

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17（2005）年4月

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

梶山 浩

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

近藤 一成

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

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 -----	1
亀山 浩	
II. 分担研究報告書	
1. 標準物質の合成・リスク評価 -----	15
亀山 浩	
2. 担子菌類中ヒドラジン誘導体の分析法の開発 -----	19
近藤 一成	
3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析 -----	29
米谷 民雄	

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 を再度化学合成した。HPLC 分析前の精製クリーンナップとして固相抽出法を検討した。固相抽出カートリッジに逆相系と陽イオン交換系を用いて検討したが、強く保持されるが溶出が困難であった。アガリチンの安定性の検討では、アガリチンは 100°C 保存のほうが分解しやすい傾向が示唆された。

前年度において確立した LC/MS/MS 法を用いた食品中 agaritine 分析法で、agaritine 類縁体を検索するためプリカーサーイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンを行った。その結果、agaritine 類縁体は検出されなかった。LC/MS/MS 法を用いた agaritine 分析の再現性は、良好であった。食品中 agaritine 分析法が、実験動物からの血清等生体試料中の agaritine 分析にも適用できるように改良、検討した。

agaritine の体内動態を解明する一環として、アガリクスおよび agaritine 標準品投与マウスを用いて血中への移行を経時的に分析した。その結果、アガリクス経口投与マウス (agaritine 3.2 mg/kg) では agaritine は 20 分で血中濃度が最大となり、その後急速に消失、90 分以降は検出されなかった。agaritine 標準品 (agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg) を用いた実験においても同様に、agaritine は 20 分で血中濃度が最大となりその後急速に消失した。経口投与された agaritine の血中への移行と消失は速やかであると考えられた。

アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含めたキノコ類につき、ICP 発光分光法により有害・必須金属濃度を分析した。アガリクス茸には Cd 濃度が高いものがあることは以前から報告されていたが、分析したアガリクス健康食品中に Cd 濃度が高い製品があった。これらに対しては、自主的に行われた検査結果も考慮し、販売者において対策がとられたが、次年度もフォローアップしていくことが必要と考えられた。Pb と As については特に有害と考えられる量は含まれていなかった。必須金属の Cu と Fe については、多くのキノコでは Cu よりも Fe の方が高値であったが、アガリクスやマッシュルームなどアガリチンを含有するキノコ類では、逆に Cu の方が Fe よりも高い値であった。

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ガリクス茸は数ある Agaricus 属の中の Agaricus blazei Murill というキノコを指すが、

agaritine を含め hydrazine 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、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。また食品中 agaritine 分析法が、実験動物からの血清等生体試料中の agaritine 分析にも適用できるように検討し、確立した方法を用いて、アガリクス投与、agaritine 標準品投与マウスの代謝について調べるため、血中濃度を経時的に測定した。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が、以前から知られている。逆にその性質は、類似の必須金属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、有害金属の混入はなくなるが、必須金属も減少している可能性がある。また逆に、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の評価項目の1つとして、有害・必須金属について検討すること

とした。今年度は、金属測定用試料分解装置および ICP 発光分析装置を用いて、アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含めたキノコ類中の有害・必須金属含量の分析を実施した。

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 1 g 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、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°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. 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウスによる代謝

2-1. 標準品

β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenyl hydrazine (一般名 agaritine), 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。

2-2. 試料

agaritine は、合成したものをを用いた。

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) をを用いた。顆粒、錠剤試料は、粉碎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。マッシュルーム、シイタケ、マイタケ、ブナシメジ、エリンギは東京都内のスーパーから国内産を購入した。凍結乾燥後、ミルを用いて粉碎して試料とした。

2-3. 装置

粉碎器は、IKA Works 製、ミルは、Resch GM200 Laboratory knife Mill をを用いた。

質量分析装置は、Applied Biosystems 社製 API-3000 を、イオン化 ESI, negative モードで、MS/MS フラグメン m/z 122, m/z 248 をモニターした。定量用に m/z 122, 確認用に m/z 248 をを用いた。LC は、Agilent 製 1100 series をを用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂, 3 μ m, 2.1 x 250 mm) をを用いた。

2-4. 抽出および前処理操作

すべてのキノコ製品 (乾燥品はそのまま, 生キノコは凍結乾燥後) 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。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。

