

200501049A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 龜山 浩

平成18(2006)年4月

# 目 次

I. 総括研究報告書 .....	1
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 .....	33
梶山 浩	
2. 生体試料中のヒドラジン誘導体の分析および代謝 .....	49
近藤 一成	
3. 担子菌類中の必須・有害金属の分析 .....	61
米谷 民雄	
4. 担子菌類中のヒドラジン類の蛍光誘導体化による網羅的解析 .....	73
長岡 恵	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	85
IV. 研究成果の刊行物・別刷り .....	87

# 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 穉山 浩

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨：UV-HPLC 法を用いたアガリクス茸 (*Agaricus blazei* Murrill) を含む健康食品製品中の agaritine の簡易分析法を開発した。クリーンナップ操作である固相抽出法のカートリッジに逆相系、ポリマー系、陽イオン交換系、陰イオン交換系を用いて検討したが、すべて同程度の効果であり、汎用されている逆相系を用いることにした。また UV-HPLC 法で夾雑物との分離が困難であったが、粒径の細かい逆相カラムを用いることにより、共雑成分との分離分析が可能となった。アガリクス茸を含む製品における agaritin の回収率は良好であり、精度管理で用いる方法として、簡易に測定可能できる方法であると考えられる。また本研究におけるアガリクス茸 (*Agaricus blazei* Murrill) を含む摂取によるリスク評価を行った。同じ *Agaricus* 属であるマッシュルーム (*Agaricus bisporous*) とそれに含まれるフェニルヒドラジン誘導体の毒性情報からアガリクス茸 (*Agaricus blazei* Murrill) のリスク評価を検討した。agaritine の体内動態を解明するため、LC/MS/MS 法を用いて、合成 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、agaritine 標準品 (agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg mouse) 投与マウスでは agaritine は投与直後 5 分ですでに血中に現れ、20 分で血中濃度が最大 (0.06 or 0.4  $\mu\text{g/ml plasma}$ ) となり、100 分までに消失した。尿中 agaritine も投与後 24 時間以内のみに検出され (12 時間尿で 0.146、24 時間尿で 0.018  $\mu\text{g/ml urine}$ )、それ以降は検出されなかった。agaritine の DNA 損傷について、agaritine (4.0 or 40.0 mg/kg) 投与マウスの尿中 8-OHdG を経時的に測定したところ、投与群で 8-OHdG 量が有意に上昇した (コントロールの 2.5 倍)。アガリクス中の細胞毒性成分について検索し、数種のエルゴステロール類を単離したが、強い毒性を持つ化合物は見つからなかった。アガリクス健康食品中の有害成分とされるアガリチン (agaritine) と関連化合物について、特別な試料前処理を必要としない、代謝産物をも含めたヒドラジン類の、DMEQ-COCl (3,4-dihydro-6,7 dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoline-2- carbonyl chloride)を用いた簡便・選択的・高感度一斉分析法を確立した。4-hydrazinylbenzoic acid (CPH)、agaritine、phenylhydrazine (PH)、4-methylphenylhydrazine (MPH)の検出下限はそれぞれ 422、45.3、16.5、138 fmol (20  $\mu\text{L}$  注入時)であった。アガリクスを含むキノコ中およびアガリクス健康食品中の agaritine 量は 8.3–1836  $\mu\text{g/g dry weight}$  であり、CPH、PH、MPH は検出されなかった。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。昨年度、Cd 濃度が高かった製品 B と C については、Cd 濃度のフォローアップを行った。その結果、製品 B では、今年度購入したものは Cd 濃度が 5 mg/kg 以下であった。製品 C では 4~5 月に入手したロットにおいては Cd 濃度が高かったが、平成 18 年には購入できない状態であった。一方、一部のキノコでは Hg 濃度が高いことが知られている。そこで、アガリクス茸についても総 Hg とメチル Hg 濃度を調べたところ低値であった。他の総 Hg 値が高かったキノコでも、メチル Hg 濃度は低かった。アガリクス健康食品中の Cd の存在状態を調べるために、Cd 濃度の高い製品につき、HPLC/ICP-MS 法を用いて状態分析を行ったところ、Cd が高分子化合物に結合している可能性が示唆された。

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）、長岡恵（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）

協力研究者：阿部郁朗、田中秀弥（静岡県立大学薬学部）、松浪勝義（広島大学大学院 医歯薬学総合研究科）、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* Murrill というキノコを指すが、agaritine を含めヒドラジン化合物含有についての報告が少ない。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、HPLC あるいは 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する。また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、agaritine を含む一連の phenylhydrazine 化合物を含むキノコ摂取のリスク評価を行う。

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。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。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・必須金属の分析及びリスク評価についても検討する。

## B. 研究方法

### 標準品の合成・リスク評価

#### 1. アガリクス茸を含む健康食品製品中の agaritine の簡易分析法の検討

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）

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 NaHPO<sub>4</sub> 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)に混合したものを 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)

