

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2654mg/kg/日 (雄)、2965mg/kg/日 (雌) であった。また、遺伝毒性試験は陰性であった。

#### 5. 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  $2.1-36 \mu\text{g/day/kg body weight}$  (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) を一生涯食べ続けると 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  $\mu\text{g/g}$  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  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  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  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  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)  $\times$  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  $6.75 \text{ mg} / 50 \text{ kg} =$  135  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  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、 $0.41 \text{ mg/g} \times 1.8-5.4 \text{ g} = 0.74- 2.21 \text{ mg}$  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  $0.74-2.21 \text{ mg} / 50 \text{ kg} =$  14.8-44.3  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  となる。

## D. 考察

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。

## 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。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Determination of cyanide and thiocyanate in Sugi-hiratake mushroom using HPLC method with fluorometric detection Hiroshi Akiyama\*, Toshihiko Toida, Shinobu Sakai, Yoshiaki Amakura, Kazunari Kondo, Yoshiko Sugita-Konishi, Tamio Maitani, *J. Health Science*, **52**, 73-77 (2006).

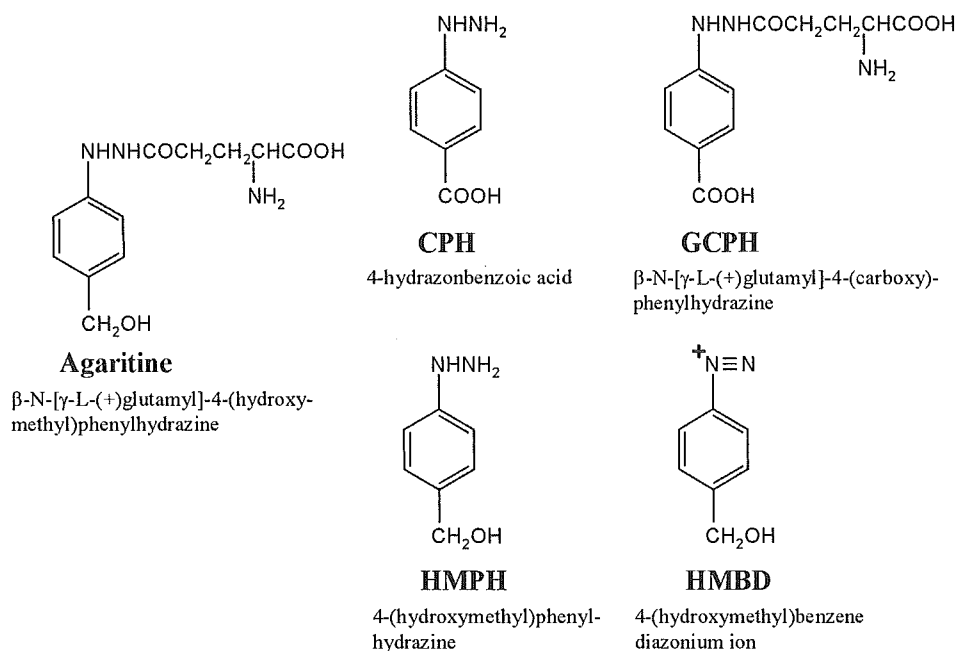
### 学会発表

1. 第 126 回日本薬学会「スギヒラタケ中のシアニオン及びチオシアン酸イオンの定量」 稲山浩、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)

## 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)
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
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
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)

