

20031178

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16（2004）年4月

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部室長

アキカマ
穂山 浩

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

近藤 一成
米谷 民雄

目 次

I 総括研究報告書

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

梶山 浩

II 分担研究報告書

1 標準物質の合成・リスク評価

梶山 浩

2 担子菌類中のヒトラシン化合物アガリチンの新規 LC/MS/MS 分析法開発

近藤 一成

3 担子菌類中の必須・有害金属の分析

米谷 民雄

III 研究成果の刊行に関する一覧表

I 総括研究報告書

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

主任研究者 穂山 浩

研究要旨 担子菌類中の有害成分である agaritine と、その代謝物と思われる 4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH)、4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD)および agaritine-carboxyl type を化学合成した。また合成した agaritine を標準物質として紫外吸収検出 HPLC 法により、分離分析を開発し、キノコ類中の agaritine 分析法を確立した。担子菌類であるキノコ中の hydrazine 化合物の一つで、変異原性が報告されている agaritine (β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine) を、LC/MS/MS を用いて定量用に m/z 122、確認用に m/z 248 を用いる高選択的高感度分析法を開発した。この方法を用い *Agaricus* 属キノコおよび *Agaricus* 属以外の各種キノコを分析した結果、アカキクスキノコ製品 (*Agaricus blazei* Murill) 中には、ND ~最大 2,017 $\mu\text{g/g dry}$ 、マノンジュールム (*Agaricus bisporous*) 中には 198 $\mu\text{g/g wet}$ の agaritine が検出された。シイタケ (*Lentinus edodes*)、マイタケ (*Grifola frondosa*)、ブナノメシ (*Hypsizygus marmoratus*)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*) 中には agaritine は検出されなかった。

agaritine の安定性について検討したところ、agaritine は室温~60°C では長時間安定であるが 80°C 以上では 1 時間以後急速に分解され、一部は HMPH に分解されることか判明した。また、その代謝分解物である HMPH についても LC/MS/MS 法で検討し、agaritine と同時分析が可能であった。

アカリクスを含めたキノコ類中の金属を、化学形態も含めて解析することにより、キノコ類を評価することを目的とした。対象元素を選択するために、きのこ類中の金属について文献調査を行い、有害金属と必須金属の両方に関する情報を収集することかできた。また、その金属の化学形態についての情報も得られた。一方、別の評価項目として、きのこ中の有害成分とされる hydrazine 誘導体類について、ヒトラシノ基に着目し、DMEQ COCl を用いた蛍光ラベル化法による選択的かつ高感度な分析法を確立した。

分担研究者

近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所食品部主任研究官）

米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品部部長）

A 研究目的

一般的にキノコには毒性物質として hydrazine の存在が古くから確認されている。*Agaricus* 属キノコには agaritine という phenylhydrazine 誘導体が含まれており、その毒性について指摘されている。一方、いわゆる健康食品としての人気が高いアカリクス茸は数ある *Agaricus* 属の中の *Agaricus blazei* Murill というキノコを指すか、agaritine を含め hydrazine 化合物含有についての報

告かない。そこで、食品の安全性確保を目的に *Agaricus* 属キノコに広く含有している agaritine およびその代謝分解物である誘導体について、広く検討する必要がある。本研究では、agaritine を含む一連の phenylhydrazine 化合物について、LC/MS/MS システムを用いた構造確認を含めた分析法の開発を行う。また、その他の hydrazine 化合物についても検討対象とする。これらの研究から、毒性が懸念される hydrazine が検出され

た場合には、毒性試験などの早急な対応が可能となる。

また、アガリクス茸を含むキノコ類は有害重金属、特にカドミウムを蓄積しやすいことか、以前から知られている。逆にその性質は、必須ミネラルも吸収しやすいことを示唆している。一方、いわゆる健康食品として販売されているアガリクス製品には、菌糸体を培養した製品も多い。その場合には、有害重金属の混入はなくなるか、逆に必須金属も減少している可能性もある。また、特定の重金属を培養液に添加し、金属含量を操作している可能性もある。そこで、アガリクス茸を含むキノコ類中の有害 必須金属含量を、ICP/MS により多元素同時分析し、注目すべき濃度が検出された元素については、それかどのような成分と結合しているかの化学形の解析を、成分の分離手段である HPLC と直結させた HPLC-ICP/MS を用いて行うことにより、生体への影響を考察する。

B 研究方法

1 標準物質の合成・リスク評価

agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成 agaritine および hydrazine 誘導体合成研究は、Subir Datta らの報告 (Helvetica Chimica Acta, 70 1261-1267, 1987) をもとに行った。

Agaritine の UV 検出 HPLC 法

抽出操作 アガリクス製品 1g をメタノール 30 ml で 3 回抽出し、溶媒を 40°C 以下で減圧留去した。前処理操作 抽出操作後、0.01% 酢酸 メタノール (90/10) 3 ml に溶解し、その 1 ml を Bond Elute C18 (500 mg 充填量) に負荷し、0.01% 酢酸 メタノール (90/10) でさらに 2 ml 溶出し、吸着する黄色色素などを除いた。調製したサンプルは、必要に応じ 10~1000 倍希釈して測定した。

検査方法 紫外可視吸収 (UV) 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法は以下の通りである。分析条件 分離カラム (Inertsil ODS-3, 4.6 x 150 mm) カラム温度 (35°C)、移動相 (0.01% 酢酸 メタノール = 99/1)、検出器 (254 nm)、試料注入量 (20 µl)

2 担子菌類中の hydrazine 化合物 agaritine の新規 LC/MS/MS 分析法開発

2.1 試料

アガリクスキノコ製品は、乾燥品または栄養補助成分を添加した製品 (顆粒、錠剤、カプセル) を用いた。顆粒、錠剤試料は、粉砕器により完全に粉末状にしたものを使用した。カプセルは、カプセルを取り除き、中の粉末だけを使用した。マノシュルーム、シイタケ、マイタケ、フナシメシ、エリンギは東京都内のスーパーから国内産を購入し、ミルを用いてメタノール中でホモンネートし試料とした。