血清サンプルは、アセトニトリルとメタノールで除タンパクしたものを分析用検液とした。

2-5. LC/MS/MS をを用いた食品中 agaritine 分析の信頼性評価

agaritine を含有しないことが分かっているアガリクス製品およびマイタケを用いて、5 μ g/g 添加したときの日内変動 ($N=3$), 日間変動 ($N=3$) を求め、分析法の再現性を評価した。

2-6. agaritine 類縁体の検索

agaritine を最も多く含有する乾燥アガリクスから調整したサンプルを用いて、 m/z 122 に対するプリカーサーイオンスキャンおよびアミノ酸であるグルタミン酸, アスパラギン酸に相当する分子量でニュートラルロススキャンを行い、HMPH にアスパラギン酸が結合した類縁体などが存在しないか、HMPH を骨格に持つ化合物がないか検討し、agaritine 様毒性を持つ可能性のある化合物の検索を試みた。

2-7. agaritine 投与マウスの血清中 agaritine 分析

乾燥アガリクスの熱水抽出物 (agaritine 3.2mg/mouse kg) および agaritine 標準品 (agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg) を、8 週齢雌 ddY マウスへ強制

単回経口投与した。投与後、0-180 min まで 20 min 間隔でマウスより採血し、血清分離後、アセトニトリルとメタノール各 1 回ずつ使用の除タンパク操作したものを LC/MS/MS 法で食品試料の場合と同一条件で agaritine 分析を行った。

2-8. アガリクス抽出、分画エキスの細胞毒性

agaritine 以外の毒性化合物について検索するため、ヒト口腔癌細胞株である KB 細胞を用いてアガリクス各エキス中の細胞傷害性を調べた。アガリクスは、メタノール抽出エキスを、順にヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール、水で分配して各エキスを作成した。細胞傷害性は、96-cell プレートを用いた MTT 法で検討した。各エキスについて、3 種類 (benzene-aceton=9-1, CHCl₃-MeOH=9-1, CHCl₃-MeOH-H₂O=15-6-1) の展開溶媒で TLC 分析を行い、成分比較をした。細胞傷害性試験の結果を指標にして、活性成分を単離、構造解析を行った。

3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

3.1 試料

アガリクス健康食品、及びキノコ類は、都内百貨店やスーパーマーケットで購入し、一部は通信販売にて購入した。アガリクス健康食品のうち、粒状のものは粉碎したのち分析した。液体の 2 製品については、凍結乾燥の後に分析した。また、生キノコについては、均質化をはかるため、凍結乾燥後粉末化したものについて分析した。

3-2 試薬

各金属の標準原液としては、和光純薬工業製原子吸光分析用標準液を使用した。超高純度分析用試薬の硝酸 (68%) と同過酸化水素水 (35%) は、多摩化学工業製の TAPAPURE AA-100 を用いた。他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。水はすべて milliQ synthesis A10 (ミリポア社) で製造した 18 MΩcm 以上の超純水を使用した。

3-3 装置

ICP-AES : ICAP-61 (サーモジャーレルアッシュ製)

マイクロウェーブ試料分解装置 : ETOS 900 (マイルストーンゼネラル社製)

3-4 マイクロウェーブのプログラム

Microwave program 1

(200 W, 0-4 min) → (0 W, 4-8 min) → (200 W, 8-18 min), 外部温度コントロール制御 100°C

Microwave program 2

(250 W, 0-2 min) → (0 W, 2-4 min) → (250 W, 4-9 min) → (500 W, 9-14 min) → (600 W, 14-19 min) → (0 W, 19-20 min) → (400 W, 20-40 min), 外部温度制御コントロール 100°C

Microwave program 3

(250 W, 0-2 min) → (0 W, 2-4 min) → (250 W, 4-9 min) → (500 W, 9-14 min) → (650 W, 14-19 min) → (0 W, 19-20 min) → (500 W, 20-40 min), 外部温度制御コントロール 110°C

3-5 金属測定用試験溶液の調製

各試料 1 g を精密に量り、マイクロウェーブ試料

分解装置用テフロン容器に注意深く入れ、水 1 ml および超高純度分析用硝酸 7 ml を加えて 1 昼夜放置し、初期の酸分解を徐々に進行させた。その後、まず Microwave program 1 を行い、終了後、容器を本体から外して NO_x などのガス抜きを行い、室温まで冷やした後、超高純度分析用過酸化水素水 1 ml を加え、Microwave program 2 を行った。その後、容器を再び本体から外してガス抜きを行い、Microwave program 3 を行った。試料分解が終了した後、各分解液を水で 50 ml にメスアップし、金属測定用試験溶液とした。

