

連鎖による脂質過酸化は起きていないものと考えられた。放射ラベル化した agaritine 投与マウスは、投与後その放射活性が肝臓、腎臓の組織 DNA 画分に蓄積することが報告されてる。このことから、agaritine は投与後、組織 DNA に結合し、その場でフリーラジカルを生成させ、結果生成した OH ラジカルと 8-dG との反応により 8-OHdG を生成するものと考えられた。

KB 細胞を用いた細胞毒性試験の結果、アガリクスキノコ中には弱から中程度の細胞傷害性を示す ergosterol が確認された。中程度の細胞傷害性を示した ergosterol 類も含有率が低いため摂取による毒性発現はないものと考えられた。

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

agaritine 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。また、尿中でも agaritine は 24 時間以内に消失した。agaritine 以外に強い生物活性を持つ成分は見つからなかった。

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

Agaritine を含むヒドラジン誘導体類は塩基性化合物であるため、今回塩基性化合物の分離に適するとされる XBridge™ shield RP18 column を採用した。また、HPLC の溶離液の pH をアルカリ側にすることによって、ヒドラジン化合物の分別定量が可能となった。

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。しかし、これらのピークは対象とするヒドラジン誘導体の蛍光ラベル化体のピークとは分離された。この試薬の分解によるピークと CPH-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 Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と MeOH によるグラジエント溶出が分離に最適であり、分析時間 30 min での分析条件が確立された。

HMPH-DMEQ-CO は AGARITINE-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出され、さらに 1-acetyl-2-phenylhydrazine の蛍光ラベル化体は、PH-DMEQ-CO と同じ保持時間に検出されたことから、蛍光ラベル化反応は、まずアミド結合が切断され、次に、ヒドラジノ基と DMEQ-COCl とが反応し、蛍光ラベル化体を生成するという順で起こることが示唆された。

DMEQ-COCl は、アミノ基との反応性が、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、ヒドラジン誘導体中のヒドラジノ基とアミド結合を形成させて蛍光ラベル化を行った。なお、ヒドラジノ基だけではなく、食品中に含まれるアミノ基を有する化合物を蛍光ラベル化することが考

えられた。このため、pyridoxamine、allantoin、guanine、aniline、arginine、histidine、glutamic acid、poly arginine につき、蛍光ラベル化反応を行い、HPLC に負荷したところ、クロマトグラム上にこれらの蛍光ラベル化体は検出されなかった。食品中でアミノ基を有しかつ高濃度で存在しうるアミノ酸は、そのカルボキシル基の存在のため、保持時間はヒドラジン誘導体とは大きく異なることが予想され、このためヒドラジン誘導体の分析には影響を与えないと考えられた。さらに、ヒドラジノ基と DMEQ-COCl の反応の場合、通常使用される WSC やピリジンを必要としなかった。以上のことから、本研究で確立した分析法は、ヒドラジノ基を有する化合物を特異的に検出できる方法であると考えられた。

食品から agaritine を抽出する際に MeOH を使用することから、蛍光ラベル化反応を行う際の MeOH 濃度の影響についても検討した。その結果、MeOH 濃度が反応溶液の 20% 以下では蛍光ラベル化反応の収率はほとんど違いは見られないが、20% 以上になると、蛍光ラベル化反応の収率は、MeOH 濃度の上昇とともに減少することがわかった。したがって、蛍光ラベル化反応の際には、MeOH 濃度を 10% 以下にして行うこととした。

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となった。

CPH、agaritine、PH、MPH の検出下限は、それぞれ 64.2 pg (422 fmol)、12.1 pg (45.3 fmol)、1.79 pg (16.5 fmol)、16.9 pg (138 fmol) であった。また、添加回収試験結果も良好であった。なお、蛍光ラベル化法の場合には、食品分析に応用する際、LC-MS 法では必要であった前処理カラム操作の省略が可能となり、簡便かつ迅速に分析が行えるようになった。食品試料に応用する場合、agaritine の検出下限は 3.6 µg/g dry weight であった。*Agaricus bisporus* すなわち西洋マッシュルーム中の agaritine は 1,836 µg/g であり、シイタケ中の agaritine は trace であった。これまで、文献値では 165–475 mg/kg (湿重量) や約 200 mg/kg (湿重量) との報告がなされている。キノコ湿重量は乾燥させた場合、約 10 分の 1 の重量になることから乾燥重量に換算すると、今回得た値は文献での値の範囲であることが示された。なお、今回得た値は LC-MS で得られた値 (他の分担研究者の報告) とほぼ同等であった。以上のことから、プレカラムなどの試料前処理を必要としない蛍光ラベル化法は、キノコ中の agaritine 量を簡

便に分析するための有用な手段であることが示された。

product A 中の agaritine 量は 1,791 µg/g dry であった。この製品は 1 日あたり 5 g の摂取を推奨していることから、agaritine 摂取は 1 日あたり、8,955 µg と算出される。