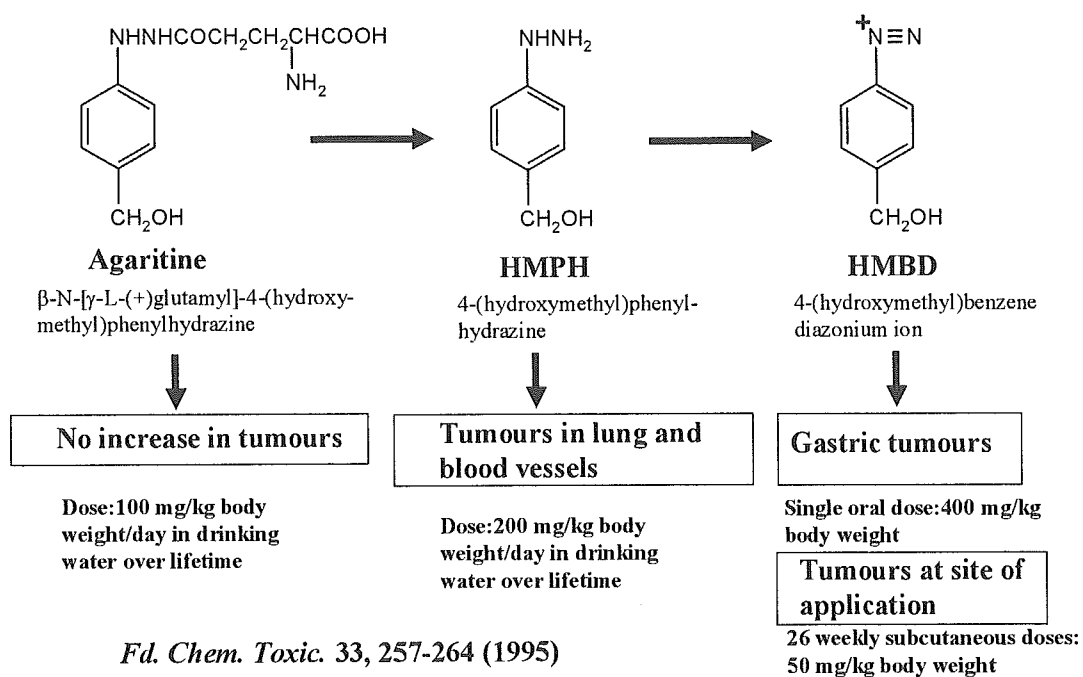
Type of product	Agaritine content (mg/kg fresh weight)	Reference
Frozen mushrooms	330	Ross et al., 1982b
Mushrooms sautéed in olive oil at 300°C(7 min.)	300	Ross et al., 1982b
Sliced mushrooms and mushroom powder used as ingredients for dehydrated soups	100-250*	Stijve et al., 1986
Pasta sauce (n=4)	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)

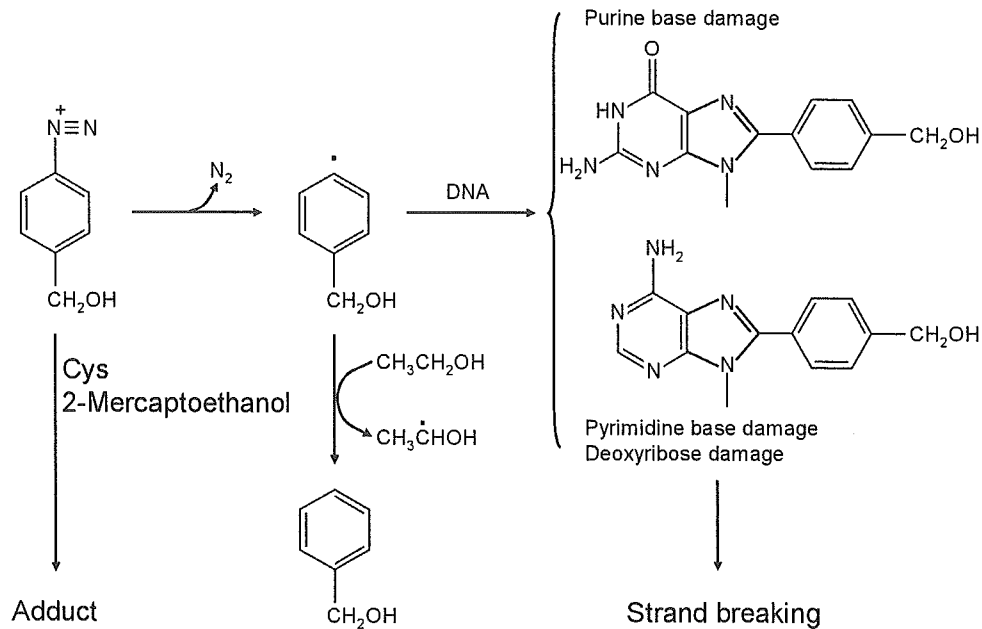
Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)  
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

