

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。

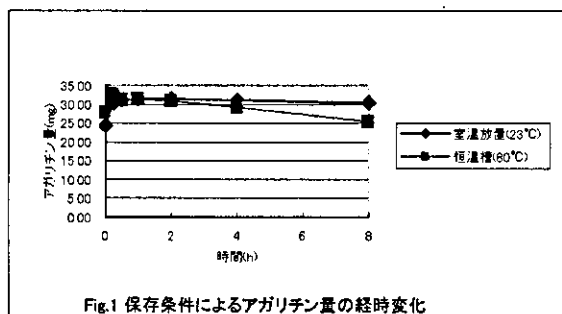


Fig.1 アガリチン量の経時変化

D. 考察

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。また合成したアガ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ガリチン分析法を確立した。

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

Ⅱ. 分担研究報告書

2. 担子菌類中のヒドラジン誘導体の分析法の開発

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

担子菌類中ヒドラジン誘導体の分析法の開発

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

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 の血中への移行と消失は速やかであると考えられた。

研究協力者

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科
松浪勝義

A. 研究目的

最近, アガ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* 属のマッシュルーム (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が知られている。そのため, アガリクスキノコにおいても含有している可能性があるが, 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。前年度において, LC/MS/MS を用いた再現性のよい, 信頼性の高い分析法を確立し, 種々のキノコ試料を分析した。その結果, agaritine は *Agaricus* 属特有であることが示唆された。

また, 生キノコからの分析において見られた低回収率について, その改善のため試料調整法を検討した。確立した分析法の再現性についても評価し

た。

agaritine は L-glutamic acid と 4-(hydroxymethyl) phenylhydrazine (HMPH) との縮合物であり, 毒性本体が HMPH と考えられている。そのため, HMPH とアスパラギン酸との縮合体や HMPH と他の化合物との縮合体が存在すれば, agaritine 同様の毒性を発揮すると考えられる。しかしながら, そうした agaritine 類縁体の分析例はない。そこで, agaritine 類縁体の検索がアガリクスキノコの安全性確保の観点からも必要と考えられるため検討した。

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た。その方法を用いて, 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。

B. 研究方法

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. 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。

3. 装置

粉碎器は、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、MS/MS フラグメン m/z 122, m/z 248 をモニターした（図 1）。定量用に m/z 122, 確認用に m/z 248 を用いた。LC は、Agilent 製 1100 series を用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂, 3 μ m, 2.1 x 250 mm) を用いた。

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。

5. LC/MS/MS 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。

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。

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。

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 MIT 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。

C. 研究結果

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. 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 に対するプ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 (図 2 A), 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、図 4 A に示すように、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 (図 4)。

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。

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 µg/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。

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 µg/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 µg/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 (図 6)。

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 (図 7)。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 (図 8)。

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) (図 9, 10)。

ergosterol の peroxide 体である, 5 α , 8 α -epidioxy-(24R)-22E-methylchlesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol および 5 α , 8 α -epidioxy-(24R)-22E-methylchlesta-6, 22-trien-3 β -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 (図 11)。

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。

D. 考察

前年度において確立した LC/MS/MS 法を用いた食品中 agaritine 分析法について、回収率が低かった生キノコ試料を凍結乾燥して完全に水分を除いた後、メタノール抽出することで 70-120% の良好な回収率が得られた。水溶性の agaritine であるが、含水溶媒での抽出では、一緒に抽出される水溶性成分によりイオン化阻害を受けていたために低回収率となっていたと考えられた。

agaritine 類縁体を検索するためプリカーサーイオンキャンおよびニュートラルロ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。また、LC/MS/MSを用いた agaritine 分析法の繰り返し再現性は、日内、日間変動ともに良好な結果が得られ、本法は信頼性ある agaritine 分析法であると考えられた。

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。

各種生物活性評価試験の結果より、agaritine、アガリクスキノコ中には強い活性成分は含有されていないと考えられた。ごく弱い細胞傷害性を示す ergosterol peroxide が 2 種確認された。また、アガリクス中には ergosterol はメジャー成分であることが確認された。

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。

F. 参考文献

1. Bela, T., Donald, N., Kashinath, P., James, E., Kenneth, A.: Tumor induction with the N⁷-acetyl

derivative of 4-hydrozylmethylphenylhydrazine, a metabolite of agaritine of *Agaricus bisporous*. *Cancer Res*, 38, 177-180 (1978).

