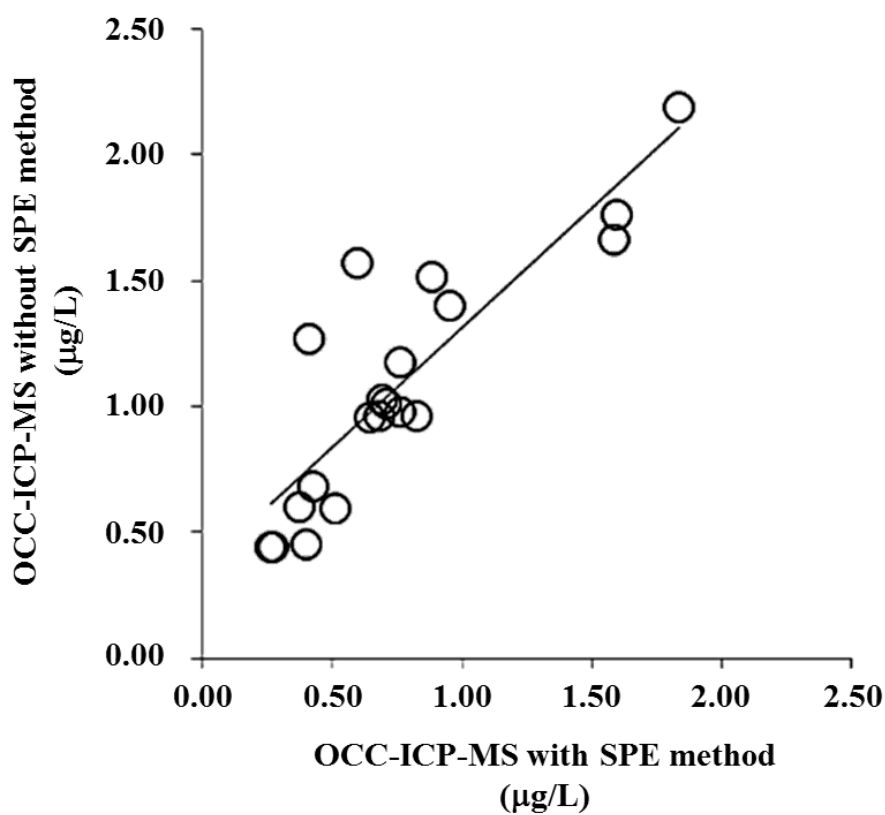
The values are expressed as mean ± SD (n = 5)

\* : The data are described in previous report<sup>[43]</sup>

\*\* : informative value

### 2-3-2. OCC-ICP-MS 法における尿試料の SPE の有無についての検討

本法の妥当性および再現性が確認できたので、この手法を用いて健常人な女性ボランティアの尿 20 試料のカドミウム濃度について、SPE 法による前処理の有無による感度の変化について検討した結果、**Fig. 5** に示すような相関が得られた。相関式および相関係数は  $Y = 0.95x + 0.36$  ( $r = 0.866$ ) であり、良好な相関が得られた。



**Fig. 5** The relationship between Cd concentrations in 20 urine samples analyzed using the OCC-ICP-MS with or without SPE method ( $Y = 0.95x + 0.36$ ) ( $n=20$ ,  $r = 0.866$ ).

#### 2-4. 考察

ICP-MS 法は試料のマトリックスの影響を受け易い測定法であるため、正確な測定のためには試料処理が重要である。特に、ヒトの体液の試料は複雑なマトリックスを含み、かつ多検体数を取り扱う場合が多いため、迅速な分析を行うためには処理にかかる時間および労力の軽減が課題となる。マトリックスの影響を減じる方法としては試料の希釈がある。しかし、この方法は干渉イオンの濃度低下により化学的、物理的およびスペクトルによる干渉を低減することは可能であるが、目的化合物の濃度も低下するため感度は低下する。そのため、適合したマトリックス中で目的元素の量を定量する標準添加法がよく用いられている。しかしながら、尿中カドミウム測定のように、試料によっては標準添加法が利用できない場合もある。