### 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



Mechanism of 4-(hydroxymethyl)benzediazonium ion (HMBD)-induced DNA damage.

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)			(+)	(+)								Sienker 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)		-	(+)									Kellman and Berstein, 1978
acetone (a)		-	-									Kellman and Berstein, 1978
ether (b)		-	-									Kellman and Berstein, 1978
DMSO (a, h)		-	..	(+)				+	+			Kellman and Berstein, 1978
methanol (a)			-	-								De Flora et al., 1979
ethanol	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)			(+)	(+)			De Flora et al., 1979
ethanol (a)	(-)	(+)	-	(+)	(+)	+	(-)	+	+	-	(+)	Pool-Zobel et al., 1990
ethanol (a, i)		(+)	(+)			(-)	(+)					Papaparaskeva et al., 1991
ethanol (a, j, k)						+	+					Papaparaskeva et al., 1991
ethanol (a)	(-)	(+)	(+)	(-)		+	(+)					Papaparaskeva-Petrides et al., 1993
ethanol (a, f)		-	-	-								Uejima et al., 1986
ethanol (l)											(+)	Grüter et al., 1991
ethanol (m)						+	+					Walton et al., 1997
ethanol (a, g, m)						+	+				(+)	Walton et al., 1998
ethanol (a, n, m)						+	+					Walton et al., 1998

(-) = no mutagenic activity; (+) = border-line 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-aged mushrooms; (h) boiled; (i) metabolic system from mouse liver; (j) mushrooms with various agaroline contents; (k) metabolic system from anabolic-induced hamster liver; (l) mushrooms purchased as a market were put in plastic bags sealed under vacuum and frozen - subsequently extracts were prepared from freeze-dried material; (m) metabolising system from hamogenized 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  $\beta$ -N-( $\gamma$ -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	-S9 +S9		
Agaritine (a)		-	-	(+)	(-)					spottest	De Flora et al., 1979
Agaritine (a)						(-)	(+)	(+)	(+)	preincubation	Rogan et al., 1982
Agaritine (a)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	plate incorporation	Papaparaskeva-Petrides et al., 1993
Agaritine (b)		-	-	-	-				(+)	plate incorporation	Sizener et al., 1982
Agaritine (c)		(+)	(+)	(+)	(-)					preincubation	Leijna et al., 1986
Agaritine (d)	(+)	-	-	-	-		(+)	-		preincubation	Friederich et al., 1986
Agaritine (e)						(+)				plate incorporation	Walton et al., 1997b
Agaritine (d) - $\gamma$ -GT	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)	(+)		preincubation	Friederich et al., 1986
CPH								-	-	preincubation	Mula-Mor and Stark, 1982
CPH	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	preincubation	Friederich et al., 1986
CPH	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)					plate incorporation	Andersson 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 (g)						(+)				plate incorporation	Walton et al., 1997b
HMBD (g)						(+)*	(+)			preincubation	Rogan et al., 1982
HMBD (h)	(+)	(+)	-	(+)		-	(+)	(+)		preincubation	Friederich et al., 1986
HMBD				(+)						plate incorporation	Lavsson 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) synthesized; (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	leiomyocarcomas	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. Tumourigenicity 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 Sornson, 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%)	
				7	9	angiomas	?	?	
	8	7	angiosarcomas	?	?				
	s.c.	500 mg/kg	26 weekly	2 (4%)	0 (0%)	soft tissue tumours	2 (4%)	0 (0%)	Toth and Nagel, 1981
				1	0	fibrosarcomas	2	0	
1				0	angiosarcomas	0	0		

