

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15-17年度 総合研究報告書

主任研究者 穂山 浩

平成18(2006)年4月

目 次

I. 総合研究報告書	1
------------	---

担子菌類中の有害物質の評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 穂山 浩

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	40
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷り	41
-------------------	----

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

総合研究報告書

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：担子菌類中の有害成分である agaritine (β -N-(γ -L(+)-glutamyl)-4-hydroxymethyl-phenylhydrazine) 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 (GCPH) を化学合成した。また合成した agaritine を標準物質として UV 検出 HPLC 法により、分離分析を開発し、キノコ類中の agaritine 分析法を確立した。担子菌類であるキノコ中の hydrazine 化合物の一つで、変異原性が報告されている agaritine を、LC/MS/MS を用いて定量用に m/z 122、確認用に m/z 248 を用いる高選択的高感度分析法を開発した。この方法を用い *Agaricus* 属キノコおよび *Agaricus* 属以外の各種キノコを分析した結果、アガリクスキノコ製品 (*Agaricus blazei* Murrill) 中には、N.D.~最大 2,017 $\mu\text{g/g}$ dry、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 中には 198 $\mu\text{g/g}$ wet、の agaritine が検出された。シイタケ (*Lentinus edodes*)、マイタケ (*Grifola frondosa*)、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*) 中には agaritine は検出されなかった。agaritine の安定性について検討したところ、agaritine は室温~60°C では長時間安定であるが 80°C 以上では 1 時間以後急速に分解され、一部は HMPH に分解されることが判明した。また、その代謝分解物である HMPH についても LC/MS/MS 法で検討し、agaritine と同時分析が可能であった。きのこ中の有害成分とされる hydrazine 誘導体類について、ヒドラジノ基に着目し、DMEQ-COCl を用いた蛍光ラベル化法による選択的かつ高感度な分析法を確立した。前年度において確立した LC/MS/MS 法を用いた食品中 agaritine 分析法で、agaritine 類縁体を検索するためプリカーサーイオンスキャンおよびニュートラルロススキャンを行った。その結果、agaritine 類縁体は検出されなかった。食品中 agaritine 分析法が、実験動物からの血清等生体試料中の agaritine 分析にも適用できるように改良、検討した。agaritine の体内動態を解明する一環として、アガリクスおよび agaritine 標準品投与マウスを用いて血中への移行を経時的に分析した。その結果、アガリクス経口投与マウス (agaritine 3.2 mg/kg) では agaritine は 20 分で血中濃度が最大となり、その後急速に消失、90 分以降は検出されなかった。agaritine 標準品 (agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg) を用いた実験においても同様に、agaritine は 20 分で血中濃度が最大となりその後急速に消失した。経口投与された agaritine の血中への移行と消失は速やかであると考えられた。金属分析に関しての検討では、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。

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 bisporus*) 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) を含む健康食品の摂取のリスク評価を検討した。

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

Agaricus 属 (和名ハラタケ属) キノコには、変異原性の疑われるアガリチン (agaritine) を含むヒドラジン誘導体が含まれており、健康への影響を危惧する報告がなされている。とくに近年、キノコの子実体や菌糸体培養液を製品化した製品が免疫機能亢進や抗腫瘍作用があるとしてアガリクスという名称で「健康食品」として販売されている。これら製品化された食品では、生のキノコに比べて摂取量が高くなる可能性がある。このような食品の安全性評価のためには、含有する有害物質を特定し、精度良い分析法によって得られた信頼性のある分析データに基づいて評価を行わねばならない。本研究では、アガリクス茸を含む担子菌類中に含まれる有害物質ヒドラジン誘導体を中心に検討を行い、それらの分析法の開発を行う。必要に応じ、標準物質の合成を行い、それら含有量の実態調査から