担子菌類中の必須・有害金属の分析

昨年度に Cd 濃度が高いアガリクス健康食品がみられたことから、これらの製品および他製品につき、今年度も Cd 濃度のフォローアップを行った。その結果、製品 B については Cd 値が低くなっていることから、何らかの対応がなされていると考えられた。昨年度報告された通り、社内規格を設け、Cd 濃度が高い製品は市場に流通させない方針が遵守されていると考えられた。一方、製品 C では、4～5月の時点では従来の Cd 濃度のまま市場に流通していた。この製品については、販売を終了すると報告されており、平成 18 年 3 月の時点では、報告通り購入できなかった。このように、両製品については、昨年度の報告書通りの対応がなされていることが示された。

Cd による毒性は、特に長期摂取による腎障害が問題になるとされている。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 とされており、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 一日摂取となる。一方、わが国における汚染物一日摂取量調査によると、日本人の 1 日あたりの Cd 摂取量は平成 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) であり、PTWI の 50%以上を摂取している。

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、各人の日常食からの Cd 摂取とあわせても、PTWI を下回る必要があると考えられ、そのための方策がとられることが望まれる。

キノコ類では、アガリクス茸の Cd 濃度は、2.6～7.5 mg/kg (乾燥質量) であった。またパルチーニ茸では 0.7、2 mg/kg (乾燥質量) であった。パルチーニ茸 B は露地栽培のキノコであると記載されていたことから、土壌中の Cd を取り込んだものと考えた。なお、一昨年度の文献調査の結果、キノコ中の Cd は 0.4～101 mg/kg (乾燥質量) と報告されており、土壌中の金属を取り込みやすいというキノコの性質を反映したのと考えられる。

昨年度の厚生労働科学特別研究「スギヒラタケ中の有害成分の分析に関する研究」においては、スギヒラタケ中の総 Hg 濃度は 0.073 mg/kg (湿重量) と比較的高かった。キノコでは、パルチーニ

茸でHg濃度が高いことが知られている。このことから、今年度はアガリクス茸およびポルチーニ茸の総HgおよびメチルHg濃度を検討した。その結果、ポルチーニ茸A、Bの総水銀は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ことから、キノコを介したメチルHg摂取は問題とはならないと考えられた。

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。アガリクス茸やアガリクス健康食品の金属について状態分析を行った結果、Cdは11.1 minにピークトップがみられたものの、8-13 minに広がる大きなピークとして観察された。UV吸収においてもまた8-13 minに大きなピークが認められた。このCdのピーク強度はアガリクス茸Cの場合に最も大きく、アガリクス健康食品BとCではCdのピーク高はその半分以下であった。Cdはおそらくたんぱく質と結合していると推定された。Cuではピークが3本みられ、このうち2本はZnでみられた2本のピークと保持時間が一致した。なお、CuとZnのそれぞれのピーク強度と測定同位体の天然存在比を考慮すると、CuとZnは1つのピークにおいて1:1の比で存在していることが示された。

E. 結論

agaritine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。また、尿中でもagaritineは24時間以内に消失した。agaritine以外に強い生物活性を持つ成分は見つからなかった。agaritineを含むヒドラジン類の一斉分析法として、DMEQ-COClを用いた蛍光ラベル化法による迅速・選択的・高感度な分析方法を確立した。なお、この方法は特に試料前処理を必要としない方法である。CPH、agaritine、PH、MPHの検出下限はそれぞれ64.2 pg (422 fmol)、12.1 pg (45.3 fmol)、1.79 pg (16.5 fmol)、16.9 pg (138 fmol)であった。また、添加回収試験結果も良好であった。キノコやアガリクス健康食品中のヒドラジン類の分析に応用した結果、agaritineは8.3-1836 µg/g dry weightで検出された。一方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。昨年度Cdの値が高かった2製品を含めたアガリクス健康食品について、Cd濃度のフォローアップを行った結果、2製品とも販売者において昨年度報告書通りの対応がとられていると考えられた。

アガリクス茸3検体中のCdの値は、3-8 ppmであった。なお、アガリクス茸における総Hg、メチルHg濃度は、ともに低い値であった。

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、Cdが高値であった検体につき、

各金属の状態分析を行ったところ、Cd は高分子化合物に結合していた。

F. 健康危険情報

現在、厚生労働省は、特定のアガリクス健康食品につき、内閣府食品安全委員会に食品健康影響評価を依頼中である。昨年度に Cd 濃度が高かった 2 製品については、今年度フォローアップした結果、それぞれ昨年度報告書通りの対応がなされていると考えられた。なお、(独)健康・栄養研究所の HP にある「健康食品」の安全性・有効性情報においては、アガリクスに関する情報として、一部に Cd 含有量の高い製品が見られたが、自主的な基準等を持って対応がはかられていると、参考文献として昨年度の本報告書を引用しながら記載されている。

G. 研究発表

論文発表

1. Determination of cyanide and thiocyanate in *Su-gihiratake* mushroom using HPLC method with fluorometric detection. Hiroshi Akiyama, Toshiko Toida, Shinobu Sakai, Yoshiaki Amakura, Kazunari Kondo, Yoshiko Sugita-Konishi, Tamio Maitani, *J. Health Science*, 52, 73-77 (2006).
2. Analysis of agaritine in mushrooms and in agaritine-administered mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hi-

roshi Akiyama and Tamio Maitani, *J. Chromatography B*, 834, 55-61 (2006).