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)benzediazonium tetrafluoroborate [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)benzediazonium 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)phenylhydrazine [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 <sup>2</sup> -[γ-L-(+)-glutamy]-4-(carboxy)phenylhydrazine [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	$193 \times 10^{-6}$ ( $52 \times 10^{-6}$ )	$86 \times 10^{-6}$ ( $23 \times 10^{-6}$ )	$211 \times 10^{-6}$ ( $56 \times 10^{-6}$ )	$1.8-2.0 \times 10^{-6}$ ( $0.5 \times 10^{-6}$ )	$2.7-7.0 \times 10^{-6}$ ( $0.7-1.9 \times 10^{-6}$ )	$23-150 \times 10^{-6}$ ( $6-40 \times 10^{-6}$ )

\* 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

### 2. 生体試料中のヒドラジン誘導体の分析および代謝

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

生体試料中のヒドラジン誘導体の分析および代謝

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

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。

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* Murrill）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、昨年度において agaritine 投与マウスからの血清試料中 agaritine 濃度を測定したが、agaritine 濃度レベルが低く、血清分離過程での agaritine 分解が懸念され、血漿中での測定が必要と考えられた。そこで、今回、マウス眼底血から血漿を分離して採血から分離まで氷上で行った。さらに、agaritine とその代謝分解物は各組織中の DNA 画分に蓄積されることを示す報告があることから、血中分析において赤血球などに結合あるいは取り込まれて蓄積し、血漿中に回収されているかわからないかも検討した。

尿中 agaritine 濃度についても、agaritine 代謝を考える上で重要であるため、経時的に採取した尿を測定した。

agaritine の変異原性のメカニズムは明らかでないが、agaritine が生体内でどのように代謝されるか、代謝物は何か、活性本体は何かを解明する必要があることから、血漿、尿中より agaritine 代謝物検索を行った。マウスへの agaritine 投与による DNA 損傷について検討した。また、ヒト肝ミク

ロソーム系で agaritine が代謝されるか検討した。さらに、アガリクスキノコ中に細胞毒性成分が含まれているかを検索し、構造解析した。

## B. 研究方法

### 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  $^1$ 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（図 1）。食品成分中の agaritine 定量用に  $m/z$  122、確認用に  $m/z$  248 をを用いた。血漿中の agaritine 定量は  $m/z$  248 をを用いた。HPLC は Agilent 製 1100 series をを用いた。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 C<sub>18</sub> 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 をを用いた in vivo 試験はすべて放射活性ラベル agaritine をを用い、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 LC/MS/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 分を行った。

#### 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。

## C. 研究結果

### 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。その結果を図 2 に示した。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、図 3 に

示すように 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、図 4 に示すように 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、図 5 に示すように、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 (図 5)。

#### 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 (図6)。その結果、図7に示すような8種の化合物 (うち2種は新規化合物) を単離した。

単離した化合物の細胞毒性は表2に示すように、ergosterol 類縁体が弱から中程度の細胞毒性を示した。

#### D. 考察

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。

#### 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。

#### 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。



## F. 参考文献

1. Bela, T., Donald, N., Kashinath, P., James, E., Kenneth, A.: Tumor induction with the N<sup>1</sup>-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-hydrozylmethylbenzenediazonium 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., Patrícia, 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).