リスク評価を行う。また開発された分析法を用いて、それら毒性物質の吸収・代謝等の研究、ならびに毒性評価に係わる関連研究を実施した。

B. 研究方法

1. 標準物質の合成・リスク評価

1.1 標準物質の合成

agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成
agaritine および hydrazine 誘導体合成研究は、Subir Datta らの報告 (Helvetica Chimica Acta, 70, 1261-1267, 1987) をもとに行った。

1.2 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 (1cc) (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^B 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 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)

1.3 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 bis-*

porus)-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。

2. 担子菌類中の **hydrazine** 化合物 **agaritine** の新規 LC/MS/MS 分析法開発

2.1 試料

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、ミルを用いてメタノール中でホモジネートし試料とした。

2.2 装置

粉砕器は、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 モードで用いた。LC は、Agilent 製 1100series を用いた。HPLC 用カラムには、Capcellpak AQ (資生堂, 3 μm, 2.1 x 150 mm) を主に用い、検討用として ODS-3 (GL サイエンス, 3 μm, 2.1 x 150 mm)、水系順相カラム HILIC (SeQuant, 5 μm, 2.1 x 150 mm) を用いた。

2.3 抽出および前処理操作

アガリクスキノコ製品はその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。生試料（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、40 gを200 mlのメタノールでホモジネートし、均一なホモジネートから30 mlを用いて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。

2.4 agaritine の安定性試験

agaritine 標準品 10 µg/ml の水溶液を、4°C、25°C、60°C、100°Cの各温度で24時間放置し、agaritineの安定性を検討した。

アガリクスキノコ乾燥品は、5 gを急須に入れ、600 mlの熱湯を注ぎその後放置または23°C、80°Cで放置し、15、30分、1、2、4、8時間後に抽出液を抜き取り、フィルター濾過後、agaritine量の変化を測定した。測定には、HPLC-UV 検出法を用いた。

3. 担子菌類中ヒドラジン化合物アガリチンのマウスによる代謝

3-1. 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。

3-2. 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。

3-3. 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。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 µm, 2.1 x 250 mm) を用いた。

3-4. 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。

3-5. 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 µg/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。

3-6. 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 に対するブ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。

3-7. 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。

3-8. アガリクス抽出、分画エキスの細胞毒性

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

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

4.1. 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。

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。

4.2. 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。

4.3. 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.

4.4 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。

4.5. 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 ¹H-NMR および ¹³C-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。

4.6. 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。

4.7. 食品からのAGARITINEを含むヒドラジンの抽出方法

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 μm 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。

5. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

5.1 試料

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。

5.2 試薬

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

5.3 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)

5.4 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

5.5 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_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。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。

5.6 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。

5.7 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。

5.8 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。

5.9 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。

5.10 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

1. 標準物質の合成・リスク評価

1.1 agaritine を含む phenylhydrazine 化合物の合成

4-(hydroxymethyl)-phenylhydrazine (HMPH、 $C_7H_{10}N_2O$) に関しては Exact Mass: 138.08400 mg で MS(FAB⁺) 解析により 161.17(M+Na) のイオンが得られた。本化合物は非常に不安定であり、H₂O、O₂ によって分解する傾向を示した。しかし Ar 下、-5°C で少なくとも一週間保存可能であった。また熱耐性は高く、最も適した精製法は bulb-to-bulb を用いた昇華法であった。4-(hydroxymethyl)benzenediazonium tetrafluoroborate (HMBD) ($C_7H_7BF_4N_2O$) に関しては、Exact