2.2 装置

粉砕器は、IKA Works 製、ミルは、Resch GM200 Laboratory knife Mill を用いた。

質量分析装置は、Applied Biosystems 社製 API-3000 を、イオン化 ESI, negative モードで用いた。LC は、Agilent 製 1100series を用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂, 3 µm 2.1 x 150 mm) を主に用い、検討用として ODS-3 (GL サイエンス, 3 µm, 2.1 x 150 mm)、水系順相カラム HILIC (SeQuant, 5 µm, 2.1 x 150 mm) を用いた。

2.3 抽出および前処理操作

アガリクスキノコ製品はその 1g をメタノールで 3 回 20 分間振とう抽出後、溶媒留去した。生試料 (マノシュルーム、シイタケ、マイタケ、フナシメシ、エリンギ) は、40g を 200 ml のメタノールでホモンネートし、均一なホモンネートから 30 ml を用いて 3 回 20 分間振とう抽出後、溶媒留去した。得られた各抽出物に対し、0.01% 酢酸 メタノール (9/1) 3 ml 加え溶解し、その 1 ml を Bond Elut C18 カラムに負荷し、黄色色素を保持させた。さらに 0.01% 酢酸 メタノール (9/1) 2 ml 加え溶出、計 3 ml を LC/MS/MS 分析用検液とした。

2.4 agaritine の安定性試験

agaritine 標準品 10 µg/ml の水溶液を、4°C, 25°C, 60°C, 100°C の各温度で 24 時間放置し、agaritine の安定性を検討した。

アガリクスキノコ乾燥品は、5g を急須に入れ、600 ml の熱湯を注ぎその後放置または 23°C, 80°C で放置し、15, 30 分、1, 2, 4, 8 時間後に抽出液を抜き取り、フィルター濾過後、agaritine 量の変化を測定した。測定には、HPLC-UV 検出法を

用いた。

3 担子菌類中の必須・有害金属の分析

3.1 文献調査

データベースとして MEDLINE および STN を用いて、キノコに含まれる金属に関する文献調査を行った。また、国内外における学会発表要旨についても調査した。

3.2 試料

hydrazine 類として、hydrazinobenzoic acid (HBA) は、合成したものを使用した。その他の phenylhydrazine 類である phenylhydrazine (PH)、4-methylphenylhydrazine (MPH)、4-hydroxymethyl phenylhydrazine (HMPH) および他の用いた試薬は、すべて市販特級品を用いた。

3.3 装置

高速液体クロマトグラフィー(HPLC) Shimadzu LC-10Avp system (島津製作所(株)製)

質量分析装置(MS) API-3000 MS system (Applied Biosystems 社), ion source, electro spray ionization (ESI), PhotoSpray™, positive mode

核磁気共鳴スペクトル(NMR) JEOL alpha-500 (日本電子(株)製)。homonuclear shift correlation spectroscopy (COSY)、heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) 及び heteronuclear multiple bonds correlation (HMBC)、nuclear overhauser effect (NOE)には磁場勾配システムを用いた。NMR のケミカルシフト値は、TMS (tetramethylsilane) を基準とした。

3.4 HPLC 条件

Analytical conditions column, TSK-GEL ODS 80Ts (4.6 mm ID x 150 mm, TOSOH), column temp, at room temp, solvent A, MeOH 0.2 M phosphate buffer (pH 6.7)= 30:70 solvent B, MeOH 0.2 M phosphate buffer (pH 6.7)= 70:30, Gradient condition, solvent B (0%, 0-25 min)→(0-50%, 25-26 min)→(50%, 26-50 min)→(50-100%, 50-51min)→(100%, 51-75 min), inject, 20 µL flow rate, 1.0 mL/min, detect, Ex 393 nm, Em 448 nm。

3.5 蛍光ラヘル化反応

ヒトランノ基に着目し、DMEQ-COCl (3-chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-

quinoxalimone)により、hydrazine 類を蛍光誘導体化した。すなわち試料(100 µL)に 5 mM DMEQ-COCl のメチルホルムアミド溶液(100 µL)を加え、この混液を一般には 37°C で 60 min 反応させた。反応終了後、HPLC 移動相 (800 µL)を加えた後、カラムに負荷した。

3.6 phenylhydrazine 蛍光ラヘル化体の構造確認

PH の蛍光ラヘル化体を大量に分取するため、OASIS HLB を用い、粗精製を行った。すなわち、まず 5 mM DMEQ-COCl の DMF 溶液 7 ml と 10 mM PH 水溶液 7 ml を混合し、密閉、暗所にて 37°C、60 min 加温した。これに、5% MeOH 56 ml を加えた後、OASIS HLB (1 g/20 ml)に負荷し、50% MeOH で洗浄後、100% MeOH で phenylhydrazine の蛍光ラヘル化体を溶出し、溶出画分を濃縮後、分取用カラム(Inertsil ODS-3 (10 id x 250 mm)に負荷し、MeOH/水 (65/35)を溶離液とし、流速 3 ml/min にて、phenylhydrazine の蛍光ラヘル化体のピークを分取し、濃縮した。これをまず ¹H-NMR および ¹³C-NMR (DMSO, dimethylsulphoxide) で構造決定および精製度を確認した後、MS の分析を行った。

3.7 反応時における WSC とピリシンの存在による影響

ピリシン共存下での蛍光ラヘル化反応の実験は、ピリシンの最終濃度 15%で実施した。WSC (water soluble carbodiimide, 別名 EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)は最終濃度 50, 100 mM になるように添加した。

C 研究結果

1 標準物質の合成 リスク評価

agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成

4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH、C₇H₁₀N₂O) に関しては Exact Mass 138.08400 mg で MS(FAB⁺)解析により 161.17(M+Na)のイオンが得られた。本化合物は非常に不安定であり、H₂O、O₂によって分解する傾向を示した。しかし Ar 下、-5°C で少なくとも一週間保存可能であった。また熱耐性は高く、最も適した精製法は bulb-to bulb を用いた昇華法であった。4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD) (C₇H₇BF₄N₂O) に関しては、Exact