2. Bela, T., Ksinath, P., Hwan-Soo, J. Carcinogenesis of 4-hydrozylmethylbezenediazonium 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., 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. 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, 穉山 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)

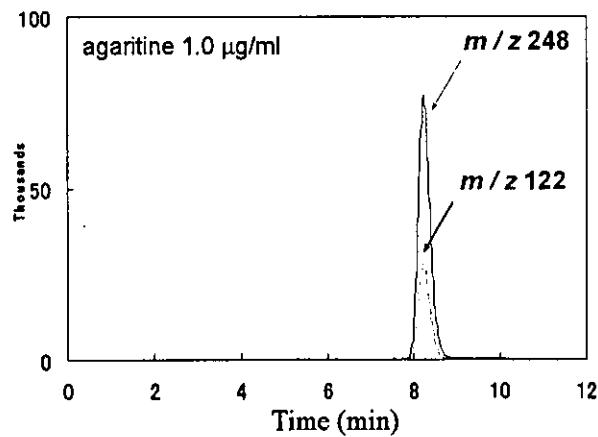
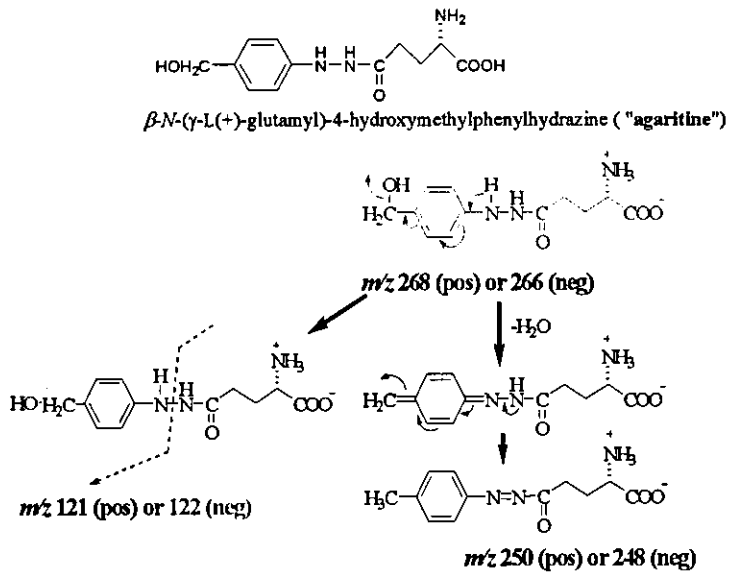