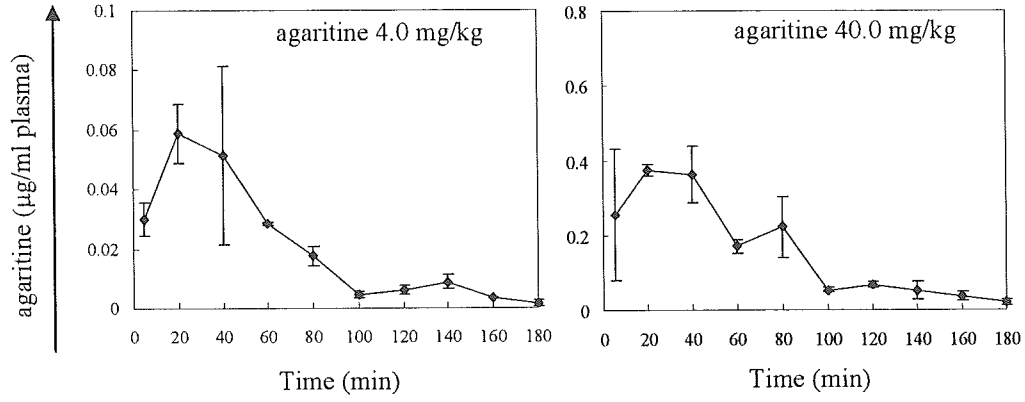


図1 マウス血中 agaritine 濃度の経時変化

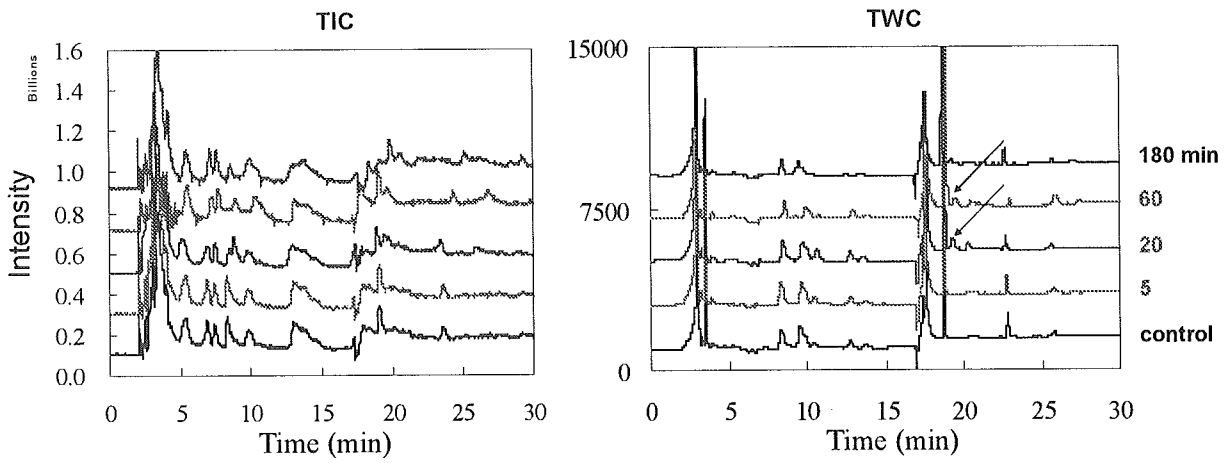


図2 マウス血中 agaritine 代謝物

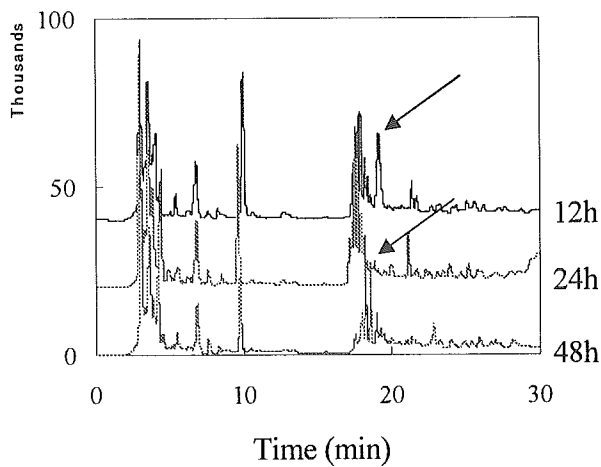


図3 マウス尿中 agaritine 代謝物

表1 マウス尿中 agaritine

12h	0.146 µg/ml urine
24h	0.018 µg/ml urine