3-6 金属測定用標準液の調製

金属測定用標準液は、試料中の硝酸濃度と同等になるよう、原子吸光分析用標準液を硝酸溶液で希釈して調製した。ただし、P の標準液は和光純薬工業製光電用を使用し、S の標準液は容量分析用硫酸 (0.05 mol/l、和光純薬工業製) から、C の標準液は尿素 (和光純薬工業製特級) から調製した。

3-7 ICP 測定条件

10 秒間積算の 2 回平均で測定した。ICAP-61 の条件 : power, 1.25 kW; reflected power, <5 W; coolant gas, 20 l/min; sample introduction rate, 1 ml/min

3-8 添加回収

1 製品に金属を添加したところ、全金属につき、ほぼ 100% の回収率が得られた。

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、空气中ですぐに分解し、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°C で保存を行った。agaritine-carboxyl type

(C₁₂H₁₅N₃O₅) 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が、吸湿性があるようなので、Ar 置換し-80°C で保存をおこなった。

agaritine (C₁₂H₁₇N₃O₄) 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 O₂ により分解し、水溶液 (open vial)中で 48 時間することが判明した。

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°Cで分解し、酸性条件ではさらに分解が早まり、O₂、熱に非常に弱いいため、N₂または Ar 置換し、-80°Cで保存をおこなった。

固相抽出精製法の検討

15 種類の溶出液を用いて検討した。その結果、アガリチンの陽イオン交換カラムへの親和性が高すぎることから、アガリチンは溶出されなかった。また試料であるアガリクス抽出液をカートリッジに通したところ、アガリチンの保持は強くほとんど溶出されなかった。また逆相カートリッジ型のアガリチンは中性アミノ酸構造を有しており溶液中ではイオン型をしているため極性が高く、逆相のカートリッジではうまく保持できなかったためと考えられる。今回、J. J. SPERONI らの方法による Sep-Pak C18 カートリッジを用いた固相抽出法は再現性が得られなかった。

アガリチンの安定性の検討

抽出、保存を常温時と高温状態の二つの条件を設定し、乾燥アガリクス茸溶液中のアガリチン量の経時変化を見たところ、常温時に比べ高温状態のほうが減衰速度が速かった。またアガリチンは放置後 2~4 時間あたりから減少し始め、またその減少速度は抽出液の温度が高いほうが大きいことから高温保存のほうが分解しやすいと考えられる。従ってアガリクスを高温水溶液

として摂取するときのアガリチン量は、抽出後長時間高温にて保存することで減少させることが可能であると考えられた。

2. 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウスによる代謝

2-1. 生キノコ試料の回収率改善

生キノコ試料の場合、抽出を既報のマッシュルーム中の UV 検出器を用いた agaritine 分析例に従い行くと、回収率が 10-20%と低く、再現性も良くなかった。生キノコ試料は水分をかなり含んでいる。そのため、メタノールで抽出してもかなりの水分を含んでいる。水によく溶ける agaritine ではあるが、同時に MS 分析時でのイオン化阻害する物質も抽出されているために、回収率が悪いと考えられた。そこで、シイタケ、シメジ、マイタケの各生キノコ試料も一度凍結乾燥し、水分を完全に除き、その後メタノールのみで抽出したところ、回収率もすべて 70%以上と改善され、結果の再現性も得られた。

2-2. agaritine 類縁体の検索

まず、agaritine 標準品を用いて、それぞれのイオンスキャンモードで正しく検出されるかを確認した。

agaritine 10 µg/ml 溶液を用いて m/z 122 に対するブリカーサーイオンスキャンを行ったところ、agaritine の保持時間に検出され、またマススペクトルからも agaritine である確認された。

HMPH 骨格を持った agaritine 類縁体がアガリクス

製品中に存在しないかを調べるために、HMPHに由来するフラグメントである m/z 122 でプリカーサーイオンスキャンを行った。その結果、9分に見られるピーク2は、そのマススペクトルから agaritine であることが分かった。6分と15分に2つのピーク (peaks 1 and 3) が見られ、マススペクトルから m/z 243.1 と 314.3 であることが分かったが、HMPH 骨格を持つか否か特定できなかった。なお、18分のピークはブランクサンプルでも見られるため、溶媒バックグラウンドである。