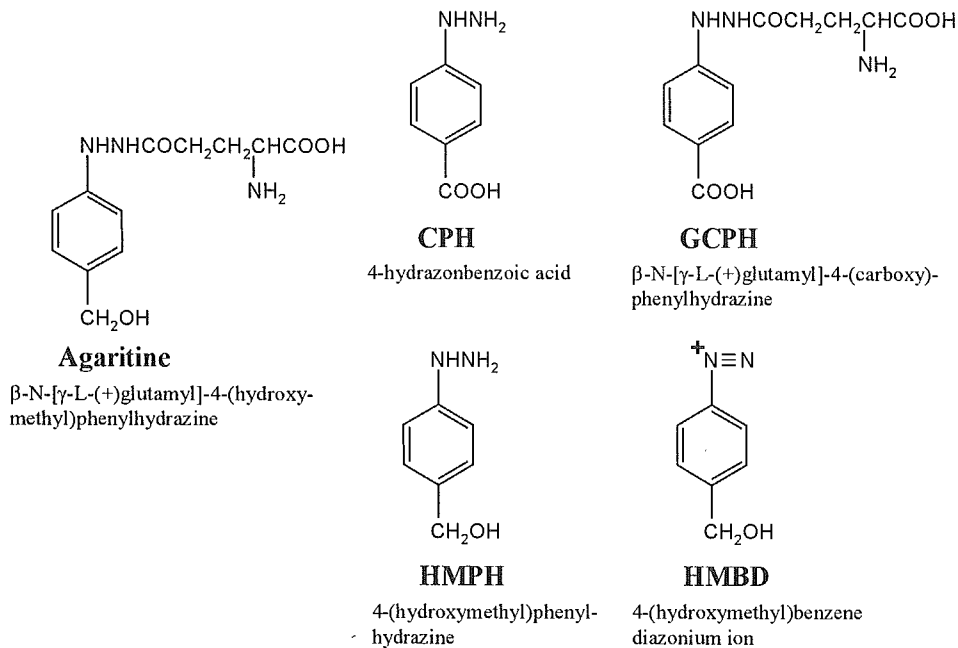
3. Determination of genotoxic phenylhydrazine agaritine in several mushrooms using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani *Food Additives and Contaminants*. *Accepted*
4. M.H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani: Measurement of a genotoxic hydrazine, agaritine, and its derivatives by HPLC with fluorescence derivatization in the *Agaricus* mushroom and its products. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* in press.

学会発表

1. 第 126 回日本薬学会「スギヒラタケ中のシアニンイオン及びチオシアン酸イオンの定量」 穂山浩、戸井田敏彦、酒井信夫、天倉吉章、近藤一成、小西良子、米谷民雄 (2006. 3)
2. A rapid and highly specific analysis of labile and genotoxic agaritine in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani. 51st International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy in Quebec,

- Canada (2005, 10)
3. Determination of Genotoxic Phenylhydrazine Agaritine in Several Mushrooms using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani 2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis in Prague, Czech Republic (2005, 11)
 4. 血漿および尿中 agaritine の LC/MS/MS 分析, 近藤一成, 渡辺麻子, 長岡 (浜野) 恵, 穠山 浩, 米谷民雄 日本薬学会第 126 年会 (仙台) (2006, 3)
 5. アガリクス健康食品及びキノコ中の有害・必須金属の分析, 長岡 (浜野) 恵, 近藤一成, 穠山 浩, 松田りえ子, 米谷民雄: 第 42 回全国衛生化学技術協議会年会 (東京) (2005.11 月) (講演要旨集 p 152-153)
 6. Speciation of cadmium by HPLC/DF-ICP-MS and determination of hydrazines by HPLC with fluorescence derivatization in Agaricus mushroom and its products, M.H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani: Ninth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers, (York, UK) (abstract, p131).
 7. 長岡 (浜野) 恵, 近藤一成, 穠山 浩, 松田りえ子, 米谷民雄: アガリクス健康食品及びキノコ中の有害・必須金属の分析, 第 42 回全国衛生化学技術協議会年会 (東京) (2005.11 月) (講演要旨集 p 152-153)
 8. M.H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani: Speciation of cadmium by HPLC/DF-ICP-MS and determination of hydrazines by HPLC with fluorescence derivatization in Agaricus mushroom and its products, Ninth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers, (York, UK) (abstract, p131).
- H. 知的財産権の登録
なし

資料1 アガリチンとその代謝物の構造式



資料2 アガリクス茸を含む食品のアガリチン含有量

検体	製品	実測値(μg/g dry)
製品A	1 乾燥品, 顆粒	1348
	2 乾燥品, 粉末	1437
	3 乾燥品, キノコ形	2017
	4 菌糸体培養物, 顆粒	N.D.
	5 健康食品(栄養補助成分添加)	0.13
製品B	6 健康食品(栄養補助成分添加)	408
	7 健康食品(栄養補助成分添加)	1.13
	8 健康食品(栄養補助成分添加)	1.28
	9 健康食品(栄養補助成分添加)	0.20
製品C	10 菌糸体培養物, 顆粒	N.D.