## 2. アガリチン摂取のリスク評価

キノコとヒドラジン誘導体の毒性関係の論文を多数発表している University of Nebraska

Medical Center の Dr. B. Toth による論文・総説とノルエーの行政によるマッシュルーム (*Agaricus bisporus*) のフェニルヒドラジン誘導体のリスク評価に関する報告と (Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)-occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations) と MEDLINE 検索により「アガリクス茸」の毒性関連の生物活性に関する文献報告から、健康食品で売られている *Agaricus blazei* Murrill「アガリクス茸」のリスク評価を検討した。

## 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウス中での体内動態

### 1. 標準品

$\beta$ -N-( $\gamma$ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenyl hydrazine (一般名 agaritine)、agaritine 純度は、HPLC-UV 検出および <sup>1</sup>H-NMR 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、ミルを用いて粉砕して試料

とした。

agaritine 代謝実験には、8週齢雄 ddY マウスを用いた。ヒト肝ミクロソームはチャールズリバーから購入した。

### 3. 装置

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。食品成分中の agaritine 定量用に  $m/z$ 122、確認用に  $m/z$  248 を用いた。血漿中の agaritine 定量は  $m/z$ 248 を用いた。HPLC は Agilent 製 1100 series を用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂、3  $\mu$ 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。

血漿サンプルは、マウス眼底血からヘパリンが入ったエッペンドルフチューブに採取し直ちに氷上に置いた。採取後、遠心分離により (14,000 rpm, 20 min) 血漿を分離した。分析前処理は、3 倍量のアセトニトリルで除タンパク後 必要に応じて希釈後、LC/MS/MS 分析した。

### 5. agaritine 投与マウスの血漿中 agaritine 分析

7週齢雄 ddY マウスを 1 週間馴化後 (8 週齢)、27 匹を 3 匹ずつ 9 群に分け以下のように実験を行った。agaritine 標準品をマウスに 4.0 mg/kg mouse になるように経口投与し、投与直後 (5 分) と以下 20 分間隔で 180 分後まで採血した。血漿分離、除タンパク後 LC/MS/MS を用いて agaritine 定量を行った。同様の実験を、agaritine 投与量 40.0 mg/kg mouse でも行った。

### 6. agaritine 投与マウス血漿中 agaritine 代謝物

これまで、agaritine を用いた in vivo 試験はすべて放射活性ラベル agaritine を用い、放射活性を指標に分析している。そのため、投与後に検出されたものが agaritine か代謝分解物なのかは不明である。そこで、agaritine 代謝物を検索するために、5.の実験で agaritine 投与マウスから経時的に集めた血漿について LC/MS で full scan ( $m/z$  100-1000) モード、フォトダイオードアレイ検出器 PDA で UV (200-400 nm) scan でモニターし、コントロールマウス (agaritine 溶解に用いた MilliQ 水) からの血漿の結果 (control) と比較した。LC/MS データ解析には、Analyst ソフトウェアの他に代謝物解析ソフト Metabolite ID を用いた。

### 7. agaritine 投与マウスの尿中 agaritine 分析と代謝物解析

8 週齢雄 ddY マウス 40 匹を 4 匹ずつ 10 個の代謝ゲージに入れた。代謝ゲージ 5 個をコントロール群、のこり 5 個を agaritine 40.0 mg/kg 投与群と

した。agaritine 投与後から、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h で尿を糞と分けて採取した。尿は、必要に応じて希釈して3倍希釈して LCMS/MS 測定した。

また、血漿サンプルと同様に agaritine 代謝物を検索した。

#### 8. agaritine のヒト肝ミクロソームでの代謝

agaritine のヒトでの代謝を検討するために、ヒト肝ミクロソーム (チャールズリバーより購入) を用いて代謝実験を行った。反応は、ミクロソーム (1 mg/ml)、agaritine (1.96 µg/ml)、NADPH generating system に第 II 相反応 (抱合反応) も起こるように、UDPGA (uridine diphosphate glucuronic acid) と PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) 存在下で 0 分から 60 分行った。

#### 9. agaritine 投与による DNA 損傷

8 週齢雄 ddY マウス 40 匹を 2 群 (各 20 匹) に分けた。各 20 匹は 4 匹ずつ代謝ゲージ (5 個) に入れた。agaritine 投与群には agaritine 標準品を 40 mg/kg mouse 経口投与し、直後から 12h、24 h、48 h、72h、96 h、9day、11day と尿を採取した。採取した尿を希釈して ELISA (日本老化制御研究所) にて 8-OHdG 量を測定した。また、尿中クレアチニン量を測定し、尿中 8-OHdG 量をクレアチニン mg あたりに換算した。コントロール群には agaritine を溶解するのに用いた MillQ 水を投与した。さらに、尿中 MDA (malondialdehyde) 量を測定し、脂質過酸化量を求めた。

#### 10. アガリクス中の細胞毒性成分

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。

昨年度はアガリクス 450 g から活性試験を指標に ergostane type のステロイド化合物 3 種を単離同定した。今回は、微量成分も検索するために、乾燥アガリクス 11kg とスケールアップして行った。