次に、グルタミン酸の代わりにアスパラギン酸がHMPHと縮合した agaritine 類縁体の存在を検討するためニュートラルロススキャンを行った。最初に、agaritine 標準品を用いて確認したところ、agaritine 保持時間に検出され、ニュートラルロススキャンが有効であることを確認した。次に、乾燥アガリクスで検討したところ、agaritine のピークは認められたが、アスパラギン酸縮合型 agaritine 類縁体 (m/z 252) は検出されなかった。

以上の結果から、アスパラギン酸縮合型 agaritine は検出されなかった。HMPH と同じ m/z 122 をフラグメントとするピークは2つ存在したが、HMPH 骨格を持つかどうかはさらに検討が必要とされた。

2-3. LC/MS/MS を用いた agaritine 分析法の信頼性

agaritine を含有していないことが確認されているアガリクス製品およびマイタケを用いて agaritine 分析の繰り返し再現性を m/z 122, 248 そ

れぞれについて検討した。それぞれのサンプルに agaritine 標準品 5 $\mu\text{g/g}$ を添加したものをを用いた。その結果、Table I に示すように、日内変動はアガリクス製品の 4.15 とマイタケの 5.47% (m/z 122) , 日間変動は、アガリクス製品の 15.2 とマイタケ 22.5% (m/z 122) で、酸やアルカリ、熱、空気による酸化で分解しやすい agaritine 分析として良好な結果であった。

2-4. agaritine 投与マウスの agaritine 血中濃度の経時変化

1) 乾燥アガリクス 10 g を 200 ml の水で熱水抽出 (1時間) を行い、冷却後 agaritine 濃度を LC/MS/MS 分析で求めたものを (132 $\mu\text{g/ml}$ in water) 6 週齢雌 ddY マウスに投与した。投与量として、agaritine 3.2 mg/kg mouse である。投与後 20 分間隔でマウス目より採血し、血清分離後 agaritine 濃度を測定した結果、agaritine は 20 分～40 分で血中濃度が最大になり、その後急速に消失した。この予備実験の結果から、一匹から得られる血清量が LC/MS/MS 分析に必要とされる最低量であったので、より多くの血清量確保するため、次回以降 8 週齢マウスを用いることとした。

2) 8 週齢雌 ddY マウスに乾燥アガリクス熱水抽出液 (132 $\mu\text{g/ml}$ in water) を投与し (agaritine 3.2 mg/kg mouse) , 投与直後を 0 分としてその後 20 分間隔で 180 分まで経時的に血清中 agaritine 濃度を測定した。コントロールとしてアガリクス抽出に用いた水を投与した。その結果、20 分で血中濃

度は最大となり、その後急速に消失、90分以降はベースラインレベルになった。

3) 2)と同様に、今度は agaritine 標準品を用いて実験を行った。agaritine 標準品 (4.0 または 40.0 mg/kg) を 8 週齢雌 ddY マウスに投与し、20 分間隔で 180 分まで経時的に血清中 agaritine 濃度を測定した。その結果、agaritine 標準品 4.0 mg/kg 投与の場合は、20 分で血中濃度は最大となるのは乾燥アガリクス熱水抽出液投与と同じであるが、その agaritine 濃度はアガリクス熱水抽出液投与の場合に比べて低かった。アガリクス熱水抽出液投与では他成分が agaritine 吸収に関係している可能性が示唆された。agaritine 標準品 40.0 mg/kg 投与の場合は、血中 agaritine 量が LC/MS/MS での agaritine 分析の定量下限より高い濃度検出できるためより正確な結果が期待された。実験の結果、20 分をピークとして、急激に消失するきれいな変化が見られ、agaritine の血中への移行と消失はマウスでは早いと考えられた。

2.4. アガリクスの細胞毒性活性

agaritine 以外にも毒性成分が含有されていないかを調べる目的で、細胞傷害性試験によく用いられるヒト口腔癌細胞株 KB cell を用いて、各種アガリクスの抽出エキスについて細胞傷害性について調べた。その結果、200-500 µg/ml の濃度において弱い細胞障害性を認める ergosterol の peroxide 体 2 種が少量 (アガリクス 450 g から 22 mg と 72 mg) 得られた。また、細胞障害性は認められない