(平成15年度厚生労働科学研究の「担子菌類中の有害物質の評価に関する研究」報告書) 及び平成17年度研究成果より

資料 3 マッシュルーム中のアガリチン含有量(文献報告)

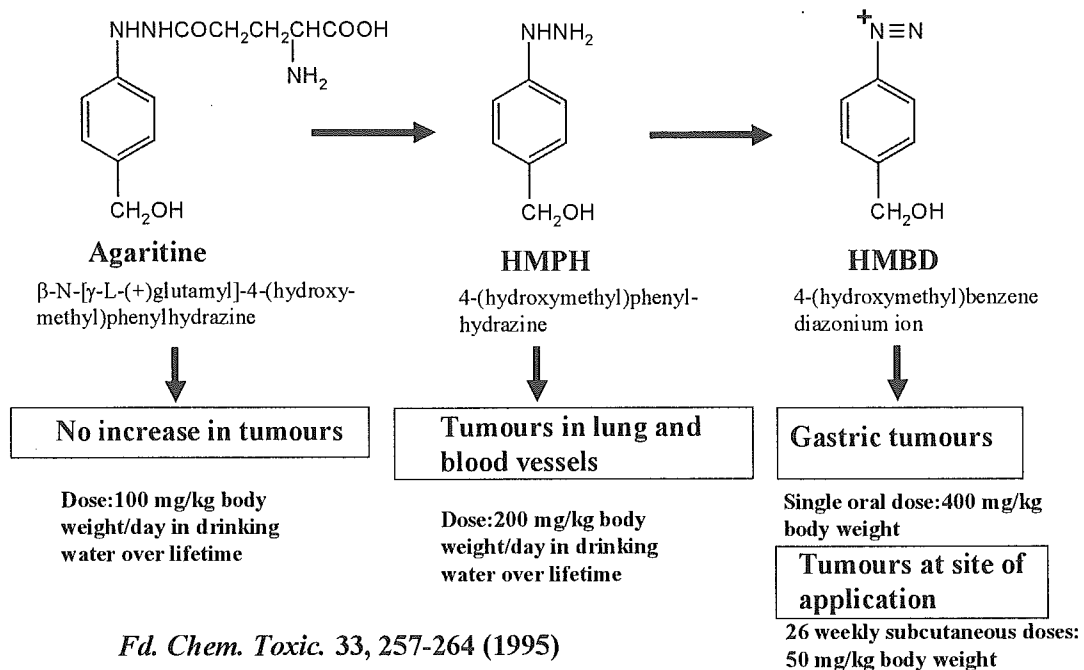
Type of product	Agaritine content (mg/kg fresh weight)	Reference
Frozen mushrooms	330	Ross et al., 1982b
Mushrooms sautéed in olive oil at 300°C(7 min.)	300	Ross et al., 1982b
Sliced mushrooms and mushroom powder used as ingredients for dehydrated soups	100-250*	Stijve et al., 1986
Pasta sauce (n=4)	1.6-15.3	Andersson et al., 1999
Mushroom soup	0	Ross et al., 1982b
Mushroom soup	<5	Sharman et al., 1990
Mushroom soup (n=3)	1.8-62.8	Andersson et al., 1999
Mushroom sauce	3.9	Andersson et al., 1999

* recalculated, assuming 90% water in mushroom Sharman and co-workers (1990)

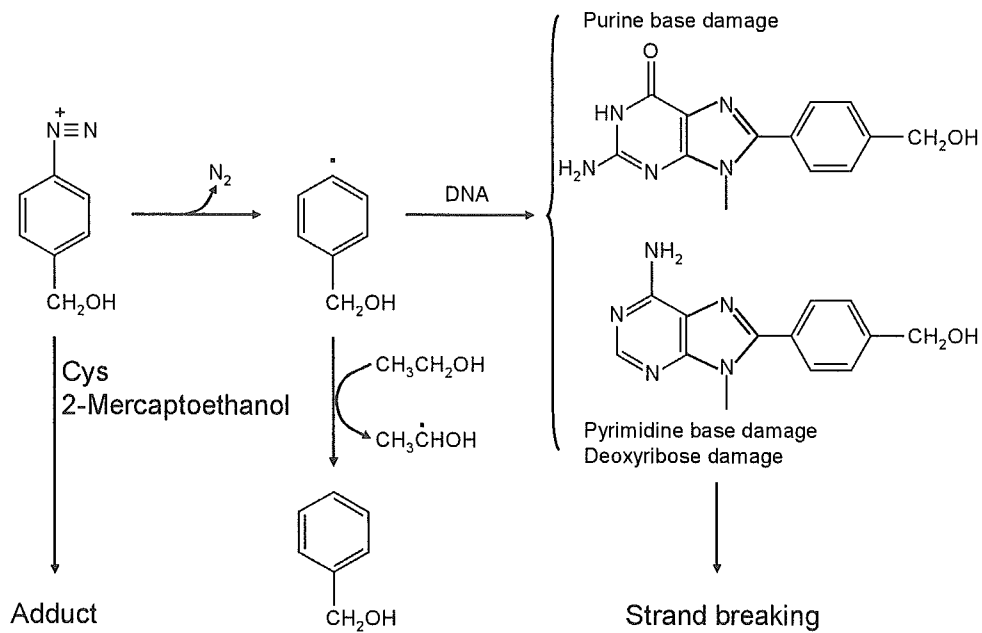
Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