#### 担子菌類中のヒドラジン類の蛍光誘導体化による網羅的解析

##### 1. 試料

ヒドラジン類のアガリチン (β-N-(γ-L(+)-glutamyl)-4-(hydroxymethyl) phenylhydrazine, agaritine) および 4-hydrazinylbenzylalcohol (HMPH) は、合成したものを他の分担研究者から入手した。3,4-dihydro-6,7 dimethoxy-4-methyl-3-oxo-quinoxaline-2-carbonyl chloride (DMEQ-COCl) は同仁化学研究所のものを使用した。4-hydrazinylbenzoic acid (CPH)、phenylhydrazine (PH)、4-methylphenylhydrazine (MPH)、および他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。ヒドラジン類、



アガリクス健康食品 (product A、B、C)、およびキノコ類 (*Agaricus blazei* Murrill 3 検体、*Agaricus bisporus* 1 検体、シイタケ 1 検体) 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。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. 装置

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置: ポンプ: L-7100、日立製作所(株)製、蛍光検出器: RF-10AXL、島津製作所(株)製

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

核磁気共鳴スペクトル(NMR)装置: 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. HPLC 条件

Analytical conditions: column, XBridge™ shield RP18 column (4.6 mm i.d. x 150 mm,

particle size 3.5 μm, Waters, MA, U.S.A.); column temp., at room temp.; solvent A, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)/MeOH = 70/30, solvent B, MeOH/水=90/10; Gradient condition, solvent B 0–14 min, 0%; 14–15 min, from 0% to 40%; 15–24 min, from 40% to 80 %; 24–34 min, 80 %; injection volume, 20 μL; flow rate, 0.7 mL/min; detect, Ex: 392 nm, Em: 462 nm。

## 4. 蛍光ラベル化反応

ヒドラジノ基に着目し、DMEQ-COClにより、ヒドラジン類を蛍光ラベル化した。すなわち試料溶液(100 μL)に 5 mM DMEQ-COCl のジ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、MeOH/水=30/70 (800 μL)を加えた後、カラムに負荷した。

## 5. phenylhydrazine 蛍光ラベル化体の構造確認

PH の蛍光ラベ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 PH の蛍光ラベル化体を溶出し、溶出画分を濃縮後、分取用カラム(Inertsil ODS-3 (10 i.d. x 250 mm)に負荷し、MeOH/水(65/35)を溶離液とし、流速 3 ml/min にて、PH 蛍光ラベル化体のピー

クを分取し、濃縮した。これをまず  $^1\text{H-NMR}$  および  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO) 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。

#### 6. 反応時における WSC とピリジンの存在による影響

ピリジン共存下での蛍光ラベル化反応の実験は、ピリジンの最終濃度 1.5% 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。

#### 7. 食品からの AGARITINE を含むヒドラジン類の抽出方法

粉末試料 0.5g に MeOH 30 ml 加え、3 時間振とう抽出した。遠心分離後、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにてろ過し、上清を得た。抽出液は milli Q で 10 倍以上希釈し、試料溶液を得、蛍光ラベル化反応を行った。

### 担子菌類中の必須・有害金属の分析

#### 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。製品 B-1 は昨年度測定した検体、製品 B-2 は平成 17 年 4 月、製品 B-3 は平成 18 年に購入した。製品 C-1 は昨年度測定した検体、製品 C-2、C-3 はロットは異なるがともに平成 17 年 4～5 月に購入したものである。なお、平成 18 年には購入不可能であった。

#### 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 18 M $\Omega\text{cm}$  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 TC (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

(1000 W, 内部温度制御コントロール T1: 40°C まで昇温, 0-2 min) → (0 W, 2-3 min) → (1000 W, T1: 80°C まで昇温, 3-23 min) → (0 W, 23-24 min) → (1000 W, T1: 70°C まで昇温, 24-29 min), → (1000 W, T1: 70°C で一定 29-59 min), 外部温度制御コントロール T2: 50°C

##### Microwave program 2

(1000 W, T1: 220°C まで昇温, 0-10 min) → (1000 W, T1: 220°C で一定, 10-60 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

アガリクス健康食品のうち、粒状のものは粉碎した、生キノコでは、均質化をはかるため、凍結乾燥後粉末化して分析した。

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<sub>x</sub> 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。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. 金属の状態分析用試料調製

試料 0.5 g に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 ml を加え、20 min 振とう抽出を行い、遠心分離後、0.45 μm のフィルターにてろ過し、上清を得、試料溶液とした。金属の状態分析は、製品 B-1、製品 C-1 およびアガリクス茸 C の 3 検体について行った。

#### 7. 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。

#### 8. 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。

#### 9. HPLC/HR-ICP-MS 測定条件

HPLC システムは、島津製作所製のオール PEEK 仕様の装置を用いた。高分解能 ICP-MS は、ELEMENT (Finnigan Mat) を用い、分解能  $m/\Delta m = 4000$  にて測定を行った。実験条件の詳細は表 3 にまとめた。