図1 LC/MS/MS法による agaritine 分析
フラグメント生成機構と agaritine 標準品クロマトグラム

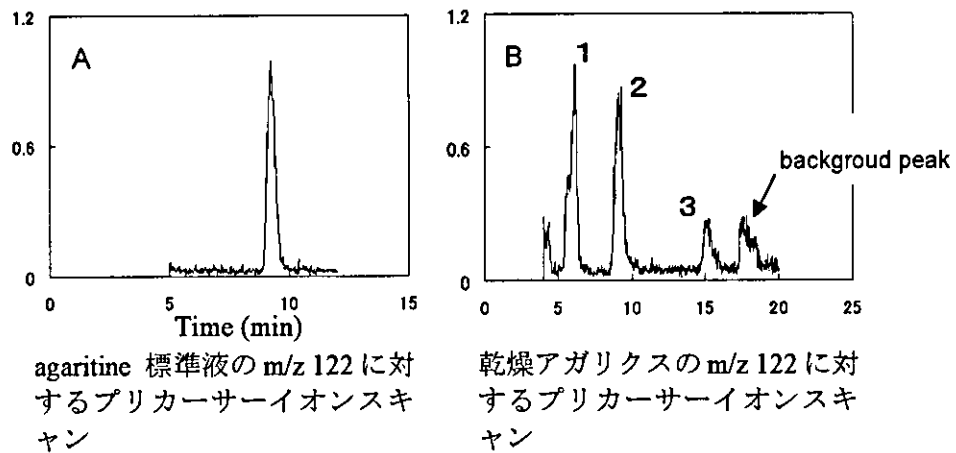


図2 agaritine 標準品および乾燥アガリクスの m/z 122 に対する
プリカーサーイオンスキャン

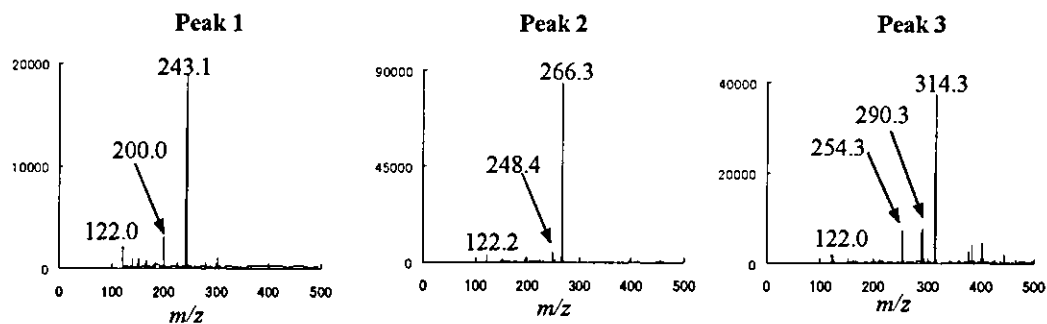
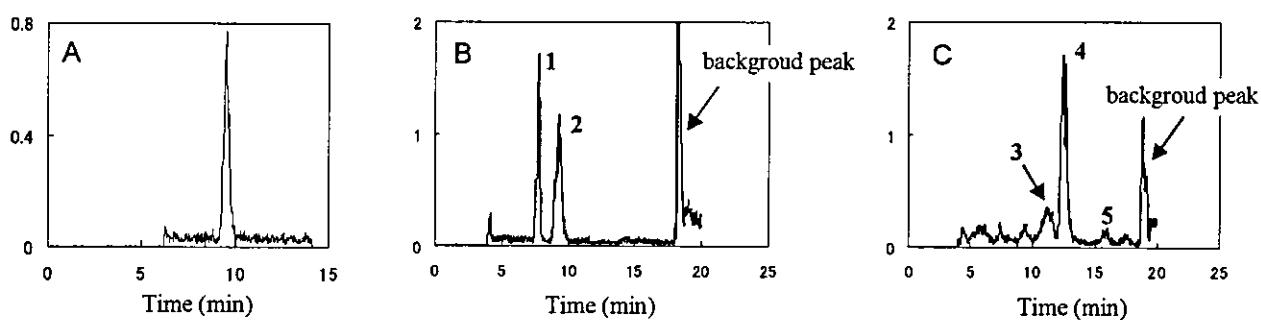


図3 プリカーサーイオンスキャン測定での各ピークのマスペクトル



agaritine 標準液のグルタミン酸脱離に相当するニュートラルロススキャン

乾燥アガリクスのグルタミン酸脱離に相当するニュートラルロススキャン

乾燥アガリクスのアスパラギン酸脱離に相当するニュートラルロススキャン

図4 agaritine 標準品および乾燥アガリクスのグルタミン酸 (m/z 144) およびアスパラギン酸 (m/z 130) 脱離に相当するニュートラルロススキャン