資料 4 推定されているアガリチンの生物活性化経路

Postulated bioactivation pathway



資料5 HMBD のDNA損傷メカニズム



Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

資料6 *Agaricus bisporus*の抽出物のAmes試験

Table 13. Mutagenicity of extracts of *Agaricus bisporus* in various strains of *Salmonella typhimurium* in the absence or presence of a metabolising system (S9) obtained from the liver of aroclor 1254-treated rats (if not otherwise stated).

Solvent for extract	Strain TA97 -S9 +S9	Strain TA98 -S9 -S9	Strain TA100 -S9 +S9	Strain TA102 -S9 +S9	Strain TA104 -S9 +S9	Strain TA1535 -S9 +S9	Strain TA1537 -S9 +S9	Strain TA1538 -S9 +S9	Strain TA2637 -S9 +S9	Strain TA1530 -S9 +S9	Strain TM677 -S9 +S9	Reference	
water (a)			(+)	(+)						(+)		Sternier et al., 1982	
water (a, b, c)		-	(+)	(+)			(+)	-	-	-		von Wright et al., 1982	
water (a, d)		(+)	(+)	-	(+)							Morales et al., 1990a	
water (a, e)		-	-	-	-							Morales et al., 1990b	
water (f)							+	+		Toth et al., 1992	
water (f, g)							+	+		Toth et al., 1992	
water	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)						Andersson et al., 1998	
water (a, h)		-	-									Kellman and Berstein, 1978	
ethanol (a)		-	(+)										
acetone (a)		-	-										
ether (b)		-	-										
DMSO (a, h)		-	+		(+)			+		+			
methanol (a)		-	-									De Flora et al., 1979	
ethanol	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)				(+)	(+)		Pool-Zobel et al., 1990	
ethanol (a)	(-)	(+)	-	(+)	(+)	+	(-)	+	+	-	(+)	(+)	Papaparaskeva et al., 1991
ethanol (a, i)		(+)	(+)				(-)	(+)					
ethanol (a, j, k)							+	+					
ethanol (a)	(-)	(+)	(+)		(-)	+	(+)	-	-				Papaparaskeva-Petrides et al., 1993
ethanol (a, f)		-	-	-	-								Uejima et al., 1986
ethanol (l)												(+)	Grütter et al., 1991
ethanol (m)						+	+					(+)	Walton et al., 1997
ethanol (a, g, m)						+	+					(+)	Walton et al., 1998
ethanol (a, n, m)						+	+						

(-) no mutagenic activity; (+) borderline mutagenic activity - less than doubling in mutation frequency but statistically significant; (-) mutagenic activity; (a) no control for histidine; (b) mushrooms stored frozen at -20°C before analysis; (c) metabolising system from phenobarbital-induced mouse liver; (d) metabolising system from phenobarbital-induced rat liver; (e) extract from canned mushrooms; (f) preincubation assay instead of plate incorporation assay; (g) extract from dry-based mushrooms; (h) boiled; (i) metabolising system from mouse liver; (j) mushrooms with various agaritic contents; (k) metabolising system from aroclor-induced mouse liver; (l) mushrooms purchased to a market and were put in plastic bags, sealed under vacuum and frozen - subsequently extract was prepared from freeze-dried material; (m) metabolising system from homogenised rat kidney; (n) extract from freeze-dried mushrooms

Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

資料7 Agaritineとその誘導体のAmes試験

Table 15. Comparative mutagenicity of the hydrazine derivatives occurring in *Agaricus bisporus* in various strains of *Salmonella typhimurium* in the absence or presence of a metabolising system (S9) obtained from the liver of aroclor 1254-treated rats. Tested hydrazine derivatives were β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine (agaritine), 4-(carboxy)phenylhydrazine (CPH), 4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMPH), N'-acetyl-4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (AHMPH) and 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium ion (HMBD).