Mass 222 06222mg で、本化合物も非常に不安定であり、空気中ですくりに分解し、赤色に着色 溶解してしまう傾向があった。そのため N₂ または Ar 下で取り扱った。しかし熱に弱いため、-80℃で保存を行った。 agartine-carboxyl type (C₁₂H₁₃N₃O₄) Exact Mass 281 10150mg であり、MS(FAB⁺)解析により 282 15(M+H)イオンが検出された。本化合物については文献の報告がなく、安定性等については不明であったか、吸湿性があるようなので、Ar 置換し-80℃で保存をおこなった。

agartine (C₁₂H₁₇N₃O₄) に関しては Exact Mass 267 1250 m g で MS(FAB⁺)解析により 268 36(M+H)が検出された。本化合物も非常に不安定であり、空気中で O₂ により分解し、水溶液 (open vial) 中で 48 時間することか判明した。Closed で Milli-Q water 使用、N₂置換ならば若干分解は抑えられた。また 4~22℃で分解し、酸性条件ではさらに分解が早まり、O₂、熱に非常に弱いため、N₂または Ar 置換し、-80℃で保存をおこなった。

Agartine の UV 検出 HPLC 法

確立した UV 検出 HPLC 法を用いてアガリクス中の agartine の含有量実態調査を行ったところ、乾燥品は他の栄養補助成分等を一切含まないために、製品重量あたりの agartine 含量は高かった (>1500 µg/g 製品)。一方、菌糸体製品と書かれたものは含量が低かった (14 µg/g 製品)。その他の製品は 1 製品 (261 µg/g 製品) を除き含有量は低かった (<20 µg/g 製品)。添加回収実験は agartine 含量が低い検体および高い検体それぞれ 1 検体について行った。回収率は抽出から前処理精製までの全操作で 73.1%、前処理操作のみでは 97.5%であった。

2 担子菌類中の hydrazine 化合物 agartine の新規 LC/MS/MS 分析法開発

2.1 検量線

agartine の分子量 267 (exact mass 267 1219) から、まず疑似分子イオンピークの検出を行い、negative モード、*m/z* 266 が検出された。positive モードでは明確なピークが観察されなかった。キノコ試料中の agartine を高選択的に分析定量するために、

LC/MS/MS 法を採用した。そこで、疑似分子イオンピーク *m/z* 266 から得られるフラグメントピークを検索したところ、*m/z* 122, 248 に分解されたフラグメントが得られた。

得られた 2 つのフラグメントピーク (*m/z* 122, 248) を用いて agartine 標準品の検量線を作成したところ、いずれの場合も 0.01~10 µg/ml の範囲で良い直線性が得られた (*r*² = 0.999 以上)。なお、検出に *m/z* 122 を用いた方が測定上のばらつきが少なかったため定量にはこれを用い、確認用には、*m/z* 122 より約 2 倍感度が高い *m/z* 248 を用いることとした。

2.2 抽出溶媒の検討

キノコ試料は、多くの炭水化物を含んでいるため、抽出溶媒に含水溶媒を用いると抽出物の量が倍増し、形状から多くの糖類が抽出されたと考えられた。そのため、極性の高い agartine の抽出においても、メタノールなどの有機溶媒のみが望ましいと考えられた。そこで、抽出にメタノールおよびアセトニトリル、試料にアカリクスキノコ 1 製品を用いて分析までの一連の操作での回収率を検討した。その結果、メタノール抽出ではほぼ 100%回収されるのに対し、アセトニトリル抽出では 50%未満であった。

2.3 前処理の検討

agartine は、グルタミン酸と HMPH が縮合した両イオン性化合物である。また、酸、アルカリ条件では容易に分解される。はじめに、agartine 標準液を用い、以下の検討を行った。

1) 選択性の高い陽イオン交換カラム SCX を用いる方法。—— 本法では agartine を保持させるために、塩酸酸性 (pH1) に調整しカラムに負荷。1M アンモニア水で溶出を行った。その結果、agartine の約 10%しか回収されず、ほとんどが分解されたものと考えられた。また、キノコ特有の黄色色素も全く除去できなかった。

2) 逆相系カラム C18 を用いる方法。—— 0.01% 酢酸 メタノール (9:1) に溶解した試料溶液を Bond Elut C18 (500 mg) に負荷することにより agartine は保持されないものの、黄色色素をほぼ完全に吸着除去できた。

3) その他の逆相系カラムであるポリマー系カラム

SDB ても 2) と同様の検討を行った。2) と同様 agaritine はほとんど保持されないか、agaritine の完全な溶出に多くの溶媒が必要であり、最終検液が希釈されるのみであった。

2.4 agaritine の熱安定性

1) agaritine 標準品水溶液 (10 µg/ml) を調整し、4°C、25°C、60°C、100°C での安定性を検討した。その結果、60°C までは 24 時間以内にほとんど分解されないか、100°C では、1 時間後から分解が始まり、その後急速に分解が進行すること分かった。また、agaritine の分解に比例して、HMPH が生成してくることも分かった。

2) アガリクスキノコ乾燥品について、80°C 放置では、agaritine 標準品同様急速に分解し、8 時間後では大部分が分解された。しかし、実際の摂取条件により近い条件である急須に熱湯注ぎ、その後室温放置の条件では、8 時間後でもほとんど agaritine は分解されなかった。15 分から 4 時間では、agaritine は分解されないか、抽出されてくるため、agaritine 濃度は最も高かった。

2.5 agaritine 分析に用いる HPLC 用カラムの検討

両イオン性で高極性である agaritine の保持時間、ピークの挙動を、逆相系 ODS 2 種および水系順相 HILIC カラムで検討した。その結果、ODS-3 カラムでは agaritine の保持時間は 61 分 (移動相 0.01% 酢酸 メタノール=99/1) であるか、移動相をいったん止めた後、分析を開始すると保持時間が早くなった。移動相に 99% 水系溶媒を用いているため、典型的なカラム上の炭素鎖の巻き込み、細孔からの移動相の抜けによる現象が見られた。また、ODS-3 を用いて実試料を分析すると同一試料においても測定値の変動が大きく (40%) 問題があった。一方、100% 水系移動相での使用かできる Capcellpak AQ は保持時間の変動、測定値の変動もなく良好であった。また、agaritine の保持時間は (移動相 0.01% 酢酸 メタノール=99/1)、炭素率が少ないためか少し早くなり 52 分であった。

次に、agaritine と夾雑物との分離をできるかぎりよくすることを考え、強い保持が期待されるカラムとして水系順相 HILIC カラムを検討した。しかし、2 本に割れたフロートなピークが得られ、

agaritine の分析には不相当と考えられた。

2.6 アガリクスキノコ製品中の agaritine 含量

アガリクスキノコ 9 製品について、agaritine 含量の実態調査を行った。乾燥品試料中の agaritine 含量は、1437~2017 µg/g dry、製品中 agaritine 含量は、一部 279 µg/g dry と高いものがあったか、その他の製品 5 種には ND~128 µg/g dry と agaritine 含量は低かった。検出下限は、0.05 µg/g dry であった。