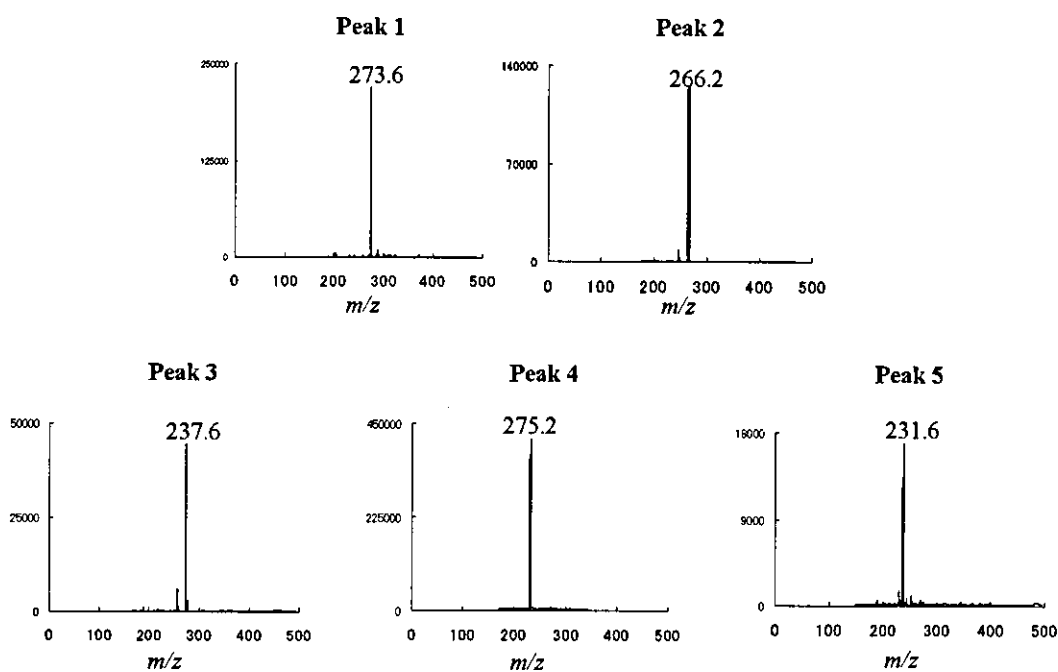


図5 ニュートラルロススキャン測定での各ピークのマスペクトル

Table I LC/MS/MS 法による agaritine 分析の繰り返し再現性 (n=3)

MRM (m/z 122)					
	Intra-assay (μg/ml)	RSD (%)	Inter-assay (μg/ml)	RSD (%)	Total recovery (%)
agaricus A	4.48	4.15	4.37	15.2	82.8
maitake	3.48	5.47	4.71	22.5	72.7
MRM (m/z 248)					
	Intra-assay (μg/ml)	RSD (%)	Inter-assay (μg/ml)	RSD (%)	Total recovery (%)
agaricus A	3.88	5.38	4.37	7.76	109.6
maitake	3.48	6.7	4.31	16.9	82.1