Compound tested	Strain TA97	Strain TA98	Strain TA100	Strain TA102	Strain TA104	Strain TA1535	Strain TA1537	Strain TA1538	Strain TA2637	Type of assay	Reference
	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9			
Agaritine (a)		-	(+)							spottest	De Flora et al., 1979
Agaritine (a)						(-)	(+)	(+)		preincubation	Rogan et al., 1982
Agaritine (a)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	plate incorporation	Papaparaskeva-Pevides et al., 1993
Agaritine (b)		-	-	-					(*)	plate incorporation	Siemer et al., 1982
Agaritine (c)		(+)	(+)	(+)	(-)					preincubation	Uejima et al., 1986
Agaritine (d)	+	-	-	-			(+)	-		preincubation	Friederich et al., 1986
Agaritine (i)					(+)					plate incorporation	Walton et al., 1997b
Agaritine (d) - γ -GT	+	(+)	-	+		-	+	+		preincubation	Friederich et al., 1986
CPH									-	preincubation	Malca-Mor and Stark, 1982
CPH	+	-	-	-			-	-		preincubation	Friederich et al., 1986
CPH	+	+	(+)	(+)	(-)					plate incorporation	Anderessen et al., 1998
CPH					(+)					plate incorporation	Walton et al., 1997b
HMPH (e)		-	(+)				+	(+)		preincubation	Friederich et al., 1986
AHMPH (f)						-	-	+	-	preincubation	Rogan et al., 1982
AHMPH (j)					(+)					plate incorporation	Walton et al., 1997b
HMBD (g)						(+)*	+			preincubation	Rogan et al., 1982
HMBD (h)	-	+	-	+		-	+	+		preincubation	Friederich et al., 1986
HMBD				+						plate incorporation	Lawson et al., 1995
HMBD (i)					+					plate incorporation	Walton et al., 1997b

* = no mutagenic activity; (+) = borderline mutagenic activity - less than doubling in mutation frequency but statistically significant; + = mutagenic activity (a) agaritine synthesised by Toth and colleagues (>98 % pure); (b) agaritine purified from mushrooms; (c) origin of agaritine unknown; (d) isolated from *A. bisporus*, 76.5 % pure; (e) gift from Hoechst; (f) AHMPH synthesised by Toth and colleagues (>98 % pure); (g) HMBD synthesised by Toth and colleagues (>98 % pure); (h) synthesised; (i) agaritine synthesised by Walton and colleagues (91 % pure); (j) AHMPH synthesised by Walton and colleagues (97 % pure); * pronounced cytotoxicity

Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

資料8-1. *Agaricus bisporus*の慢性毒性試験

Compound tested	Route of administration	Dose	Exposure	Effect of treatment				Reference	
				treated animals			control animals		
				males (50/group)	females (50/group)		males (100/group)		females (100/group)
<i>Agaricus bisporus</i> uncooked	p.o.	3 days per week	lifelong	31 (62%)**	20 (40%)	lung	17 (38%)	13 (26%)	Toth and Erickson, 1986
				18	9	adenomas	8	6	
				13	11	adenocarcinomas	9	7	
				6 (12%)	4 (8%)	liver	1 (2%)	0 (0%)	
				6	4	benign hepatomas	1	0	
				14 (28%)**	19 (38%)***	forestomach	2 (4%)	0 (0%)	
				11	16	squamous cell papillomas	2	0	
				3	3	squamous cell carcinomas	0	0	
				8 (16%)**	8 (16%)**	bone	0 (0%)	0 (0%)	
5	6	osteomas	0	0					
3	2	osteosarcomas	0	0					
<i>Agaricus bisporus</i> dry-baked	p.o.	3 days per week	lifelong	8 (16%)***	10 (20%)**	forestomach	0 (0%)	0 (0%)	Toth et al., 1997a
				7	9	squamous cell papillomas	0	0	
				1	0	leiomyocarcinomas	0	0	
				0	1	squamous cell carcinomas	0	0	
				10 (20%)***	6 (12%)*	glandular stomach	0 (0%)	0 (0%)	
				0	1	polypoid adenomas	0	0	
				10	5	adenocarcinomas	0	0	
				2 (4%)	7 (14%)*	duodenum	0 (0%)	0 (0%)	
				2	7	adenocarcinomas	0	0	
	6 (12%)*	ovaries		1 (2%)					
	5	adenomas		0					
	1	adenocarcinomas		1					

Table 17A. Tumorigenicity of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in randomly bred Swiss albino mice.

資料9-1. Agaritineの慢性毒性試験(経口投与)

Compound tested	Route of administration	Dose	Exposure	Effect of treatment					Reference
				treated animals			control animals		
				males	females		males	females	
				(50/group)	(50/group)		(100/group)	(100/group)	
Agaritine	p.o.	0.0625 %	lifelong	6 (12%)	13 (26%)	lung	19 (19%)	29 (29%)	Toth et al., 1981a
				4	9	adenomas	10	15	
				2	4	adenocarcinomas	9	14	
				2 (4%)	2 (4%)	blood vessels	5 (5%)	7 (7%)	
				20	0	angiomas	2	4	
				2	2	angiosarcomas	3	2	
				1 (2%)	6 (12%)	Malignant lymphomas	10 (10%)	15 (15%)	
	p.o.	0.03125 % (males only)	lifelong	8 (16%)		lung	19 (19%)		
				7		adenomas	10		
				1		adenocarcinomas	9		
				5 (10%)		blood vessels	5 (5%)		
				2		angiomas	2		
				3		angiosarcomas	3		
				1 (2%)		Malignant lymphomas	10 (10%)		

Table 17B. Tumourigenicity of the phenylhydrazines and related compounds occurring in the mushroom in randomly bred Swiss albino mice.