がメジャー成分の一つとして ergosterol を単離した (450 g から 220 mg)。ergosterol の peroxide 体である、5α, 8α-epidioxy-(24R)-22E-methylchlesta-6,9(11),22-trien-3β-ol および 5α, 8α-epidioxy-(24R)-22E-methyl-chlesta-6, 22-trien-3β-ol は、Kato III 細胞への細胞毒性が報告されていることから、過剰な摂取によっては何らかの毒性が出ることも考えられる。TLC の結果から、ergosterol はアガリクス中メジャー成分と考えられる。

その他の活性についても、補体活性化、NK 細胞活性化、ヒスタミン遊離試験等を行ったが、活性成分は見いだせなかった。agaritine も活性を示さなかった。NK 細胞活性化抑制が見られた中国産アガリクスについては、さらに検討中である。以上の結果から、今回用いた活性評価系では、健康に影響を及ぼすような強い活性成分は見られなかった。

3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

アガリクス健康食品およびキノコ中の金属含量では、有害金属に関しては、昨年度の文献調査で注目された Cd について、8.7、10.5 mg/kg と高い値の製品が見られた。Pb については、特に高い値は検出されず、約 2 mg/kg が最高であった。

As は低濃度であったが、検出された製品があった (1 mg/kg 以下)。ただし Ge が高濃度に含まれている製品においては、ICP 発光分析装置による測定で 65 mg/kg という As の数値が得られた。ICP 発光分光法においては、Ge の発光線

(193.687 nm) が As の発光線 (193.696 nm) 近くにあり、分光干渉 (妨害) することが知られている。そのため、ある製品で得られた As の高い値は、Ge による分光干渉で説明された。

必須金属では、固体製品の場合、Cu は 4–90 mg/kg、Fe は 15–197 mg/kg と、製品によりさまざまであった。Cu の値の高い製品では Fe も高い値であったが、各製品の成分を十分に考慮して比較する必要があると考えられた。

Ge については、ある健康食品で 3,300 mg/kg と高値であったが、製品への表示から、これはアガリクス本来の Ge ではなく、Ge 化合物を添加したためと判断された。

Cr については、ある健康食品で 9.7 mg/kg、ついで、ある製品で 5.7 mg/kg であり、他の製品に比し高い値であった。Zn については、固体製品の場合、7–111 mg/kg であった。

キノコ類の分析結果では、Cd はアガリクス茸や山アワビで 1 mg/kg (乾燥質量) 以上であった。As や Pb は特に検出されなかった。昨年度の文献調査で注目された Se については、ブラウンマッシュルームで 3 mg/kg 検出された。

Cu と Fe の濃度比については、調べたキノコの大部分で Fe の方が Cu よりも高い値を示したが、アガリクスやマッシュルームなどでは逆に、Cu の方が Fe よりも高い値であった。Zn は 41–122 mg/kg であった。V は山あわびとハタケシメジで 2 mg/kg 以上検出された。

以上のように、アガリクス健康食品には Cd 濃度が高い製品が 12 製品中 2 製品 (製品 B 及び製品 C) あった。しかしながら、今回分析したサンプル数が限られていることから、2 製品を販売していた 2 社に連絡し、現在、市場に流通している製品について Cd 濃度を分析するよう依頼した。その結果、製品 C の販売者からは、4 原料ロットにつき 2 登録検査機関で分析した値が報告され、その Cd 濃度は 7.62–9.99 mg/kg であった。また、製品 B からは、最近の 10 ロットの製品の分析値 (3.82–5.96 mg/kg、平均 4.34 mg/kg)、および参考ロットとして本研究で使用した製品と同時期の 1 製品の分析値 (6.4 mg/kg) が報告された。なお、同社製品は顆粒であるため、何らかの成分を加えて成形してあると考えられた。

D. 考察

前年度において確立した LC/MS/MS 法を用いた解析方法を用いて agaritine 類縁体を検索するためプリカーサーイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンを行った結果、agaritine 類縁体は検出されず、agaritine は *Agaricus* 属特有の成分でその類縁体も存在しないことが示唆された。

さらに、食品中 agaritine 分析法が、実験動物からの血清等生体試料中の agaritine 分析にも適用できるように検討し、血清試料中の agaritine 定量は、血清試料の除タンパクのみで可能であったが、尿、糞試料は十分な回収率が得られず (30%以下)、