Total recovery は、全サンプルからの回収率平均値

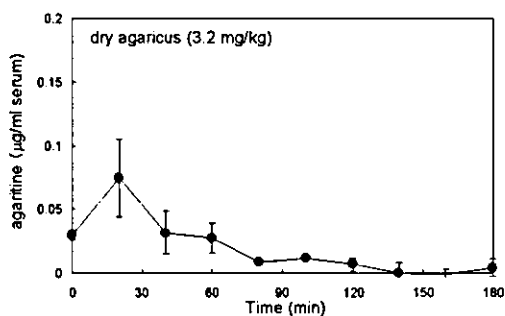


図6 アガリクス熱水抽出液投与マウスの血中濃度の経時変化

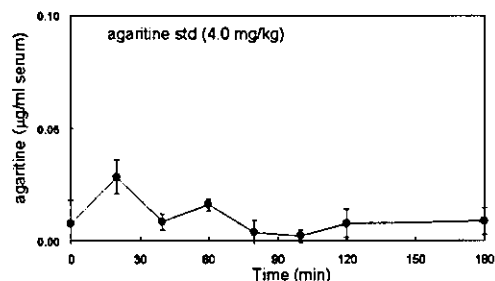


図7 agaritine 標準品 (4.0 mg/kg) 投与マウスの血中濃度の経時変化

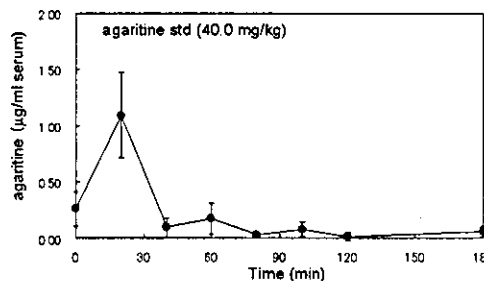
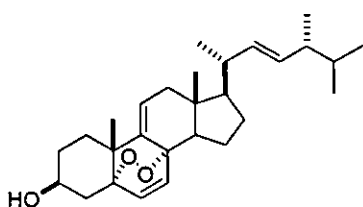
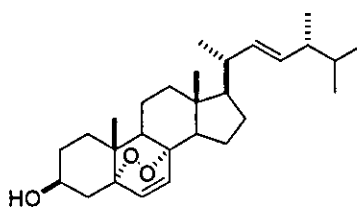


図8 agaritine 標準品 (40 mg/kg) 投与マウスの血中濃度の経時変化



5, 8-epidioxy-(24R)-22E-methylchlesta-6,9(11),22-trien-3-ol (1)



5, 8-epidioxy-(24R)-22E-methylchlesta-6, ,22-trien-3-ol (2)