資料9-2. Agaritineの毒性試験(S.C.)と誘導体の毒性試験

Compound tested	Route of administration	Dose	Exposure	Effect of treatment					Reference
				treated animals			control animals		
				males	females		males	females	
				(50/group)	(50/group)		(100/group)	(100/group)	
Agaritine	s.c.	100 mg/kg	5 weekly	12 (24%)	13 (26%)	lung	19 (19%)	29 (29%)	Toth and Somson, 1984
				7	8	adenomas	10	15	
				5	5	adenocarcinomas	9	14	
				3 (6%)	9 (18%)	blood vessels	5 (5%)	7 (7%)	
				1	7	angiomas	2	4	
				2	2	angiosarcomas	3	2	
				3(6%)	10 (29%)	Malignant lymphomas	10 (10%)	15 (15%)	
	s.c.	100 mg/kg to females, 50 mg/kg to males	single	9 (18%)	12 (24%)	lung	19 (19%)	29 (29%)	
				4	9	adenomas	10	15	
				5	3	adenocarcinomas	9	14	
				1 (2%)	5 (10%)	blood vessels	5 (5%)	7 (7%)	
				1	3	angiomas	2	4	
				0	2	angiosarcomas	3	2	
				3 (6%)	14 (28%)	Malignant lymphomas	10 (10%)	15 (15%)	
N'-acetyl-4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine [N'-acetyl HMPH]	p.o.	0.0625 %	lifelong	24 (48%)***	17 (34%)**	lung	22 (22%)	15 (15%)	Toth et al., 1978
				16	10	adenomas	?	?	
				8	7	adenocarcinomas	?	?	
				15 (39%)***	16 (32%)***	blood vessels	5 (5%)	8 (8%)	
	s.c.	500 mg/kg	26 weekly	7	9	angiomas	?	?	
				8	7	angiosarcomas	?	?	
				2 (4%)	0 (0%)	soft tissue tumours	2 (4%)	0 (0%)	
				1	0	fibrosarcomas	2	0	
			1	0	angiosarcomas	0	0	Toth and Nagel, 1981	

Table 17B cont. Tumourigenicity of the phenylhydrazines and related compounds occurring in the mushroom in randomly bred Swiss albino mice.

資料9-3. Agaritine誘導体の慢性毒性試験

Compound tested	Route of administration	Dose	Exposure	Effect of treatment				Reference	
				treated animals			control animals		
				males	females		males		females
				(50/group)	(50/group)		(100/group)		(100/group)
4-(hydroxymethyl)benzediazoni-um tetra-fluoroborate [HMBD]	p.o.	400 mg/kg	single	16 (32%)*	15 (30%)*	glandular stomach	0 (0%)	0 (0%)	Toth et al., 1982
				9	3	polypoid adenomas	0	0	
				7	12	adenocarcinomas	0	0	
	s.c.	50 mg/kg	26 weekly	9 (18%)*	11 (22%)*	subcutaneous tissue	3 (6%)	3 (6%)	Toth, 1987
				0	0	fibroma	1	0	
				5	10	fibrosarcomas	2	3	
				2	0	rhabdomyosarcomas	0	0	
				2	1	angiosarcomas	0	0	
				3 (6%)	9 (18%)*	skin	0 (0%)	0 (0%)	
				2	4	squamous cell papillomas	0	0	
1	5	squamous cell carcinomas	0	0					
4-(hydroxymethyl)benzediazoni-um sulfate [HMBS]	s.c.	50 mg/kg	26 weekly	20 (40%)*	16 (32%)*	subcutaneous tissue	2 (4%)	0 (0%)	Toth, 1987
				19	13	fibrosarcomas	2	0	
				0	2	rhabdomyosarcomas	0	0	
				1	1	angiosarcomas	0	0	
				2 (4%)	7 (14%)*	skin	0 (0%)	1 (2%)	
				0	2	squamous cell papillomas	0	1	
				2	5	squamous cell carcinomas	0	0	

Table 17B cont. Tumorigenicity of the phenylhydrazines and related compounds occurring in the mushroom in randomly bred Swiss albino mice.