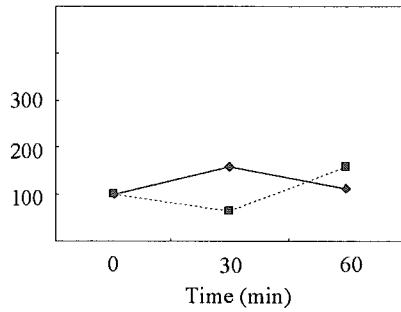


図4 ミクロソーム中で agaritine 分解

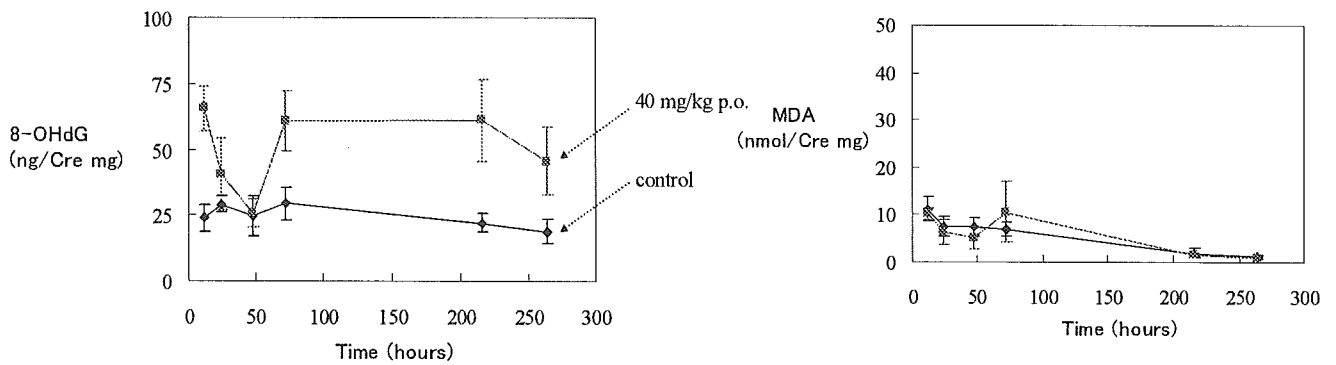


図5 マウス尿中 8-OHdG 量と MDA 量

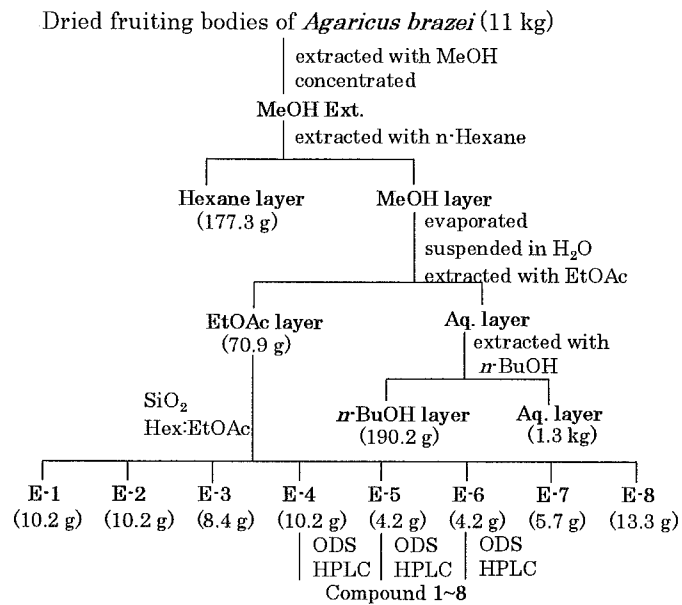
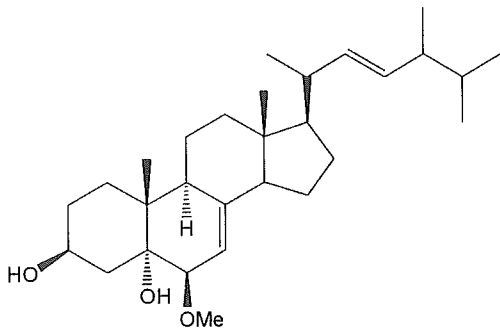
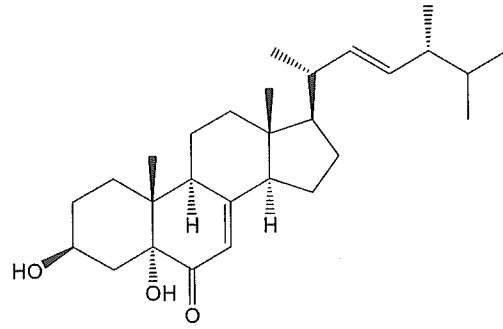