さらに検討が必要と考えられた。

agaritine の体内動態を解明するために、アガリクスおよび agaritine 標準品投与マウスを用いて血中への移行を経時的に分析した。その結果、アガリクス熱水抽出液投与マウス (agaritine 3.2 mg/kg) では agaritine は 20 分で血中濃度が最大となり、その後急速に消失、90 分以降は検出されなかった。agaritine 標準品 (agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg) を用いた実験においても同様に、agaritine は 20 分で血中濃度が最大となりその後急速に消失した。agaritine の吸収代謝は速やかに起こると考えられる。

Agaritine は変異原性が報告されているが、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。また agaritine の毒性に関しては、まだ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、さらには生体内挙動実験を継続して検討する必要があると考えられた。

昨年度の文献調査から注目された Cd については、入手した市販製品で値が高いものがみられた。文献調査結果から、アガリクス茸から製造されるアガリクス健康食品には Cd 含量が高いものがあることが予想されていたが、今回の結果はこのことを裏付けるものであった。

Cd による毒性は、特に長期摂取による腎障害が問題となるとされている。食品由来の Cd の健

康影響については、現在、食品安全委員会にリスク評価を依頼し結果を待っているところであるが、国際的な JECFA による PTWI (暫定耐容週間摂取量) は $7 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ であり、2003 年の JECFA でもその値を継続することが確認されている。この値は、体重を 50 kg とし、仮に 1 日あたりに換算すると $50 \mu\text{g}$ の Cd 摂取となる。一方、わが国における汚染物一日摂取量調査によると、日本人は 1 日あたり Cd を平成 13 年度は 29.3、14 年度は 26.2、15 年度は $25.6 \mu\text{g}$ (ND=0 とした場合の値) 摂取していると報告されている。

健康食品では同一製品を長期にわたり摂取することが考えられる。そのため、アガリクス健康食品中の Cd 濃度は、製品に記載された目安量に従って摂取した場合に、日常食からの摂取とあわせても、PTWI を下回るが必要と考えられ、そのための方策がとられることが望まれる。今回、Cd 濃度が高い製品を販売していた製品 C の販売者からは販売を終了する旨の、また、製品 B の販売者からは、日常食とあわせても PTWI を下回るように社内規格 (Cd 濃度 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 以下) を設定し、それ以上の値の製品については市場に流通させない方針である旨の報告があった。

なお、今回 Cd 濃度が高かった製品については当面の対応策はとられたが、次年度もアガリクス健康食品中の Cd については、フォローアップが必要と考えられた。

必須金属の Zn については、Cd の値が高い製品

で高値を示す傾向が、部分的に認められた。Zn と Cd は周期表で同族の元素であり、化学的性質が類似しているため、性質の類似する元素が同じ挙動を示したものと考えられた。

キノコ類では、Cd はアガリクス茸、バイリング、山アワビで、1 mg/kg (乾燥質量) 程度含まれていたが、他のキノコでは低い値であった。

多くのキノコでは Cu よりも Fe の方が高い値であったが、アガリクスやマッシュルームなどアガリチンを含有するキノコでは逆に Cu の方が Fe よりも高い値であった。しかし、アガリチンの生合成との関連については、今後の検討課題である。

なお、今年度の分析で注目された Cd、Cr、Cu、Ge、Se、V、Zn などについては、来年度に化学形や存在状態についての研究が必要であると考えられた。また、今回は分析対象に入れなかったが、キノコには Hg 濃度が高いものがあることが文献調査で判明した。Hg についても分析する必要があると考えられた。

E. 結論

agaritine は、*Agaricus* 属キノコのみ含まれるヒドラジン誘導体で、構造類似体は検出されなかった。アガリクスキノコ、agaritine 標準品投与マウスでの血中濃度は、投与後 20 分で最大となりその後急速に消失し、血中への移行と消失は早いと考えられた。agaritine 以外に強い生物活性を持つ成分は見つからなかった。

アガリクス健康食品およびアガリクス茸を含むキノコ類につき、ICP 発光分光法により有害・必須金属濃度を分析した。

その結果、Cd の値が高いアガリクス健康食品があることがわかった。これらに対しては、自主的に行われた検査結果も考慮し、販売者において対策がとられたが、次年度もフォローアップしていくことが必要と考えられた。