2.7 その他のキノコ中の agaritine 含量

マノシュルームには、198 µg/g wet の agaritine が検出されたか、それ以外のキノコ中には agaritine は検出されなかった。agaritine は *Agaricus* 属キノコに特有の hydrazine 化合物を考えられた。検出下限は、0.05 µg/g wet であった。

3 担子菌類中の必須 有害金属の分析

3-1 キノコ中の金属含量に関する文献調査

一般的に、土壤中の金属量とそこで生育した植物中の金属量との相関性は植物により様々な結果が報告されている。キノコはカトミウムを取り込みやすいことかよく知られ、重金属汚染か懸念されるか、古い報告か多かつた。さらに、放射性同位体のセシウム 137 を含むという報告も多かつた。実際に輸入食品についても、最近でも高いレベルのものか報告されている。化学形を調べた報告の中で、シイタケにおいて、セレンかセレンメチオニンとして存在することか明らかにされていた。アガリクス属のキノコやシイタケに含まれるカトミウムか高分子タンパク質に結合しているとの報告かあつた。ヘニテングタケ中に含まれるアマハニンかハナシウムとカルニウムを含有する化合物であること、キノコ類には、ハナシウムを含むたんぱく質としてクロロペルオキナーゼか存在することか報告されていた。

3-2 hydrazine 誘導体類の蛍光ラベル化による一斉分析

1) 移動相緩衝液濃度の HPLC 上の分離に与える影響

DMEQ-COCl 由来のピークと HBA の蛍光ラベル化体 (HBA-DMEQ) 由来のピークを分離して検出するために、移動相の緩衝液濃度の影響を検討

した。緩衝液濃度を高くすると、両者のピークを分離して検出できるようになった。

さらに、HPLCの移動相としては、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) と MeOH によるグラシエント溶出が最適であることが明らかになった。

2) 蛍光ラヘル化体の Ex と Em

PH および MPH の蛍光ラヘル化体の蛍光スペクトルは、Ex 393 nm, Em 448 nm 付近に極大波長がみられた。一方、HBA では Ex 414 nm, Em 470 nm 付近に極大波長がシフトしたか、蛍光強度は前者の波長で測定した場合と大きく変わらないことから、hydrazine 類の分析は Ex 393 nm, Em 448 nm の波長で行えるものと考えられた。

3) 蛍光ラヘル化反応における加熱温度および反応時間の検討

HBA においては、37°C よりも 100°C での加温の方が、蛍光ラヘル化反応が促進された。いずれの温度においても 60 min の加温により、ほぼ 100% 反応が進行することかわかった。HMPH、PH、MPH においては、100°C に比し 37°C の方が、蛍光ラヘル化反応が促進された。その場合、40 min の反応時間で反応が終了することかわかった。

4) 蛍光ラヘル化反応における WSC およびピリシンの影響

DMEQ-COCl を用いる場合、緩和な条件で反応性を上げるために、WSC (water soluble carbodiimide, 別名 EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino-propyl)carbodiimide) やピリシンの共存下で蛍光ラヘル化反応を行うことが多い。そこで、hydrazine 誘導体の蛍光ラヘル化反応におけるこれらの影響を調べたところ、4つの hydrazine 類のいずれにおいても、WSC およびピリシンを加えない方が反応が進行した。

5) PH の蛍光ラヘル化体の構造確認

蛍光ラヘル化体の構造を確認するため、¹H-NMR、¹³C-NMR および MS (API-3000, positive, ESI および PhotoSpray) の測定を行った。

5-1) ESI 法による結果

PH の蛍光ラヘル化体 (PH-DMEQ) (MW 354.36) では、positive モードで PH の [M+H]⁺ に相当する m/z 109 のイオンが検出された。親イオンの [M+H]⁺ に相当する m/z 355 のイオンは、電圧など

を変更しても、強度はあまり変わらなかった。

5-2) PhotoSpray 法による結果

蛍光ラヘル化体 (MW 354.36) では positive モードで、m/z 108 の M⁺ イオンが検出されたか、m/z 109 の [M+H]⁺ イオンは検出されなかった。親イオンの [M+H]⁺ イオンの m/z 355 や M⁺ イオンの m/z 354 の強度は小さく、電圧などを変更しても、あまり強度は変わらなかった。一方、PH (MW 108.14) では、positive モードで m/z 108 の M⁺ イオンと m/z 109 の [M+H]⁺ イオンの両方が検出された。

D 考察

今回のマノンジュールームおよびアカリクス製品中の agartine 含量実態調査結果から、市販されている製品のうち、一部の製品 (アカリクス茸の乾燥品) には、マノンジュールーム同様に高濃度 (1500 µg/mL 以上) の agartine が含まれていることが明らかとなった。それ以外の添加物等を混ぜたアカリクス加工製品中の多くにも agartine が 3.6~261 µg/mL 含まれていた。アカリクス加工製品中での agartine 含量がアカリクス茸の乾燥品よりかなり低いのは、アカリクス加工製品がヒタミン、アミノ酸などの栄養補助成分を添加しているためアカリクス茸成分含量が製品重量当たり低いこと、およびその加工過程の違いによると思われる。

LC/MS/MS 法で m/z 122, 248 を用いた agartine 定量が、アカリクスキノコ製品中など夾雑物が多い試料においても、妨害を受けず正確に行えることができた。アカリクスキノコ製品中 agartine 含量は、乾燥品が無添加でキノコ成分のみを含むため、2000 µg/g dry と高濃度に検出された。栄養補助成分を添加したアカリクスキノコ製品中では、一つ 279 µg/g dry 検出されたものがあった他は、ND ~128 µg/g dry と低濃度であった。これは、キノコ本来の含量比率が低いことと、加工段階で分解されるためと考えられる。

また、agartine は 80~100°C 恒温放置では 1 時間後から急速に分解されるか、熱傷を急須に入れ室温放置した場合は、8 時間後でもほとんど agartine が分解されず残っていた。このことから、実際の摂取の仕方である、熱湯で煎して飲む、というやり方では agartine はかなりの量摂取してい