図6 アガリクス (*Agaricus blazei* Murill)の分画, 精製

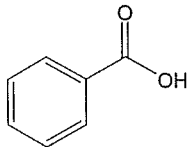
Compound 1-8



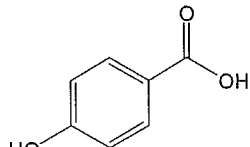
3β,5α-dihydroxy-6β-methoxyergosta-7,22-diene



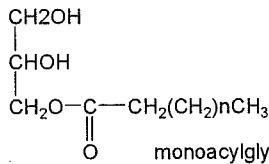
3β,5α-dihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-6-one



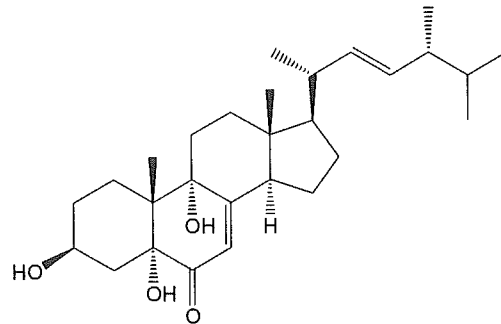
benzoic acid



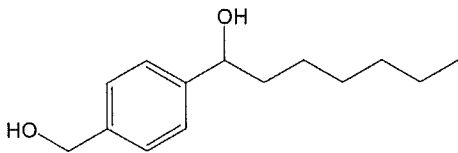
p-hydroxybenzoic acid



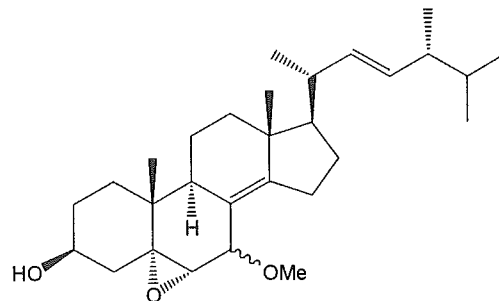
monoacylglycerol



3α,5α,9α-trihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-6-one



1-(4-(hydroxymethyl)phenyl)heptan-1-ol  
(New compound)



3β-hydroxy-5α,6α-epoxy-7-methoxy-(22E,24R)-ergosta-8(14),22-diene  
(New compound)

表2 アガリクスから単離した化合物の細胞毒性

compounds	activity (IC <sub>50</sub> μg/ml)	rate of content (%)
ergosterol	>500	0.047
3β,5α-dihydroxy-6β-methoxyergosta-7,22-diene	25	0.0041
3β,5α,9α-trihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-6-one	75	0.0004
3β,5α-dihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-6-one	25	0.0003
3β-hydroxy-5α,6α-epoxy-(22E,24R)-ergosta-8(14),22-diene	25	0.0001
benzoic acid	>500	0.007
p-hydroxybenzoic acid	>500	0.007
monoacylglycerol	75	0.0045
1-(4-(hydroxymethyl)phenyl)heptane-1-ol	75	0.0002
mytomycin A (as positive control)	0.1	-