#### 10. 総 Hg およびメチル Hg の分析方法

キノコ中の総 Hg の測定は還元気化原子吸光法、メチル水銀は ECD ガスクロマトグラフィー法により行った。

### C. 研究結果

#### 標準品の合成・リスク評価

1. アガリクス茸を含む健康食品製品中の agaritine の簡易分析法の検討

##### 1. HPLC 分析条件の検討

粒径 1.8 μm の逆相カラムの 5 cm のカラムを 3 連結にすることで agaritine と共雑ピークとの分離が良好になった。カラム温度は、35°C に比べて 40°C あるいは 45°C の方が agaritine と共雑ピークとの分離が良好になった。移動相は、0.01 % 酢酸 + メタノール (99+1, v/v) を使用したが、分析毎にメタノール洗浄を行い、再度 0.01 % 酢酸 + メタノール (99+1, v/v) で平衡化させることにした。

## 2. 固相抽出法の検討

固相抽出用カートリッジとして逆相系、ポリマー系、陽イオン交換系、陰イオン交換系を用いて検討したが、すべて同程度の効果であった。そのため汎用されている逆相系を用いることにした。

## 3. 添加回収実験の検討

数種の健康食品における agaritin の添加回収実験の検討を行った。検討した健康食品検体において良好な回収率を示した。アガリクス茸を含む製品から抽出したアガリチン分析試料は、常温で分解しやすいため、オートサンプラーで分析する際も4℃に設定しておかないと分解してしまうことが明らかになった。また、冷蔵保存中でも不安定であるため、抽出した後は可能な限り直ちに分析する必要があることが明らかになった。

## 2. アガリチン摂取のリスク評価

アガリクス属のキノコには、アガリチン ( $\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)-Glutamyl]-4-hydroxy- methyl phenylhydrazine, Agaritine) <sup>資料1</sup> というフェニルヒドラジン誘導体が含まれており、その毒性についてかねてから指摘されていた。平成12年度厚生科学研究費補助金生活総合安全研究事業「食品中の有害物質等の評価に関する研究(主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広)」において、アガリクス属キノコ27種のヒドラジン誘導体の存在及びその毒性情報に関する文献調査が行われ、アガリクス (*Agaricus*

*blazei* Murrill) に関しては、アガリチンを含めたヒドラジン誘導体の存在、及びその毒性情報に関する報告は見受けられていなかった。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporous*) にはアガリチンが含まれており、マウスを用いた動物実験において発がん性が確認されているとの文献報告があった。

平成15年度から平成17年度の本研究において開発したLC/MS/MSを用いた高選択的高感度分析法により、種々のキノコ及びアガリクスを含む食品中のアガリチン含有量を調査したところ、一部のアガリクス茸を含む製品にアガリチンがN.D.~最大2,017  $\mu$ g/g dry の範囲でアガリチンが含まれているものが確認された<sup>資料2</sup>。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporous*) 中には198  $\mu$ 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*)、ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*) 中にはアガリチンは検出されなかった。

### ① 構造及び物性

・アガリクス属キノコに含まれるアガリチンそのものには毒性が報告されていないが、アガリチンが生体内の  $\gamma$ -glutamyl transpeptidas により分解され、4-(Hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMPH) を産生し、さらに HMPH が酸化されて4-(Hydroxymethyl)benzenediazonium ion (HMBD) が生成されると考えられている<sup>資料1</sup>。アガリチン

の前駆物質として 4-Hydrazinobenzoic acid (CPH),  $\gamma$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)glutamyl]-4-(carboxy)-phenylhydrazine (GCPH)が考えられている<sup>資料1</sup>。

・マッシュルーム中のアガリチン量については、加熱加工(煮る、揚げる、電子レンジによる加熱)により減衰されるという報告がある。またアガリチンは開放系の水溶液中では、2日間で完全に分解されることが明らかになっている。

・マッシュルーム中のアガリチン量については、種々報告されている<sup>資料3</sup>。平成15年度本研究の調査ではマッシュルーム中のアガリチン量は湿重量で198  $\mu$ g/gと測定された。

## ② アガリチンの体内動態

・マウスやラット等の動物実験で経口投与された放射同位元素標識アガリチンの代謝は速やかに行われ、消失する。数時間で血中放射活性レベルはピークに達し、3時間後消化管内には検出されなくなる。アガリチンの代謝体で考えられる毒性が強い第一候補として HMBD があるが、動態研究では血液からは検出されていない。

・アガリクス経口投与マウスでは、アガリチンは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。アガリチン標準品を用いた実験においても同様の傾向が見られた。(平成16年度及び平成17年度の報告書)

・経口投与された放射同位元素標識アガリチンを用いた代謝実験では、投与後数日たっても、

肝臓、腎臓、胃などで共有結合された放射活性が残存する。最も高い放射活性が残存するのは胃である。 $\gamma$ -glutamyl transpeptidaseはアガリチンを2化合物に分解する。そのうち主要のものが HMPH であり、次に強い変異原性のある HMBD に代謝すると考えられている<sup>資料4</sup>。

## ③ DNA 結合性と変異原性

・アガリチンの代謝体で考えられる HMBD は強い変異原性及び発がん性が示唆されている。

・HMBD は aryl diazenyl ラジカルと aryl ラジカルの2種のラジカルを産生し、DNA の deoxyribose 単位の C や、プリン環の N に反応し、DNA 損傷を起こすと考えられている<sup>資料5</sup>。