Pb と As については、特に有害と考えられる量を含む製品はなかった。

キノコ類中の必須金属では、多くのキノコで Fe の方が Cu よりも高い値であったが、アガリクスやマッシュルームなどアガリチンを含有するキノコでは、逆に Cu の方が Fe よりも高い値であった。

金属の有効性や毒性は、その化学形や存在状態に依存するため、来年度は各金属の化学形や存在状態の解析が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

Cd の値が高いアガリクス健康食品があったが、これらに対しては、自主的に行われた検査結果も考慮し、販売者において対策がとられた。しかし、次年度もフォローアップしていくことが必要と考えられた。

参考文献

1. Bela, T., Donald, N., Kashinath, P., James, E., Kenneth, A.: Tumor induction with the N²-acetyl derivative of 4-hydrozylmethylphenylhydrazine, a me-

tabolite of agaritine of *Agaricus bisporous*. *Cancer Res*, 38, 177-180 (1978).

2. Bela, T., Ksinath, P., Hwan-Soo, J. Carcinogenesis of 4-hydrozylmethylbezenediazonium ion (tetra-fluoroborate) 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., Günter, S., Lúcia, 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).

10. Kazuko, Y., Mizuho, I., Shigenobu, A., Eiko, M., Satoshi, K. Two new steroidal derivatives from the fruit body of *Chlorophyllum molybdites*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1030-1032 (2001).

G. 研究業績

1. 論文発表

Selective analysis of mutagenic agaritine and its derivative in several mushrooms using liquid chromatography - tandem mass spectrometry

Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani, *Journal of Chromatography A*, in preparation

2. 学会発表

近藤一成, 渡辺麻子, 岩永祐子, 阿部 郁朗, 田中秀弥, 長岡 (浜野) 恵, 穂山 浩, 米谷民雄. LC/MS/MS を用いたキノコ中の変異原性ヒドラジン agaritine の分析. 第 83 回日本食品衛生学会

(2005, 3) 日本薬学会第 125 年会 (東京)

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（食品の安全性高度化推進研究事業）

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 梶山浩（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 を昨年度同様に化学合成した。HPLC 分析前の精製クリーンナップとして固相抽出法を検討した。固相抽出カートリッジに逆相系と陽イオン交換系を用いて検討したが、強く保持されるが溶出が困難であった。アガリチンは中性アミノ酸構造を有しているため、陰イオン交換系のカートリッジでの固相抽出も今後検討する必要があると考えられる。アガリチンの安定性の検討では、アガリチンは高温保存のほうが分解しやすい傾向が示唆された。

協力研究者 阿部郁朗、田中秀弥（静岡県立大学薬学部）、千葉良子（昭和薬科大学）

A. 研究目的

一般的にキノコには毒性物質としてヒドラジ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ガリクス茸は数ある Agaricus 属の中の Agaricus blazei Murill というキノコを指すが、アガリチンを含めヒドラジ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アガリチン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、アガリチンを含む一連の 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。また合成したアガリチンを標準物質として、昨年度確立した紫外吸収検出 HPLC 法により、キノコからのアガリチン精製の向上を目的に固相抽出法を検討した。また乾燥アガリクス茸キノコ（アガリチン量）の経時変化に関する検討も行った。

B. 研究方法

試薬および器具

・OASIS MCX (1 cc) (Waters)、高速液体クロマトグラフィー用メタノール（関東化学株式会社）、高速液体クロマトグラフィー用蒸留水（関東化学株式会社）、酢酸（関東化学株式会社）
・KC プレップデュラ 水系、直径：13mm 孔径：0.45 mm（片山化学工業株式会社）、テルモ シリンジ[®] 2.5 mL（テルモ株式会社）

agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成

アガリチンおよびヒドラジン誘導体合成研究は、Subir Datta らの報告 (Helvetica Chimica Acta, 70, 1261-1267, 1987) をもとに行った。