る可能性が示唆された。

Agaricus 属以外のキノコ中には *agaritine* は今回検出されなかった。*agaritine* は、*Agaricus* 属に特有の *hydrazine* 化合物と考えられた。

agaritine は変異原性が報告されているか、アガリクスキノコ全体では変異原性がないとされている。今回、アガリクスキノコ乾燥品中には 2,000 $\mu\text{g/g dry}$ と高濃度検出された。実際の摂取においても、キノコ全体では毒性が全くないかはさらに検討が必要であると考えられる。また *agaritine* の毒性に関しては、また未知な部分が多く正確な毒性評価に関しては今後の研究が必要であることが示唆された。さらに併せて引き続き正確な *agaritine* を含む *hydrazine* 化合物の分析学的研究、さらには生体の代謝実験を行う必要性が示唆された。

キノコ中金属含量の分析装置としては、原子吸光分光光度計、ICP 発光分析装置や ICP 質量分析計（四重極型）が用いられている。一方、金属の化学形態の分析は、その画分を分画して分析する方法と、分離手段と分析手段をオンラインで直結した方法、たとえば HPLC/ICP-MS 法が使用されていた。

ハナシウムは抗糖尿病作用が注目されている元素で、二重収束型 ICP-質量分析計を用いないと、生物試料中の精密な分析は難しい元素である。生体内では、超微量なレベルでしか存在せず、血中の存在形態は昨年明らかにされたばかりである。一方、環境中（水中）ハナシウム濃度が高い地域のタンポポにおいて、ハナシウム濃度が高いことが示されており、また、動物のホヤ中に含まれているという報告がある。このハナシウムについては、ヘニテングタケ中にハナシウム含有化合物の存在が知られており、興味深い。

いわゆる健康食品としてキノコを培養で生産する場合に、培地中に金属を添加することが考えられる。したがって、キノコ中の有害物質の評価項目の 1 つとして、ハナシウムを含めた有害・必須金属を二重収束型 ICP-質量分析計で一斉分析し、さらに、多量に含まれている場合にはその化学形態を調べることにより、キノコ類を評価することができると考えられる。

hydrazine 誘導体類の蛍光ラベル化法による一斉分析を検討した。DMEQ-COCl はアミノ基との反応性か、他のラベル化剤の FITC 試薬や NBC 試薬よりも非常に強いことが知られている。そこで今回、DMEQ-COCl を蛍光ラベル化剤として用い、*hydrazine* 誘導体中のヒトランノ基とアミト結合を形成させて蛍光ラベル化を行った。DMEQ-COCl は水が存在すると分解されやすいため、試料を添加しない場合においても、クロマトグラム上に多数のピークが見られた。この試薬の分解によるピークと HBA-DMEQ の保持時間が近かったため、これらを分離するために、HPLC 移動相の pH およびイオン強度を検討した。その結果、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) と MeOH によるクラレント溶出が分離に最適であった。また、*hydrazine* 類の分析は Ex 393 nm, Em 448 nm の波長で行えると考えられた。

蛍光ラベル化体の構造は、NMR と MS により確認された。PhotoSpray 法では、H との親和性が低いサンプルでは M^+ イオン、H との親和性が高いサンプルでは $[M+H]^+$ イオンが主に観測される。PH では M^+ と $[M+H]^+$ の両方が検出されたことから、H との親和性は高くないと考えられた。したがって PH よりも構造的に大きい蛍光ラベル化体は、さらに PhotoSpray 法ではイオン化されにくいものと考えられた。したがって、ESI 法においても PH-DMEQ の親イオンは検出されにくいことが明らかにされた。

食品中の *hydrazine* 類の分析にあたっては、食品中の蛍光ラベル化される化合物すなわちアミノ基を有する化合物の蛍光ラベル化体が、クロマトグラム上で、*hydrazine* 誘導体の蛍光ラベル化体のピークと重なることが懸念される。しかし、食品中でアミノ基を有しかつ高濃度で存在するアミノ酸は、そのカルボキシル基の存在のため、保持時間は *hydrazine* 誘導体とは大きく異なることが予想される。したがって *hydrazine* 誘導体の分析には影響を与えないと考えられる。今後は、アミノ基を有する他の食品成分との分離定量的ための検討が必要と考えられる。

E 結論

Agaritine は、 m/z 122 248 をモニターイオンとす

る LCMS/MS 法で、複雑なマトリクス中においても妨害を受けず正確に定量可能であった。

アカリクスキノコ乾燥品中には 2,000 µg/g dry と高濃度検出された。その他の製品中には、ND ~279µg/g dry 検出された。Agaricus 属以外のキノコ中には agaritine は今回検出されなかった。

アカリクス茸中の金属含量および化学形態について評価を行うにあたり、まず文献調査を実施し、情報を収集した。hydrazine 類の測定を、DMEQ-COCl を用いた蛍光誘導体化法により、迅速かつ高感度に行える方法を確立した。食品中の hydrazine 類分析への応用を検討中である。

F 健康危険情報

現在のところなし。

参考文献

- 1 Bela, T, Donald, N, Kashnath, P, James, E, Kenneth, A Tumor induction with the N'-acetyl derivative of 4-hydrozylmethylphenylhydrazine, a metabolite of agaritine of *Agaricus bisporous* Cancer Res, 38, 177-180 (1978)
- 2 Bela, T Ksmath, P, Hwan-Soo, J Carcinogenesis of 4-hydrozylmethylbezene diazonium ion (tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporous* Cancer Res, 41, 2444-2449 (1981)
- 3 Kim, W, Maurice, M C, Ron, W, Costas, I Bioactivation of mushroom hydrazines to mutagenic products by mammalian and fungal enzyme Mutat Res, 381, 131-139 (1997)
- 4 K. Walton M M Coombs, F S Catterall, Bioactivation of the mushroom hydrazine, agaritine, to intermediates that bind covalently to proteins and induce mutations in the Ames test Carcinogenesis, 18, 1603-1608 (1997)
- 5 K Walton, R Walker, C Ioannides Effect of baking and freeze-drying on the direct and indirect mutagenicity of extracts from the edible mushroom *Agaricus bisporous* Food Chem Toxicol, 36, 315-320 (1998)
- 6 H C Anderson J Hajslova V Shulzova, Z Panovska L Hajkova J Gry Agaritine content in processed foods containing the cultivated mushroom on the Nordic and the Czech market Food Additives