・Ames テストでマッシュルームの水抽出・エタノール抽出に弱い活性があることが示されている。また精製されたアガリチンにおいても弱い変異原性があることが示されている。そのためマッシュルーム抽出物の遺伝毒性はアガリチンやその代謝誘導体によるものと示唆されている<sup>資料6</sup>、<sup>資料7</sup>。なお、アガリチンの変異原性は、

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase の高い腎ホモジネートを代謝活性化系として用いた場合の方が肝ミクロソームを用いた場合より強く現れることが確認されている。

・また、トランスジェニックマウス (LacI gene を挿入した組換えマウス)を用いた粗抽出アガリチン経口投与実験において、粗抽出アガリチンは前胃、腎臓に変異を誘発したとの報告がある。ま

た HMBD が末梢のリンパ球に小核を誘発するとの報告がある。

#### ④ 毒性試験

・発がん性の観点としてアガリクスの慢性毒性実験は行われていないが、マッシュルームとそのフェニルヒドラジンのマウスを用いた長期発がん性試験研究が以下の論文で行われており、発がん性を示すことが示されている<sup>資料 8-1, 2, 3</sup>。肺、前胃、肝臓、卵巣、腺胃等で腫瘍発生が高い。

Toth B. and Ericson, *Cancer Research* 46, 4007-4011 (1986), Toth B. et al. *Oncology Rep.* 4, 931-936 (1997a), Toth B. et al. *in vivo.* 11, 227-232 (1997b), Toth B. et al. *in vivo.* 12, 239-244 (1998), McManus et al., *Laboratory Invest.*, 57, 78-85 (1987), Toth B. et al. *Anticancer Research.* 6, 917-920 (1986a), Toth B. et al. *Bt. J. Cancer.* 46, 417-422 (1982)

・マッシュルームの長期発がん性動物実験の 4 つの研究のうち、信頼性のあると思われる 3 つの研究で発がん性があることが示されている<sup>資料 8-1, 2, 3</sup>。残りの 1 つの研究では加工したマッシュルームを用いたもので、腫瘍発生の増加は有意ではないと結論している。

・一方、ラットの長期毒性試験では、腫瘍が発生しなかったと報告されている。しかし試験動物数が少なく、腫瘍発生の頻度が低いケースは検出できなかったとされている。またこれらの研究では、マッシュルームを加工した飼料をもちいてお

り、そのような加工過程で顕著に活性フェニルヒドラジン誘導体は分解されると考えられている。

・アガリチンの水溶液での溶解したものを長期投与した実験では、発がん性が見られていない。しかし近年、水溶液中で比較的酸化分解することがわかり、この実験の信頼性が疑問視されている<sup>資料 9-1</sup>。

・関連代謝物 CPH, GCPH, HMBD は高い投与量で発がん性があることが示されている<sup>資料 9-2, 3, 4</sup>。

・信頼性のあるマッシュルーム及び関連毒性物質の慢性毒性研究をまとめたものを資料 10 に示す。また北欧のマッシュルーム及び関連毒性物質のリスク評価を資料 11 に示す。

#### (5) その他アガリクスに関する毒性情報

・アガリクスの熱水抽出物をマウスに経口投与した場合、脾臓細胞中の Thy1.2 (pan T cells)、L3T4 (CD4, helper T cells) および Lyt2 (CD8, cytotoxic T cells) 陽性の細胞集団の割合が有意に増加した。

・マウスにおいて、double-grafted tumor system を用い、アガリクス子実体の酸処理画分 (ATF) で原発性腫瘍 (primary tumor) を処理したところ、抗腫瘍活性の著しく上昇した NK 細胞が、腫瘍部位へ浸潤した。また、ATF は、試験管内においてアポトーシス誘導によって腫瘍細胞の増殖を直接抑制した。

・一部のアガリクス製品には、カドミウムの含有量が高いものが見られたが、自主的な基準等を持って対応が図られている。(平成16年度の本研究報告書)

・食品添加物であるヒメマツタケ(アガリクス)の水抽出物(Agaricus blazei Murrillの菌糸体および子実体より水で抽出して得られたもの)をラットに投与し、90日間反復投与毒性試験を行った報告では、ヒメマツタケ水抽出物のNOAEL(無毒性量)は食餌中に5%、すなわち2654 mg/kg/日(雄)、2965 mg/kg/日(雌)であった。また、遺伝毒性試験は陰性であった。

### 3. 対象となる危害要因の海外及び国内における含有実態調査等

#### (1) これまでの国内外の試験結果

平成14年度厚生労働省により、アガリクスを含む食品について簡易分析によるアガリチン含有量の実態調査が行われ、市販の粉末、顆粒及び錠剤等の形状のアガリクスを含む食品の一部にアガリチンが比較的高く含有されていることが認められた。

平成15年度から平成17年度の本研究において開発したLC/MS/MSを用いた高選択的高感度分析法により、種々のキノコ及びアガリクスを含む食品中のアガリチン含有量を調査したところ、一部のアガリクスを含む製品にアガリチンがN.D.～最大2,017 µg/g dryの範囲でアガリチンが含まれているものがあることが確認された。