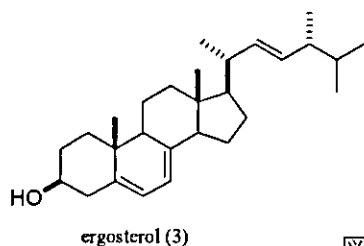


図9 アガリクスから単離精製された ergosterol 類 ergosterol peroxide は弱い細胞傷害性を示す。

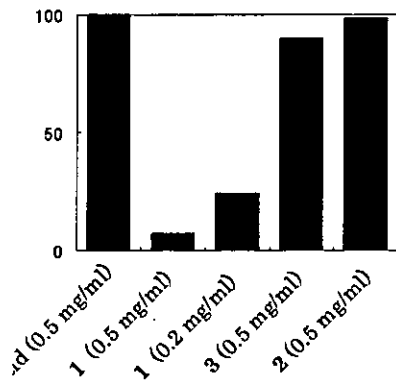


図10 アガリクスから単離精製された ergosterol 類の KB 細胞に対する細胞毒性

このスポットに化合物1~2が含まれる。
 なお、アガリクスは4種 (Ch, 中国産; Br, ブラジル産; Tu, 産地不明; Ja, 日本産) を用いて比較

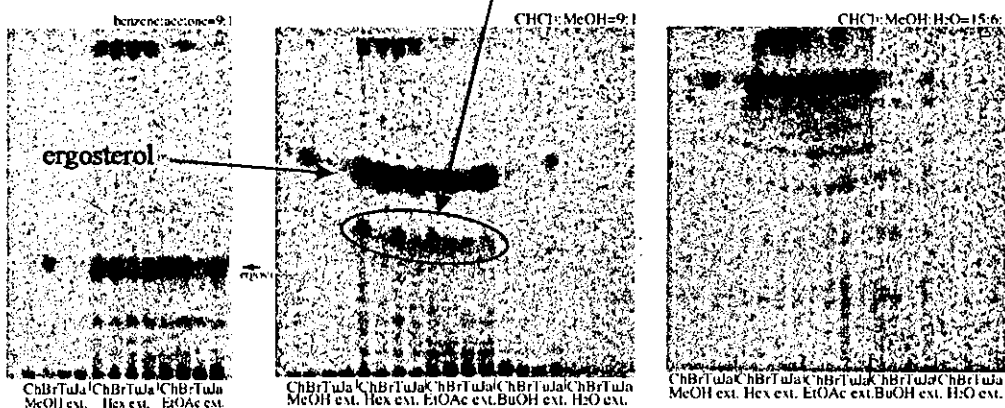


図11 アガリクスから単離精製された ergosterol 類の TLC

Table II アガリクス製品の生物活性評価

サンプル濃度	挿体活性 (1mg/ml)	NK細胞傷害性 (1mg/ml)	KB cell (1mg/ml)	細胞毒性 (1mg/ml)	ヒスタミン分泌 (0.1mg/ml)	Bacillus subtilis (1mg/disk)
sample name	抑制率	抑制率	生存率	抑制率	抑制率	阻止円直径
高純度アガリクス 水 ext.	ND	10.50	113.56	-40.17		0
高純度アガリクス BuOH ext.	19.84	1.45	104.26	-34.58		9
高純度アガリクス AcOEt ext.	39.63	-24.75	15.91	-36.03		10
高純度アガリクス Hex ext.	22.42	-16.23	84.59	-26.87		0
日本産アガリクス 水 ext.	8.39	5.78	134.69	-36.93		0
日本産アガリクス BuOH ext.	20.45	1.44	70.62	-35.83		0
日本産アガリクス AcOEt ext.	20.68	-19.09	77.92	-10.77		9
日本産アガリクス Hex ext.	15.22	-0.65	79.24	3.14		0
ブラジル産アガリクス 水 ext.	12.73	12.03	108.94	-5.00		0
ブラジル産アガリクス BuOH ext.	16.22	9.45	56.20	-9.52		9
ブラジル産アガリクス AcOEt ext.	41.88	2.26	50.73	-15.96		9
ブラジル産アガリクス Hex ext.	8.13	-12.18	66.39	-10.97		0
中国産アガリクス 水 ext.	0.01	4.55	129.62	-36.88		0
中国産アガリクス BuOH ext.	2.45	4.84	71.26	-31.58		9
中国産アガリクス AcOEt ext.	22.00	-1.02	16.36	-33.00		9
中国産アガリクス Hex ext.	8.11	22.78	88.07	-6.37		0
アガリチン0.1 mg	13.49	6.13	109.79	-21.40		0

四角で囲んだところが、今回活性があった分画

Ⅱ. 分担研究報告書

3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

分担研究者 米谷 民雄

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）

分担研究報告書

分担研究課題：担子菌類中の必須・有害金属の分析

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨：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。

協力研究者

長岡（浜野）恵 国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官

A. 研究目的

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) 試料

表1に示すアガリクス健康食品、およびキノコ類は、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。

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18MΩcm以上の超純水を使用した。

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製)

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

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。

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。

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

ICP 発光分析装置での分析波長を、表 2 に示す。

8) 添加回収

1 製品 (製品 B) に表 3 で示した量の金属を添加し、上記の分析方法に従って分析した時の添加回収実験の結果を、表 3 に示す。全金属につき、ほぼ 100% の回収率が得られた。

C. 研究結果

アガリクス健康食品およびキノコ中の金属含量の分析結果を、表 4 に示す。分析値は、液状製品 K および L では液体ベースで示してある。

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 (B、C) が見られた。Pb については、特に高い値は検出されず、製品 F の約 2 mg/kg が最高であった。

表には示していないが、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 D 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、製品 D 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。

表 4 の必須金属では、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、健康食品Dで3,300 mg/kg と高値であったが、製品への表示から、これはアガリクス茸本来のGeではなく、Ge化合物を添加しているためと判断された。

Crについては、健康食品Dで9.7 mg/kg、製品Iで5.7 mg/kgであり、他の製品に比べ高い値であった。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(表5)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。表には示していないが、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。表には示さないが、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の販売者からは、登録検査機関で分析した結果として、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

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 µg/kg/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 µg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 µg (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を下回ることが必要と考えられ、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 mg/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

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。

G. 研究発表

- 1) 論文発表：
現在執筆中。
- 2) 学会発表：
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 分析したアガリクス健康食品

製品	形状
製品A	粉末
製品B	顆粒
製品C	粉末
製品D	顆粒
製品E	顆粒
製品F	粒
製品G	粒
製品H	顆粒
製品I	粉末
製品J	粉末
製品K	液体
製品L	液体