Contam 16 439-446 (1999)

7 Kim W, Maurice, M C, Laurie, J K, Ron, W, Costas, I Fate of the mushroom hydrazine agaritine in the rat and mouse Nutr Cancer, 37 55-64 (2000)

8 Roberta, D D, Patricia L A de L, Marina, M S, Augusto, F da E, Daisy, M F S, Gunter, S, Lucia, R. R Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide Mutat Res, 496, 15-21 (2000)

9 J M de Oliveira, B Q Jordão, L R. Ribeiro, A F da Eira M S Mantovani Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro Food Chem Toxicol 40, 1775-1780 (2002)

G 研究発表

論文発表

Nagaoka MH, Akiyama H, Maitani T Binding patterns of vanadium to transferrin in healthy human serum studied with HPLC/high resolution ICP-MS The Analyst, 129, 51-54 (2004)

学会発表

- 1 近藤一成, 阿部 郁朗, 田中秀弥, 長岡 (兵野) 恵, 穠山 浩, 米谷民雄 LC/MS を用いたアカリクス中 agaritine の分析 第 83 回日本食品衛生学会 (2003, 10)
- 2 蛍光誘導体化による食品中ヒトラシン類の分析法の検討、長岡(兵野)恵, 長岡寛明, 武田健, 近藤一成, 穠山浩, 米谷民雄、日本薬学会第 124 年会(大阪) (講演要旨集 3, p 42)

H 知的財産権の登録

なし

Ⅱ 分担研究報告書

1 標準物質の合成・リスク評価

穂山 浩

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

分担研究報告書

標準物質の合成・リスク評価

分担研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨 担子菌類中の有害成分である agaritine と、その代謝物と思われる 4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine（HMPH）、4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD) および agaritine-carboxyl type を化学合成した。また合成したアカリチンを標準物質として紫外部吸収検出 HPLC 法により、分離分析を開発し、健康食品中のアカリチン分析法を確立した。

協力研究者 阿部郁朗、田中秀弥（静岡県立
大学薬学部）

A 研究目的

一般的にキノコには毒性物質としてヒトランンの存在が古くから確認されている。Agaricus 属キノコには agaritine という phenylhydrazine 誘導体が含まれており、その毒性について指摘されている。一方、健康食品としての人気が高いアカリクス茸は数ある Agaricus 属の中の Agaricus blazei Murill というキノコを指すか、agaritine を含めヒトランシン化合物含有についての報告がない。そこで、食品の安全性確保を目的に Agaricus 属キノコに広く含有している agaritine およびその代謝分解物である誘導体について、広く検討する必要がある。本研究では、agaritine を含む一連の phenylhydrazine 化合物について、分析法の開発の標準品確保のために化学的合成を行った。また合成したアカリチンを標準物質として紫外部吸収検出 HPLC 法により、分離分析を開発し、健康

食品中のアカリチン分析法を確立した。

B 研究方法

agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成

アカリチンおよびヒトランシン誘導体合成研究は、Subur Datta らの報告 (Helvetica Chimica Acta 70, 1261-1267, 1987) をもとに行った。

Agaritine の UV 検出 HPLC 法

抽出操作 アカリクス製品 1g をメタノール 30 ml で 3 回抽出し、溶媒を 40℃以下で減圧留去した。前処理操作 抽出操作後、0.01%酢酸メタノール (90/10) 3 ml に溶解し、その 1 ml を Bond Elute C18 (500 mg 充填量)に負荷、0.01%酢酸メタノール (90/10) でさらに 2ml 溶出し、吸着する黄色色素などを除いた。調製したサンプルは、必要に応じ 10~1000 倍希釈して測定した。

検査方法 紫外可視吸収 (UV) 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法は以下の通りである。分析条件 分離カラム (Inertsil ODS-3, 4.6 x 150 mm) カラム温度 (35℃)、

移動相 (0.01%酢酸 メタノール = 99/1)、検出器 (254 nm)、試料注入量 (20 μ l)

C 研究結果

agartine を含む phenylhydrazine 化合物の合成

4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH、 $C_7H_{10}N_2O$) に関しては Exact Mass 138.08400 mg で MS(FAB⁺)解析により 161.17(M+Na)のイオンが得られた。本化合物は非常に不安定であり、 H_2O 、 O_2 によって分解する傾向を示した。しかし Ar 下、 $-5^{\circ}C$ で少なくとも一週間保存可能であった。また熱耐性は高く、最も適した精製法は bulb-to bulb を用いた昇華法であった。4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD) ($C_7H_7BF_4N_2O$) に関しては、Exact Mass 222.06222mg で、本化合物も非常に不安定であり、空气中ですくりに分解し、赤色に着色溶解してしまう傾向があった。そのため N_2 または Ar 下で取り扱った。しかし熱に弱いので、 $-80^{\circ}C$ で保存を行った。agartine-carboxyl type ($C_{12}H_{15}N_3O_5$) Exact Mass 281.10150mg であり、MS(FAB⁺)解析により 282.15(M+H)イオンが検出された。本化合物については文献の報告がなく、安定性等については不明であったか、吸湿性があるようなので、Ar 置換し $-80^{\circ}C$ で保存をおこなった。

agartine ($C_{12}H_{17}N_3O_4$) に関しては Exact Mass 267.1250 mg で MS(FAB⁺)解析により 268.36(M+H)が検出された。本化合物も非常に不

安定であり、空气中で O_2 により分解し、水溶液 (open vial) 中で 48 時間することか判明した。

Closed で Mill-Q water 使用、 N_2 置換ならば若干分解は抑えられた。また $4\sim 22^{\circ}C$ で分解し、酸性条件ではさらに分解が早まり、 O_2 、熱に非常に弱いので、 N_2 または Ar 置換し、 $-80^{\circ}C$ で保存をおこなった。