#### (3) アガリチン摂取状況

##### ① 北欧のマッシュルームからのアガリチン暴露評価

・デンマーク、アイスランド、ノルウェー、スウェーデンの北欧の国々では、マッシュルームを食用として多く摂取している。

・アガリチンの1日摂取量は 2.1-36 µg/day/kg body weight (北欧人の平均体重60 kgで換算) 年間48-788 mg/yearの摂取量

・マウスの慢性投与毒性実験のデータからリスク評価が平均して  $200 \times 10^{-6}$  と計算されている。これは生やフリーズドライのマッシュルームを1日に0.1 g/kg body weight(1日摂取量6 g)を一生食べ続けると1/5000の確率でがんが発生する危険性があると評価されている<sup>資料12</sup>。

(がん発生リスクはLinear extrapolation法によって計算された。マウスの平均体重を25g、ヒトの平均体重を60kgで、マウスの平均寿命を70 weeksとし、加工による影響などは考慮していない。)

##### ② 我が国のマッシュルームからのアガリチン暴露評価

・国民栄養摂取の調査のキノコ類内訳から1日に摂取する平均マッシュルーム量は下記となっている。マッシュルーム0.062 g、マッシュルーム(ゆで)0.019 g、マッシュルーム水煮缶詰0.283 g

・調査したマッシュルーム及び缶詰の測定データから、缶詰中のマッシュルームは乾燥重量で

6.7 µg/g でマッシュルームは湿重量で 198 µg/g となる。缶詰のマッシュルームは乾燥重量の値なので若干多く見積もることになるが、この測定値を用いてアガリチン摂取量を計算すると、合計で 14.3 µg/g になる。これを日本人の平均体重 50 kg として、kg body weight に計算すると 0.29 µg/day/kg body weight になる。

・ 北欧のマッシュルーム中アガリチンの摂取量

2.1- 36 µg/day/kg body weight なので、1日に約 5-6 g マッシュルームを摂取する北欧人に比べて、約 1/10 以下の摂取量になる。

### ③ アガリクス乾燥物食品からのアガリチン摂取試算

・ アガリクス粉末顆粒の推奨される 1 日摂取量 (5 g) とアガリチンの定量値 (1.35 mg/g) から 1 日摂取量を計算すると、1.35 mg/g (最大値) x 5 g = 6.75 mg になり、日本人の平均体重を 50 kg として 1 kg あたりで計算すると 6.75 mg / 50 kg = 135 µg/day/kg body weight となる。

・ アガリクス含有健康食品の推奨される 1 日摂取量 (1.8-5.4 g) とアガリチンの定量値 (0.41 mg/g) から 1 日摂取量を計算すると、0.41 mg/g x 1.8-5.4 g = 0.74- 2.21 mg になり、日本人の平均体重を 50 kg として 1 kg あたりで計算すると 0.74- 2.21 mg / 50 kg = 14.8- 44.3 µg/day/kg body weight となる。

### 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウス中での体内動態

#### 1. agaritine 投与マウスの血漿中 agaritine

合成した agaritine 標準品を投与した (4.0 mg/kg mouse と 40.0 mg/kg mouse) マウスから採取した血漿を分析した。その結果、agaritine は投与直後 (5分) ですでに血中に現れ、投与後 20 分で最大血中濃度に達し、その後は徐々に減少し 100 分までに血中からは消失した。この結果は、投与量によらず同じ傾向であった。

#### 2. agaritine 投与マウス血漿中 agaritine 代謝物

agaritine 投与マウス (40.0 mg/kg) から 20 分間隔で経時的に採取、調製した血漿を、LC/MS を用いてマススキャンモード (scan 範囲 m/z 100-1000) および波長スキャンモード (200-400 nm) で測定した。まずマススキャンモードから TIC (total ion chromatogram) を比較すると、コントロールと投与群 (投与後 5 min、20 min、60 min、180 min) で変化があるピークが全く認められなかった。代謝物解析ソフト Metabolite ID を用いて解析したが、代表的な代謝物は見いだせなかった。波長スキャンモード (200-400 nm) から TWC (total wavelength chromatogram) を両群で比較したところ、投与後 20 分から 60 分にかけて保持時間 19 分に投与群のみに見られるピークを見出した。このピークは agaritine 代謝物である可能性が高いが、血漿中で微量であるため単離、構造解析は困難であった。

#### 3. agaritine 投与マウスの尿中 agaritine 分析と代謝物解析



代謝ゲージを用いて agaritine 投与マウス (40.0 mg/kg) から経時的 (12h, 24 h, 48h, 72 h, 96 h) に尿を採取、LC/MS を用いてマススキャンモード (scan 範囲  $m/z$  100-1000) および波長スキャン (200-400 nm) で測定した。その結果、12 時間尿に血漿中に見られた保持時間 19 分の agaritine 代謝物と考えられるピークが尿中でも見られ、UV スペクトルも一致した。このことから、agaritine 代謝物は血中では 20 分から 180 分に見られ、尿中では 12 時間尿 (12 時間以内) のみに検出された。