現在よく利用されている四重極型マスフィルターを用いた ICP-MS (ICP-QMS) による測定においては、生体試料中のマトリックス由来の非スペクトル干渉およびスペクトル干渉の影響のため、多くの元素について、ヒトの体液試料を SPE などの前処理なしで測定することはできない<sup>[39]</sup>。特にカドミウムの場合、NIST SRM 2670a 標準尿試料を希釈のみで標準添加法にて DRC-ICP-MS で測定した場合、分析値が認証値の許容範囲を超えるため、SPE による前処理が必須である<sup>[43]</sup>。そのため、今回、SPE 前処理を行わずに測定可能である手法として、コリジョンガスイオンとの衝突回数の差によって生じる運動エネルギー差を利用して干渉を除去する KED 法を利用した OCC-ICP-MS 法に着目した。多原子イオンは分析対象元素 (単原子イオン) と比較して分子が大きいいためコリジョンガスイオンと衝突する機会が多く、単原子イオンに比べエネルギーを失いやすい。このため、KED 法は多原子イオンによる干渉除去に優れる<sup>[44]</sup>。Table 5 に示すように、カドミウム同位体の中で  $^{111}\text{Cd}$  のみは単原子同重体を持たないので、本研究においては  $^{111}\text{Cd}$

同位体を採用し測定を行った。

SF-ICP-MS による尿中カドミウム測定における LOD は  $0.007 \mu\text{g/L}$  と報告されており<sup>[39]</sup>、従来用いられてきた原子吸光光度法の LOD ( $0.5 \mu\text{g/L}$ )<sup>[45]</sup> と比較して 10 倍以上高い。今回の測定における LOD は、Bocca<sup>[39]</sup>らによる SF-ICP-MS で測定した値とほぼ同等であった。したがって、今回検討した手法は、通常環境下にある集団の低濃度尿中カドミウム測定を行うのにも十分な感度であると考えられる。また、今回検討した OCC 法は機能性キレート樹脂による処理を行わない場合においても、処理を行った場合と同等に低濃度の尿中カドミウムを測定することが可能であった。それゆえ、OCC 法を併用した ICP-MS 分析は尿中の微量カドミウム測定にあたって、高感度かつ多検体数に対応する試料処理の迅速化を両立した ICP-MS 法として適用できる。

## 【総括】

近年、国内外で食品中に含まれる金属に関する摂取勧告や評価の見直しが相次いで実施されている。食品中ヒ素化合物の摂取については、2001年にCFIA、2004年にはFSAが無機ヒ素を多く含有するヒジキの摂食を控えるよう国民に勧告している。また、カドミウムについても、2006年、コーデックス委員会が精米中カドミウム基準値として0.4 mg/kgを採択し、2010年、わが国もこれに同調している。今後も国内外を問わず食品中に含まれる金属の安全性に対して関心はさらに高まることが予想され、その評価のためには食品および生体試料中に含まれる金属の分析法の確立が必須である。今回著者は、HPLC-ICP-MSとHPLC-tandem MSを併用した手法により、ヒジキを例に有機ヒ素および無機ヒ素化合物の一斉形態別分析法を確立した(第1章)。次いで、尿中のカドミウム濃度の分析において、生体試料中の金属分析法の高感度化と試料処理の高速化を両立したICP-MS法を確立した(第2章)。これらの分析法は、①金属元素の生命現象への関わりを解明するメタロミクス分野の発展へ寄与するとともに、②食品の安全性評価を含む衛生薬学分野においても広く利用されることが期待できる。

【引用文献】

- [1] 谷口将济, 神野伸一郎, 廣村信, 榎本秀一. (2012) 生体微量金属元素のダイナミクスと複数分子イメージング. 分析化学, 61(12), 1013-1025
- [2] Haraguchi H. (2004) Metallomics as integrated biometal science. J. Anal. At. Spectrom., 19, 5-14.
- [3] International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1992) Environmental Health Criteria 134 Cadmium. [cited 2013 Dec 4] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC). (2004) Some drinking water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risks to Humans, 84, 41-267.
- [5] Inagaki K., Takatsu A., Uchiyama A., Nakama A., Okamoto K. (2001) Determination of cadmium in sediment by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry using a co-precipitation separation technique. J. Anal. At. Spectrom., 16, 1370-1374.
- [6] De Boer J. L., Ritsema R., Piso S., Van Staden H., Van Den Beld W. (2004) Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood. Anal. Bioanal. Chem., 379, 872-880.
- [7] Diemer J., Vogl J., Quetel C. R., Linsinger T., Taylor P. D., Lamberty A., Pauwels J. (2001) SI-traceable certification of the amount content of cadmium below the ng g<sup>-1</sup> level in blood samples by isotope dilution ICP-MS applied as a primary method of measurement. Fresenius J. Anal. Chem., 370, 492-498.
- [8] IARC. (2012) Arsenic and arsenic compounds, In IARC Monograph vol.100C