Agartine の UV 検出 HPLC 法

図 1 には、標準品アカリチンおよび健康食品アカリクス 2 種から調製した試料のクロマトグラムを示した。健康食品アカリクス 9 検体中のアカリチンの含有量実態調査結果は、次の表 1 に示した通りである。乾燥品は他の栄養補助成分等を一切含まないために、製品重量あたりのアカリチン含量は高かった ($>1500 \mu g/g$ 製品)。一方、菌糸体製品と書かれたものは含量が低かった ($14 \mu g/g$ 製品)。その他の健康食品は 1 製品 ($261 \mu g/g$ 製品)を除き含有量は低かった ($<20 \mu g/g$ 製品)。添加回収実験はアカリチン含量が低い検体および高い検体それぞれ 1 検体について行った。表 2 に示した通り、回収率は抽出から前処理精製までの全操作で 73.1%、前処理操作のみでは 97.5%であった。

D 考察

今回のマノシュルームおよびアカリクス製品中のアカリチン含量実態調査結果から、市販されている製品のうち、一部の製品 (アカリクス茸の乾燥品) には、マノシュルーム同様に高濃度

(1500 µg/ml 以上) のアカリチンが含まれていることか分かった。それ以外の添加物等を混せたアカリクス加工製品中の多くにもアカリチンが 36~261 µg/ml 含まれていた。アカリクス加工製品中でのアカリチン含量がアカリクス茸の乾燥品よりかなり低いのは、アカリクス加工製品がビタミン、アミノ酸などの栄養補助成分を添加しているためアカリクス茸成分含量が製品重量当たり低いこと、およびその加工過程の違いによると考えられる。

E 結論

担子菌類中の有害成分である agaritine と、その代謝物と思われる 4-hydrazinobenzyl alcohol、4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD) および agaritine-carboxyl-type を化学合成

した。また合成したアカリチンを標準物質として紫外吸収検出 HPLC 法により、分離分析を開発し、健康食品中のアカリチン分析法を確立した。その方法をマノシュルームおよび健康食品アカリクスに適用したところ、一部の製品に高濃度のアカリチンが含有されていることが判明した。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

特になし

H 知的財産権の登録

なし

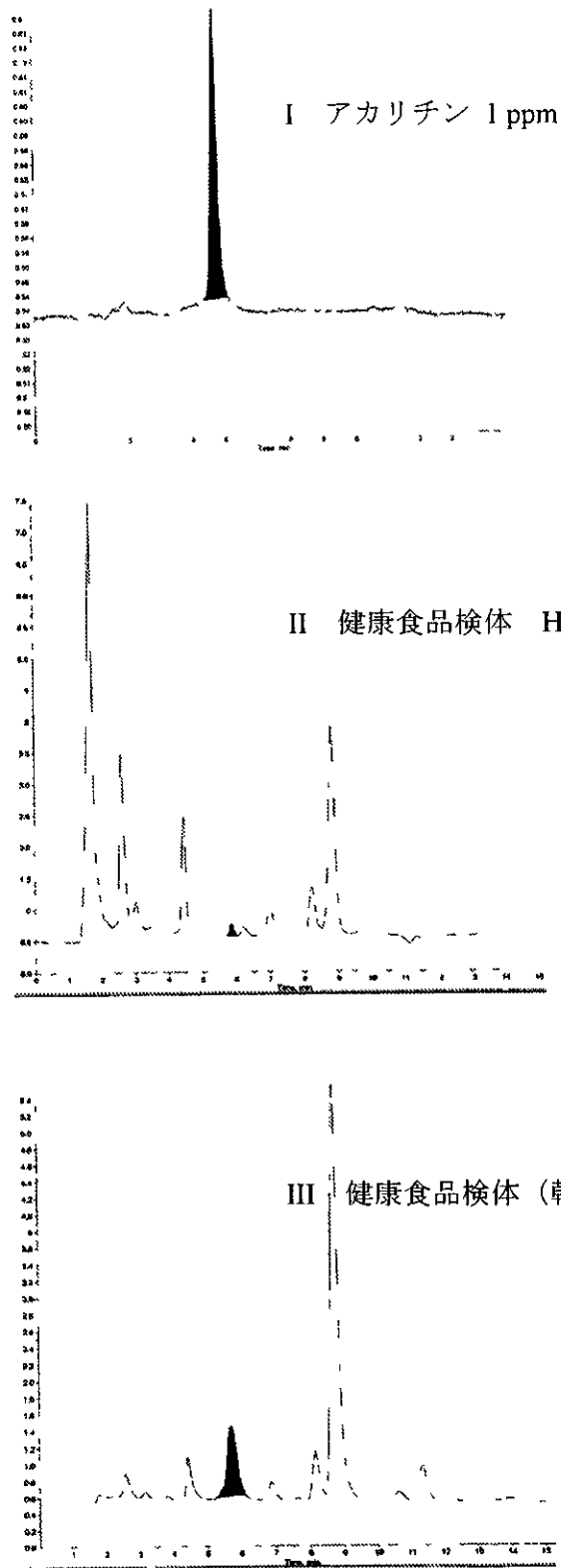


図1 アガリクス検体のクロマトグラム

表 1

	アガリクス検体	製品	含有量 (μg/g 製品)
1	乾燥品	A	1,529
2	乾燥品	B	1,574
3	乾燥品	C	1,715
4	菌糸体培養物	D	14
5	健康食品 (栄養補助成分添加)	E	3.6
6	健康食品 (栄養補助成分添加)	F	N D
7	健康食品 (栄養補助成分添加)	G	261
8	健康食品 (栄養補助成分添加)	H	8.6
9	健康食品 (栄養補助成分添加)	I	N D

*N D 定量下限未満 (<0.2 μg/g 製品)

表 2

検体 製品名	回収率 (%)				
	1	2	3	平均	RSD
1 乾燥品 B	95.1	96.3	101	97.5	0.9
2 健康食品 (栄養補助成分添加) H	73.3	70.9	75.2	73.1	0.6

検体 1 前処理操作における回収率

検体 2 全操作での回収率 (10 ppm 添加時)