現在この agaritine 代謝物と考えられる物質を単離し、構造を明らかにすることを行っている。

#### 4. agaritine のヒト肝ミクロソームでの代謝

ヒト肝ミクロソームを第 I 相、第 II 相反応が起きる条件で、agaritine が代謝されて減少するか検討した。測定は、LC/MS/MS 法を用いて行った。その結果、agaritine は 60 分までのインキュベーションで減少は見られなかった。ミクロソームは、male、female 両方検討したが同様に変化は見られなかった。

#### 5. agaritine 投与による DNA 損傷

agaritine 投与したマウスについて、DNA 損傷の指標として尿中 8-OHdG を ELISA で測定し、コントロールと比較した。その結果、8-OHdG は 12 時間尿で既にコントロールの 2 倍以上に上昇し、agaritine 投与により DNA が損傷を受けていることが示唆された。agaritine 投与群での 8-OHdG 量

は、24-48 時間尿でいったん減少し、ベースラインになったが、その後再び 8-OHdG が上昇し、コントロールの 2 倍以上の値を 9 日まで維持した後、11 日目で減少した。agaritine 投与によりマウス DNA が損傷することが示唆されたが、2 相性の変化については不明である。

また、agaritine 投与で agaritine が代謝分解され、フリーラジカルを生成し、その連鎖反応により脂質過酸化が起きている可能性も考えられたので、尿中 MDA 値も測定した。その結果、尿中 MDA はコントロール群と agaritine 投与群で差が見られなかった。

#### 4. アガリクスの細胞毒性活性

抽出、分画は、乾燥アガリクス (*Agaricus blazei* Murill) 11 kg からメタノール抽出し、酢酸エチル層、ブタノール層、水層を得た。酢酸エチル層を得た。このうち、これまでに酢酸エチル層について、カラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて細胞毒性試験の結果を指標に活性成分を検索した。その結果、8 種の化合物 (うち 2 種は新規化合物) を単離した。ergosterol 類縁体が弱から中程度の細胞毒性を示した。

#### 担子菌類中のヒドラジン類の蛍光誘導体化による網羅的解析

1. CPH<sup>+</sup>, agaritine<sup>+</sup>, PH<sup>+</sup>, MPH-DMEQ-CO 体を負荷した際の典型的なクロマトグラム

CPH、agaritine、PH、MPH の蛍光ラベル化体は、それぞれ、18.0、23.2、26.2、28.4 min の

保持時間で検出された。なお、結果は示していないが、HMPH-DMEQ-CO は agaritine-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出された。

## 2. 蛍光ラベル化体の Ex と Em

CPH、agaritine、PH、MPH の蛍光ラベル化体の蛍光スペクトルは、すべて Ex: 390-394 nm, Em: 461-464 nm 付近に極大波長が観察されたことから、測定波長として、Ex: 392 nm, Em: 462 nm を採用した。

## 3. 蛍光ラベル化反応における加熱温度および反応時間の検討

CPH においては、37°C よりも 100°C での加温の方が、蛍光ラベ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がわかった。agaritine、PH、MPH においては、100°C に比し 37°C の方が、蛍光ラベ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がわかった。

## 4. 蛍光ラベル化反応における WSC およびピリジンの影響

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-dimethylaminopropyl)carbodiimide) やピリジンの共存下で蛍光ラベル化反応を行うことが多い。そこで、ヒドラジン類の蛍光ラベル化反応におけるこれらの影響を調べたところ、4つのヒドラジン類の

いずれにおいても、WSC およびピリジンを加えない方が、反応が進行した。

## 5. PH の蛍光ラベル化体の構造確認

蛍光ラベル化体の構造を確認するため、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-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 の蛍光ラベル化体 (PH-DMEQ) (MW:354.36) では、positive モードで PH (MW:108.14) の [M+H]<sup>+</sup> 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]<sup>+</sup> 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:

蛍光ラベル化体 (MW:354.36) では positive モードで、*m/z* 108 の M<sup>+</sup>イオンが検出されたが、*m/z* 109 の [M+H]<sup>+</sup> に相当するイオンは検出されなかった。親イオンの [M+H]<sup>+</sup> イオンの *m/z* 355 や M<sup>+</sup>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 では、positive モードで *m/z* 108 の M<sup>+</sup>イオンと *m/z* 109 の [M+H]<sup>+</sup> イオンの両方が検出された。

## 6. 検量線および検出下限

CPH、agaritine、PH、MPH において、それぞれ良好な直線性が得られた。検出下限は、CPH、agaritine、PH、MPH でそれぞれ 422、45.3、

16.5、138 fmol であった。

#### 7. アガリクスを含むキノコおよびアガリクス健康食品中のヒドラジン化合物量の分析

*Agaricus bisporus* すなわち西洋マッシュルーム中の agaritine は 1,836 µg/g dry であった。*Agaricus blazei* Murrill 中の agatritine は 111.9—731.3 µg/g dry であった。シイタケ中の agaritine は 8.3 µg/g dry であった。一方、アガリクス健康食品 3 製品中の agaritine 量は、product A で 1,791 µg/g dry、product B で 124.3 µg/g dry、product C で N.D. であった。なお、調べた検体において、CPH、PH、MPH は検出されなかった。