固相抽出精製法の検討

はじめに、試料の調製として乾燥アガリクス茸約 2 g を量り取り、MeOH 30 ml を加え 10 分間攪拌したのち遠心分離した (3000 rpm, 10 min)。次に上清を分取し、残渣に MeOH 15ml を加え 10 分間攪拌したのち遠心分離した (3000 rpm, 10 min)。この操作を二回行った。得られた上清をひだ折ろ過した。得られたろ液をエバポレーターで蒸発乾固し、抽出物を得た。この抽出物に 0.005N NaHPO₄ 20 ml を加え、さらに超音波処理し溶解させた。この溶液を試料とした。次に固相抽出の操作としてカートリッジのコンディショニングと平衡化操作としてメタノールと蒸留水を 1 : 1 (v/v) に混合したもの 2 ml を流した。そこに試料 1 ml を流した。次に、洗浄操作としてメタノール 1 ml を流し、マニホールド内の廃液を廃棄し、試料用の試験管をセットした。抽出操作として各溶出液で 2 ml × 2 回流した。この抽出液に 60°C の恒温槽にて窒素ガスを吹き付けながら乾燥した。その後、残留物に蒸留水 1 ml を加え、前処理ディスクで濾過し、その 20 μl を HPLC に注入した。また逆相カラムの検討では、J. J. SPERONI らの方法に従い、Sep-Pak C18 カートリッジを用いた固相抽出を行った。HPLC 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)

アガリチンの安定性の検討

試料の調整法

AG-150 をフードプロセッサーで粉末状まで粉砕し (1 分間)、この粉末を試料とした。保存条件；室温放置 (研究室内 23°C) の検討では、以下のように行った。試料粉末を約 5 g 秤量し、急須に中に入れた。沸騰した湯 600 ml を急須に入れた。急須を乾燥機の中に入れ、液温を 80°C に保った。一分間攪拌したのち、抽出液を 3 ml 分取する (sample 1 ; 0 時間)。そのときの温度、pH を測定した。得られた抽出液を前処理としてディスクでろ過し、その試料溶液 20 μl を HPLC に注入した。各試料溶液中のアガリチン量はアガリチン標準溶液で作成した検量線より算出した。その後、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間後に同様の操作を行った。

C. 研究結果

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、空気中ですぐに分解し、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°Cで保存を行った。agaritine-carboxyl type (C₁₂H₁₅N₃O₅) 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が、吸湿性があるようなので、Ar 置換し-80°Cで保存をおこなった。

agaritine (C₁₂H₁₇N₃O₄) 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、空気中で O₂ により分解し、水溶液 (open vial)中で 48 時間することが判明した。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°C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°Cで保存をおこなった。

固相抽出精製法の検討

表1に示す 15 種類の溶出液を用いて検討した。その結果、アガリチンの陽イオン交換カラムへの親和性が高すぎることから、アガリチンは溶出されなかった。また試料であるアガリクス抽出液をカートリッジに通したところ、アガリチンの保持は強くほとんど溶出されなかった。また逆相カートリッジ型のアガリチンは中性アミノ酸構造を有しており溶液中ではイオン型をしているため極性が高く、逆相のカートリッジではうまく保持できなかったためと考えられる。今回、J. J. SPERONI らの方法による Sep-Pak C18 カートリッジを用いた固相抽出法は再現性が得られなかった。

表1 溶出液の種類

溶出液	結果
1 5%NH ₄ OH in MeOH	溶出不可
2 5%NH ₄ OH in CH ₃ CN	溶出不可
3 5%NH ₄ OH in CH ₃ COOC ₂ H ₅	溶出不可
4 14%NH ₄ OH in MeOH	溶出不可
5 14%NH ₄ OH	溶出不可
6 1 mol/L KOH : MeOH=1 : 4, v/v	溶出不可
7 1 mol/L KOH : CH ₃ CN=1 : 4, v/v	溶出不可
8 1 mol/L KCl : MeOH=1 : 4, v/v (pH2.0)	溶出不可
9 1 mol/L KCl : CH ₃ CN=1 : 4, v/v (pH2.0)	溶出不可
10 1 mol/L KCl : MeOH=1 : 1, v/v (pH2.0)	溶出不可
11 1 mol/L KCl (pH2.0)	溶出不可
12 2%ギ酸 in MeOH	溶出不可
13 0.01%CH ₃ COOH : MeOH=99 : 1, v/v (移動)	溶出不可
14 0.1mol/L HCl	溶出不可
15 MeOH	溶出不可

アガリチンの安定性の検討

Fig. 1 に示すように抽出、保存を常温時と高温状態の二つの条件を設定し、乾燥アガリクス茸溶液中のアガリチン量の経時変化を見たところ、常温時に比べ高温状態のほうが減衰速度が速かった。またアガリチンは放置後 2 - 4 時間あたりから減少し始め、またその減少速度は抽出液の温度が高いほうが大きいことから高温保存の