II 分担研究報告書

2 担子菌類中のヒドラジン化合物アガリチンの 新規 LC/MS/MS 分析法開発

分担研究者 近藤 一成

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

分担研究報告書

担子菌類中のヒトラシン化合物アガリチンの新規 LC/MS/MS 分析法開発

分担研究者 近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨

担子菌類であるキノコ中のヒトラシン化合物の一つ、変異原性が報告されているアガリチン（ β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine, 一般名 agaritine) を、LC/MS/MS を用いて定量用に m/z 122, 確認用に m/z 248 を用いる高選択的高感度分析法を開発した。この方法を用い *Agaricus* 属キノコおよび *Agaricus* 属以外の各種キノコを分析した結果、アカキクスキノコ製品 (*Agaricus blazei* Murill) 中には、ND ~ 最大 2,017 $\mu\text{g/g dry}$, マノシユルーム (*Agaricus bisporous*) 中には 198 $\mu\text{g/g wet}$, のアガリチンが検出された。シイタケ (*Lentinus edodes*), マイタケ (*Grifola frondosa*), フナンメン (*Hypsizygus marmoratus*), エリンギ (*Pleurotus eryngii*) 中には agaritine は検出されなかった。

agaritine の安定性について検討したところ、agaritine は室温~60°C では長時間安定であるが 80°C 以上では 1 時間以後急速に分解され、一部は HMPH に分解されることか判明した。また、その代謝分解物である 4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH) についても LC/MS/MS 法で検討し、agaritine と同時分析が可能であった。

研究協力者

昭和薬科大学 千葉良子

A. 研究目的

担子菌類とは、真菌の一つで、本体の菌糸と子実体からきてる（子実体を形成しないものもある）。子実体を形成する菌類は、キノコと呼ばれる。

最近、アカリクスと呼ばれるキノコ（和名カワリハラタケ, *Agaricus blazei* Murill）が抗腫瘍活性、免疫増強作用を有する可能性があることから注目され、多くの製品が市販されている。一方、同じ *Agaricus* 属のマノシユルーム（和名ツクリタケ, *Agaricus bisporous*）中には、変異原性の疑われるアガリチン（agaritine）が含まれていることか知られている。そのため、アカリクスキノコにおいても含有している可能性があるか、これまで検討されたことはない。 *Agaricus* 属以外のキノコについても、agaritine 含有に関する報告がない。

また、アカリクスキノコ製品は、キノコ乾燥品、

抽出物、抽出物に栄養補助成分を添加したもので、多くは粉末、錠剤であり、人が摂取した場合摂取量が多くなる可能性がある。そこで、安全性確保の観点から、*Agaricus* 属を含む種々のキノコについて agaritine 含有の実態調査を行う必要がある。

今回、精度良く分析定量を行うために必要な、LC/MS/MS を用いた高選択的、高感度な分析法の開発を検討した。また、agaritine の変異原性は、その代謝分解物である 4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH) との報告があることから、HMPH の分析法についても検討を行った。

agaritine は、水溶液中では容易に分解されると報告されているか、詳細には検討されていない。また、アカリクスキノコ製品中、乾燥品は熱湯で煎して、その他の製品は牛乳などに混ぜて飲むことか推奨されていることから、agaritine の各温度での安定性についても検討した。

B 研究方法

1 標準品

β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenyl hydrazine (一般名 agaritine), および 4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH) は、新たに合成されたものを用いた。

agaritine 純度は、HPLC-UV 検出および LC/MS (疑似分子イオン m/z 266) 検出での結果から、95%以上であった。

2 試料

アガリクスキノコ製品は、乾燥品または栄養補助成分を添加した製品 (顆粒、錠剤、カプセル) を用いた。顆粒、錠剤試料は、粉砕器により完全に粉末状にしたものを使用した。カプセルは、カプセルを取り除き、中の粉末だけを使用した。マノシュルーム、シイタケ、マイタケ、フナシメン、エリンギは東京都内のスーパーから国内産を購入し、ミルを用いてメタノール中でホモシネートし試料とした。

3 装置

粉砕器は、IKA Works 製、ミルは、Resch GM200 Laboratory knife Mill を用いた。

質量分析装置は、Applied Biosystems 社製 API-3000 を、イオン化 ESI, negative モードで用いた。LC は、Agilent 製 1100series を用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂, 3 μ m, 2.1 x 150 mm) を主に用い、検討用として ODS-3 (GL サイエンス, 3 μ m, 2.1 x 150 mm), 水系順相カラム HILIC (SeQuant, 5 μ m, 2.1 x 150 mm) を用いた。

4 抽出および前処理操作

アガリクスキノコ製品はその 1 g をメタノールで 3 回 20 分間振とう抽出後、溶媒留去した。生試料 (マノシュルーム、シイタケ、マイタケ、フナシメン、エリンギ) は、40 g を 200 ml のメタノールでホモシネートし、均一なホモシネートから 30 ml を用いて 3 回 20 分間振とう抽出後、溶媒留去した。得られた各抽出物に対し、0.01% 酢酸

メタノール (9/1) 3 ml 加え溶解し、その 1 ml を Bond Elut C₁₈ カラムに負荷し、黄色色素を保持させた。さらに 0.01% 酢酸 メタノール (9/1) 2 ml 加え溶出、計 3 ml を LC/MS/MS 分析用検液とした。

5 agaritine の安定性試験

agaritine 標準品 10 μ g/ml の水溶液を、4°C、25°C、60°C、100°C の各温度で 24 時間放置し、agaritine の安定性を検討した。

アガリクスキノコ乾燥品は、5 g を急須に入れ、600 ml の熱湯を注ぎその後放置または 23°C、80°C で放置し、15、30 分、1、2、4、8 時間後に抽出液を抜き取り、フィルター濾過後、agaritine 量の変化を測定した。測定には、HPLC-UV 検出法を用いた。

C 研究結果

1 検量線

agaritine (図 1) の分子量 267 (exact mass 267.1219) から、まず疑似分子イオンピークの検出を行い、negative モード、 m/z 266 が検出された。positive モードでは明確なピークが観察されなかった。キノコ試料中の agaritine を高選択的に分析定量するために、LC/MS/MS 法を採用した。そこで、疑似分子イオンピーク m/z 266 から得られるフラグメントピークを検索したところ、 m/z 122、248 に図 2 に示した経路で分解されたフラグメントが得られた。

得られた 2 つのフラグメントピーク (m/z 122、248) を用いて agaritine 標準品の検量線を作成したところ、いずれの場合も 0.01~10 μ g/ml の範囲で良い直線性が得られた ($r^2 = 0.999$ 以上)。なお、検出に m/z 122 を用いた方が測定上のばらつきが少なかったため定量にはこれを用い、確認用には、 m/z 122 より約 2 倍感度が高い m/z 248 を用いることとした (図 3)。