#### 8. agaritine の回収率

回収率は 93.6—102% と良好であり、試料溶液中のマトリックスによる蛍光ラベル化反応への影響はほとんど見られなかった。

#### 担子菌類中の必須・有害金属の分析

有害金属に関しては、昨年度の分析結果で Cd 濃度が高かった製品 B と製品 C の、それぞれロットが異なるもの、および、それら以外の製品について分析した。昨年度の結果では、製品 B と製品 C の Cd 濃度はそれぞれ 8.7、10.5 mg/kg であった。今年度は、製品 B では Cd 濃度が 4.8、3.2 mg/kg と低くなっていたことから、Cd の値が高値にならないように、原料が吟味されているか、デキストリンなど何らかのものが添加されていることが考えられた。一方、製品 C については、年度当初に購入したものでは昨年度と同様に高

値であったが、年度末には購入できなかった。両製品とも Pb については検出されなかった。製品 M、N、O は、製品 B と販売者が同じで、年度はじめに購入したものであるが、Cd の値はそれぞれ 5.1、5.6、6.6 であった。また、製品 P の Cd は N.D. であった。

必須金属では、昨年度の 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が、今年度の結果も Cu は 5—66 mg/kg、Fe は 30.4—102 mg/kg と同様の傾向であった。Cr については、昨年は 9.7 mg/kg や 5.7 mg/kg の製品がみられたが、今年度の限られた製品では、値は N.D. であった。Zn については、昨年は 7—111 mg/kg、今年は 20—116 mg/kg であった。

キノコ類の分析結果では、アガリクス茸の Cd は、2.6—7.5 mg/kg (乾燥質量) であり、ポルチーニ茸の Cd は 0.7 と 2 mg/kg (乾燥質量) であった。As (表に示さず) や Pb は特に検出されなかった。ポルチーニ茸中の S は、アガリクス茸の S の約 3 倍であった。

今年度はアガリクス茸も含め、総 Hg およびメチル Hg 濃度も検討した。その結果、ポルチーニ茸 A、B では、総水銀は 3、4 mg/kg (乾燥質量) であった。一方、アガリクス茸の総 Hg はポルチーニ茸に比べ大変低い値であり、0.1、0.5 mg/kg (乾燥質量) であった。なお、いずれのキノコにおいても、メチル Hg はほとんど検出されなかった。

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、Cdの値の高かった製品を用い、各金属の化学形や存在状態の解析を行った。アガリクス茸Cでは、Sは11.8 min、Feは11.1 minにピークがみられた。Cdは11.1 minに1つの大きなピークとして検出された。Mnについては、10.9 minのピークその他、9.4 minにも小さなピークが見られた。Cuは10.9、12.2、13.1 minに計3本のピークがみられ、Znは11.0と12.0 minにピークが見られた。なお、アガリクス健康食品の製品Bや製品Cについても検討したところ、Cdのピーク強度が小さい以外は、ほぼ同様なクロマトグラムが得られた。

#### D. 考察

##### 標準品の合成・リスク評価

アガリチンを標準物質としてUV-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。確立した方法は、アガリクス茸を含む食品摂取のリスク評価を検討した。

##### 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウス中での体内動態

今年度は、agaritine代謝について検討した。まず、agaritine投与マウスの血中agaritine濃度の経時変化を見たところ、投与開始5分で既に血中に現れた。一部胃での吸収も考えられた。Agaritineはその後、20分で血中最大濃度に達し、100分までに消失した。これは、agaritineが極性物質であり蓄積しないためと考えられる。また、血中最大

濃度は40 mg/kg投与で0.4 µg/ml plasmaであり、マウスを25 gとすると1 mg/mouseで、agaritineは血中に最大0.8 µg（全血液量を2 mlとする）となり、0.08%である。

agaritine40 mg/kg投与マウスの全血と血漿を分析し比較したところ、全血サンプルの方が少し低いagaritine定量値を示すものの、ほぼ同じ値が得られた。このことから、血漿中agaritine濃度が全血中agaritineと考えられた。

また、尿中agaritine濃度は12時間尿で0.146 µg/ml urineで24時間尿で0.018 µg/ml urineであり、それ以降の尿には検出されなかったことから、agaritineは投与後24時間以内に体外に排出されると考えられる。

agaritine代謝物はこれまで報告されていない。今回agaritine投与マウスにおいて、血漿中、尿中に同じと考えられる代謝物を見出した。構造については今後明らかにしたいと考えている。

ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験では、agaritineの明らかな減少が見られず、この系での反応が行かない可能性が示唆された。これまで報告されているように、γ-glutamyltransferase (γ-GT)によるグルタミン酸の遊離反応が起きることが条件である可能性が考えられた。

さらに、agaritine投与マウスの尿中8-OHdGの上昇が見られ、DNA損傷が起きていることが示唆された。尿中MDAはコントロール群と投与群で差がなかったことから、フリーラジカル反応の