資料9-4. Agaritine誘導体の慢性毒性試験

Compound tested	Route of administration	Dose	Exposure	Effect of treatment				Reference	
				treated animals			control animals		
				males	females		males		females
				(50/group)	(50/group)		(100/group)		(100/group)
4-(carboxy)-phenyl-hydrazine [CPH]	p.o.	0.125 %	lifelong	21 (42%)*	7 (14%)*	aorta and large arteries	2 (4%)	0 (0%)	McManus et al., 1987
				6	3	leiomyoma	0	0	
				15	4	leiomyosarcomas	2	0	
N ² -[γ-L(+)-glutamyl]-4-(carboxy)-phenyl-hydrazine [GCPH]	p.o.	1.4 g/kg	52 weekly	13 (26%)*	1 (2%)	subcutaneous tissue	0 (0%)	3 (6%)	Toth, 1986a
				0	0	fibroma	0	1	
				13	0	fibrosarcomas	0	2	
				0	1	myxosarcomas	0	0	

Table 17B cont. Tumorigenicity of the phenylhydrazines and related compounds occurring in the mushroom in randomly bred Swiss albino mice.

資料10. Swiss mice等の毒性実験のまとめ

Parameter	Material or compound tested in the cancer study (reference)					
	Fresh raw mushroom (Toth and Ericson, 1986)	Dry-baked mushroom (Toth et al., 1997a)	Freeze-dried mushroom (Toth et al., 1998)	CPH (McManus et al., 1987)	GCPH (Toth, 1986a)	HMBD (Toth et al., 1982)
Daily exposure per mouse	4.7 g	5.57 g	1.25 g*	1250 mg/l drinking water for life	1400 mg/kg body weight /l day weekly for 52 weeks	Single dose 400 mg/kg body weight
Fraction of tumour-bearing animals with the highest increase of a specific tumour (type of tumour)	38% (forestomach in males)	20% (forestomach in females, glandular stomach in males)	22% (lung in males)	38% (aorta and large arteries in males)	26% (subcutaneous tissue in males)	32% (glandular stomach in males)

Table 18. Fraction of treated animals with the most pronounced increase of a specific tumour.

Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

資料11. マッシュルーム及び関連毒性物質のリスク評価

Parameter	Material or compound tested in the cancer study (reference)					
	Fresh raw mushroom (Toth and Ericson, 1986)	Dry-baked mushroom (Toth et al., 1997a)	Freeze-dried mushroom (Toth et al., 1998)	CPH (McManus et al., 1987)	GCPH (Toth, 1986a)	HMBD (Toth et al., 1982)
Daily exposure per mouse	4.7 g	5.57 g (males)	1.25 g*	1250 mg/l drinking water for life	1400 mg/kg body weight /l day weekly for 52 weeks	Single dose 400 mg/kg body weight
Daily exposure per kg body weight (mouse)	189 g	229 g	50 g	204 g	149 g	0.82 mg
Daily human intake of mushroom per kg body weight	0.1 g (0.025 g)	0.1 g (0.025 g)	0.1 g (0.025 g)	0.1 g (0.025 g) (containing 10-11 mg CPH/kg)	0.1 g (0.025 g) (containing 16-42 mg GCPH/kg)	0.1 g (0.025 g) (containing 0.6-4 mg HMBD/kg)
Human cancer risk due to lifelong exposure	193 x 10 ⁻⁶ (52x10 ⁻⁶)	86 x 10 ⁻⁶ (23x10 ⁻⁶)	211 x 10 ⁻⁶ (56x10 ⁻⁶)	1.8-2.0 x 10 ⁻⁶ (0.5x10 ⁻⁶)	2.7-7.0 x 10 ⁻⁶ (0.7-1.9x10 ⁻⁶)	23-150 x 10 ⁻⁶ (6-40x10 ⁻⁶)

* 1.25 g freeze-dried mushroom approximately corresponds to 12.5 g raw mushroom

Table 19. Estimated life-time human cancer risk from the intake of *Agaricus bisporus* in the Nordic countries (average of intakes in Denmark, Iceland, Norway and Sweden). (Finnish figures within brackets.)

Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

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

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：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。クリーンア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、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、簡易に測定可能であ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。

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* 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 を紫外外部吸収検出 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及び HPLC 条件を検討した。また乾燥アガリクス茸キノコ摂取のリスク評価の検討も行った。

B. 研究方法

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 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 2ml 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* Murill「アガリクス茸」のリスク評価を検討した。

C. 研究結果

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。

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 (β -N-[γ -L-(+)Glutamyl]-4-hydroxy- methyl phenylhydrazine, Agaritine) ^{資料1} 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 bisporus*) 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 $\mu\text{g/g dry}$ 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^{資料2}。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 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*)、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 γ -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^{資料1}。アガリチンの前駆物質として4-Hydrazinobenzoic acid (CPH), β -N-[γ -L-(+)glutamyl]-4-(carboxy)-phenylhydrazine (GCPH)が考えられている^{資料1}。

- 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^{資料3}。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 µg/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。 γ -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^{資料4}。

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^{資料5}。

- 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^{資料6, 資料7}。なお、アガリチンの変異原性は、 γ -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^{資料 8-1,2,3}。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^{資料 8-1,2,3}。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中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^{資料 9-1}。

- ・ 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^{資料 9-2,3,4}。

- ・ 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