表2. ICP-AES測定波長

元素	波長(nm)
Al	308.2
Cd	228.8
Cr	267.7
Cu	324.7
Fe	259.9
Ge	209.4
Mn	257.6
Pb	220.3
S	182.0
Zn	213.8

表3. 添加回收試驗

	添加量(μg)	回收率
Al	160	101 \pm 3
Cd	20	101 \pm 1
Cr	10	99 \pm 6
Cu	160	99 \pm 6
Fe	160	100 \pm 2
Mn	20	100 \pm 1
Pb	20	101 \pm 4
Zn	160	100 \pm 1

回收率: mean \pm S.D. (n=3)

表4. 健康食品中の金属 (mg/kg、製品KとLのみmg/L)

	製品A	製品B	製品C	製品D	製品E	製品F
Al	21.4 ± 0.2	67.9 ± 1.9	102.9 ± 2.6	74.9 ± 1.0	1.2 ± 0.3	170.1 ± 2.2
Cd	2.2 ± 0.1	8.7 ± 0.0 ₃	10.5 ± 0.2	1.3 ± 0.0 ₂	N.D.	3.4 ± 0.0 ₄
Cr	N.D.	0.5 ± 0.0 ₄	0.5 ± 0.1	9.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0 ₅	1.3 ± 0.0 ₃
Cu	16.4 ± 0.1	55.8 ± 0.6	63.6 ± 0.9	87.0 ± 1.3	4.3 ± 0.0 ₅	50.2 ± 0.3
Fe	27.8 ± 0.2	78.3 ± 1.8	97.0 ± 2.3	155.4 ± 2.1	35.4 ± 0.2	90.0 ± 0.7
Ge	N.D.	N.D.	N.D.	3291 ± 812	N.D.	N.D.
Mn	2.4 ± 0.0 ₃	7.0 ± 0.0 ₄	9.5 ± 0.1	4.9 ± 0.1	3.1 ± 0.0 ₂	9.7 ± 0.1
Pb	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.3	N.D.	N.D.	1.9 ± 0.4
S	2818 ± 34	3486 ± 27	4526 ± 47	2334 ± 31	3609 ± 22	4525 ± 28
Zn	12.7 ± 0.2	89.0 ± 0.8	110.6 ± 1.5	59.4 ± 0.8	66.0 ± 0.2	105.6 ± 0.7

	製品G	製品H	製品I	製品J	製品K	製品L
Al	5.2 ± 0.1	27.0 ± 0.1	104.9 ± 0.5	218.8 ± 3.2	N.D.	2.3 ± 0.0 ₄
Cd	N.D.	1.0 ± 0.0 ₂	1.0 ± 0.0 ₄	1.6 ± 0.0 ₁	N.D.	N.D.
Cr	N.D.	N.D.	5.7 ± 0.0 ₄	1.8 ± 0.1	N.D.	N.D.
Cu	5.2 ± 0.1	9.5 ± 0.1	49.8 ± 0.3	90.2 ± 1.1	N.D.	0.3 ± 0.0 ₀₃
Fe	14.7 ± 0.2	30.2 ± 0.2	139.1 ± 0.7	196.5 ± 3.0	0.8 ± 0.0 ₄	5.1 ± 0.0 ₂
Ge	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mn	1.0 ± 0.0 ₂	2.2 ± 0.0 ₁	5.1 ± 0.0 ₂	8.6 ± 0.1	N.D.	2.9 ± 0.0 ₁
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	0.6 ± 0.2	N.D.	N.D.
S	1197 ± 3.8	2223 ± 11	2393 ± 13	3657 ± 33	59 ± 1.9	31 ± 0.4
Zn	6.9 ± 0.1	10.2 ± 0.1	57.6 ± 0.3	98.7 ± 0.9	0.4 ± 0.0 ₁	2.1 ± 0.0 ₁

定量限界: 0.5 mg/kg

Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

製品K, Lは液体のため、凍結乾燥の後、灰化し測定した。