- (IARC Ed.), IARC, Lyon, pp. 41-85.
- [9] Yasuyo Shimoda, Yoshihiro Suzuki, Yoko Endo, Koichi Kato, Mariko Tachikawa, Ginji Endo, Kenzo Yamanaka. (2010) Speciation Analysis of Arsenics in Commercial Hijiki by High Performance Liquid Chromatography-tandem-mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography-inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Health Sci.*, 56(1): 47-56.
- [10] Suzuki Y., Shimoda Y., Endo Y., Hata A., Yamanaka K., Endo G. (2009) Rapid and effective speciation analysis of arsenic compounds in human urine using anion-exchange columns in HPLC-ICP-MS. *J. Occup. Health*, 51, 380-385.
- [11] Neschwitz V., Pergantis A. (2005) Liquid chromatography online with selected reaction monitoring electrospray mass spectrometry for the determination of organoarsenic species in crude extracts of marine reference materials. *Anal. Chem.*, 77, 5551-5563.
- [12] Gibbons R. D. (2000) Detection and quantification of environmental pollutants. In *Encyclopedia of analytical chemistry* (Meyers R. A. Ed.), Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 2343-2359.
- [13] 日本工業規格 (JIS). (2006) 高周波プラズマ質量分析通則、K0133. 日本規格協会編、JIS ハンドブック、日本規格協会、東京、pp. 371-388.
- [14] Gamble B. M., Gallagher P. A., Shoemaker J. A., Parks A. N., Freeman D. M., Schwegel C. A., Creed J. T. (2003) An investigation of the chemical stability of arsenosugars in basic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Analyst*, 128, 1458-1461.
- [15] Hamano-Nagaoka M., Hanaoka K., Usui M., Nishimura T., Maitani T. (2008) Nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of



- inorganic arsenic in hijiki and application to soaked hijiki. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 49, 88-94.
- [16] Madsen A. D., Goessler W., Pedersen S. N., Francesconi K. A. (2000) Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 657-662.
- [17] Pergantis S. A., Wangkarn S., Francesconi K. A., Thomas-Oates J. E. (2000) Identification of arsenosugars at the picogram level using nanoelectrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 72, 357-366.
- [18] Shibata Y., Morita M. (2000) Chemical forms of arsenic in the environment. With special emphasis in the marine environment. *Biomed. Res. Trace Elements*, 11, 1-24.
- [19] Schmeisser E., Goessler W., Kienzl N., Francesconi K. A. (2004) Volatile analytes formed from arsenosugars: determination by HPLC-HG-ICPMS and implications for arsenic speciation analyses. *Anal. Chem.*, 76, 418-423.
- [20] Castlehouse H., Smith C., Raab A., Deacon C., Meharg A. A., Feldmann J. (2003) Biotransformation and accumulation of arsenic in soil amended with seaweed. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 951-957.
- [21] Almela C., Laparra J. M., Velez D., Barbera R., Farre R., Montoro R. (2005) Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7344-7351.
- [22] 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, 153-166.
- [23] Gamble B. M., Gallagher P. A., Shoemaker J. A., Wei X., Schwegel C. A., Creed J.

- T. (2002) An investigation of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Analyst*, 127, 781-785.
- [24] Neschwitz V., Pergantis A. (2005) First report on the detection and quantification of arsenobetaine in extracts of marine algae using HPLC-ES-MS/MS. *Analyst*, 130, 1348-1350.
- [25] Canadian Food Inspection Agency (CFIA). (2001) Inorganic Arsenic and Hijiki Seaweed Consumption. [cited 2013 Dec 4]. <http://www.inspection.gc.ca/food/information-for-consumers/fact-sheets/specific-products-and-risks/chemical-hazards/inorganic-arsenic/eng/1332268146718/1332268231124>
- [26] Food Standard Agency (FSA). (2004) Arsenic in seaweed. [cited 2013 Dec 4]. <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2004/jul/hijiki>
- [27] Hanaoka K., Yoshida K., Tamano M., Kuroiwa T., Kaise T., Maeda S. (2001) Arsenic in the prepared edible brown alga hijiki, *Hizikia fusiforme*. *Appl. Organomet. Chem.*, 15, 561-565.
- [28] Ichikawa S., Kamoshida M., Hanaoka K., Hamanao M., Maitani T., Kaise T. (2006) Decrease of arsenic in edible brownalgae *Hizikia fusiforme* by cooking process. *Appl. Organomet. Chem.*, 20, 585-590.
- [29] Francesconi K. A., Tanggaar R., McKenzie C. J., Goessler W. (2002) Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin. Chem.*, 48, 92-101.
- [30] Yasuyo Shimoda, Yoko Endo, Norie Sawada, Shoichiro Tsugane, Ginji Endo, Kenzo Yamanaka. (2013) Development of a Simple and Precise Method to Determine Low Urinary Cadmium Levels by Using Inductively

- Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Biomed. Res. Trace Elements*, 24(1):1-6.
- [31] IARC. (2012) A review of human carcinogens: Arsenic, metals, fibres, and dusts. In IARC Monograph vol.100C (IARC Ed.). IARC, Lyon, pp. 11-465.
- [32] 齋藤 寛, 薮幸三, 古川洋太郎, 塩路隆治, 古山隆, 吉永馨. (1978) カドミウム腎障害--慢性カドミウム中毒およびいわゆるイタイイタイ病の腎病変と骨軟化症. *日本臨牀*, 36(10), 3431-3438.
- [33] 中西準子, 小野恭子, 蒲生昌志, 宮本健一. (2007) 第3章 ヒト健康に関する有害性評価. NEDO 技術開発機構, 産業技術総合研究所, 化学物質リスク管理センター 共編:詳細リスク評価書シリーズ 13 カドミウム. 丸善株式会社, 東京, pp. 91-132.
- [34] 豊田正武, 松田りえ子, 五十嵐敦子, 齋藤行生. (1998) 日本における環境汚染物の1日摂取量の推定およびその由来の解析. *食品衛生研究*, 48(9), 43-65.
- [35] Minoia C., Gatti A., Aprea C., Ronchi A., Sciarra G., Turci R., Bettinelli M. (2002) Inductively coupled plasma mass spectrometric determination of molybdenum in urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 1313-1319.
- [36] 吉田宗弘. (2004) モリブデン. 中原一彦 編:広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査 第6版 2, 日本臨牀社, 大阪, pp. 319-321.
- [37] Moriguchi J., Inoue Y., Kamiyama S., Sakuragi S., Horiguchi M., Murata K., Fukui Y., Ohashi F., Ikeda M. (2010) Cadmium and tubular dysfunction marker levels in urine of residents in non-polluted areas with natural abundance of cadmium in Japan. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 83, 455-466.
- [38] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012) Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables.

- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 127-132.
- [39] Bocca B., Forte G., Petrucci F., Senofonte O., Violante N., Alimonti A. (2005) Development of methods for the quantification of essential and toxic elements in human biomonitoring. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 41, 165-170.
- [40] Yu L. L., Vocke R. D., Murphy K. E., Beck C. M., 2<sup>nd</sup>. (2001) Determination of As, Cd, Cr, and Hg in SRM 2584 (trace elements in indoor dust) by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370, 834-837.
- [41] Ferrarello C. N., Fernández de la Campa M. R., Sariego Muñiz C., Sanz-Medel A. (2000) Metal distribution patterns in the mussel cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection. *Analyst*, 125, 2223-2229.
- [42] Rodushkin I., Engstrom E., Baxter D. C. (2012) Isotopic analyses by ICP-MS in clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.*
- [43] Suzuki Y., Endo Y., Ogawa M., Matsuda M., Nakajima Y., Onda N., Iwasaki M., Tsugane S. (2008) Determination of sub-ppb cadmium in urine by solid-phase extraction and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Sci.*, 24, 1049-1052.
- [44] 川端克彦. (2008) コリジョン・リアクションセル ICP-MS の基礎原理について. *地球科学*, 42, 157-163.
- [45] Ezaki T., Tsukahara T., Moriguchi J., Furuki K., Fukui Y., Ukai H., Okamoto S., Sakurai H., Honda S., Ikeda M. (2003) No clear-cut evidence for cadmium-induced renal tubular dysfunction among over 10,000 women in the Japanese general population: a nationwide large-scale survey. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 76, 186-196.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻賜りました日本大学薬学部環境衛生学研究室 山中健三 教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご懇篤なご指導を賜りました大阪市立大学大学院医学研究科教授 圓藤吟史 博士、ならびに（独）労働者健康福祉機構・関西労災病院産業中毒研究センター長 圓藤陽子 博士に心より御礼申し上げます。

本論文作成にあたりまして、適切なお助言、ご指導賜りました環境衛生学研究室 立川真理子 教授ならびに健康衛生学研究室 榛葉繁紀 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文作成にあたりまして、終始ご指導、ご鞭撻賜りました加藤孝一 准教授に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、尿中カドミウム分析法の開発においてご助力いただきました（独）国立がん研究センターがん予防・検診研究センター長 津金昌一郎 博士、同センター予防研究グループ疫学研究部室長 澤田典絵 博士に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究にご協力くださいました環境衛生学研究室の学生ならびにスタッフの方々に感謝の意を表します。