Mass:222.06222mg で、本化合物も非常に不安定であり、空気中ですぐに分解し、赤色に着色・溶解してしまう傾向があった。そのため N₂ または Ar 下で取り扱った。しかし熱に弱いため、-80°C で保存を行った。agaritine-carboxyl type (C₁₂H₁₅N₃O₅) Exact Mass:281.10150 mg であり、MS(FAB⁺)解析により 282.15(M+H)イオンが検出された。本化合物については文献の報告がなく、安定性等については不明であったが、吸湿性があるようなので、Ar 置換し-80°Cで保存をおこなった。

agaritine (C₁₂H₁₇N₃O₄) に関しては Exact Mass:267.1250 mg で MS(FAB⁺)解析により 268.36(M+H)が検出された。本化合物も非常に不安定であり、空気中で O₂ により分解し、水溶液 (open vial)中で 48 時間することが判明した。Closed で Milli-Q water 使用、N₂置換ならば若干分解は抑えられた。また 4~22°Cで分解し、酸性条件ではさらに分解が早まり、O₂、熱に非常に弱いいため、N₂またはAr置換し、-80°Cで保存をおこなった。

1.2 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。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°C 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。

1.3 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 phenyl-hydrazine, 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 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^{資料2}。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 中には 198 µg/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 transpeptidase 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. *Br. 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、スエ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 200×10^6 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6g)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^{資料¹²}。

(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 $\mu\text{g/g}$ でマッシュルームは湿重量で 198 $\mu\text{g/g}$ 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、 $1.35 \text{ mg/g (最大値)} \times 5 \text{ g} = 6.75 \text{ mg}$ 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 $6.75 \text{ mg} / 50 \text{ kg} = 135 \mu\text{g/day/kg body weight}$ 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。

2. 担子菌類中の hydrazine 化合物 agaritine の新規 LC/MS/MS 分析法開発

2-1. 検量線

agaritine の分子量 267 (exact mass 267.1219) から、まず疑似分子イオンピークの検出を行い、negative

モード、 m/z 266 が検出された。positive モードでは明確なピークが観察されなかった。キノコ試料中の agaritine を高選択的に分析定量するために、LC/MS/MS 法を採用した。そこで、疑似分子イオンピーク m/z 266 から得られるフラグメントピークを検索したところ、 m/z 122、248 に分解されたフラグメントが得られた。

得られた2つのフラグメントピーク (m/z 122, 248) を用いて agaritine 標準品の検量線を作成したところ、いずれの場合も 0.01~10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良い直線性が得られた ($r^2 = 0.999$ 以上)。なお、検出に m/z 122 を用いた方が測定上のばらつきが少なかったため定量にはこれを用い、確認用には、 m/z 122 より約2倍感度が高い m/z 248 を用いることとした。

2-2. 抽出溶媒の検討

キノコ試料は、多くの炭水化物を含んでいるため、抽出溶媒に含水溶媒を用いると抽出物の量が倍増し、形状から多くの糖類が抽出されたと考えられた。そのため、極性の高い agaritine の抽出においても、メタノールなどの有機溶媒のみが望ましいと考えられた。そこで、抽出にメタノールおよびアセトニトリル、試料にアガリクスキノコ1製品を用いて分析までの一連の操作での回収率を検討した。その結果、メタノール抽出ではほぼ100%回収されるのに対し、アセトニトリル抽出では50%未満であった。

2-3. 前処理の検討

agaritine は、グルタミン酸と HMPH が縮合した両イオン性化合物である。また、酸、アルカリ条件では容易に分解される。はじめに、agaritine 標準液を用い、以下の検討を行った。

1) 選択性の高い陽イオン交換カラム SCX を用いる方法。—— 本法では agaritine を保持させるために、塩酸酸性 (pH1) に調整しカラムに負荷。

1M アンモニア水で溶出を行った。その結果、agaritine の約 10%しか回収されず、ほとんどが分解されたものと考えられた。また、キノコ特有の黄色色素も全く除去できなかった。

2) 逆相系カラム C18 を用いる方法。—— 0.01% 酢酸：メタノール (9:1) に溶解した試料溶液を Bond Elut C18 (500 mg) に負荷することにより agaritine は保持されないものの、黄色色素をほぼ完全に吸着除去できた。

3) その他の逆相系カラムであるポリマー系カラム SDB でも 2) と同様の検討を行った。2) と同様 agaritine はほとんど保持されないが、agaritine の完全な溶出に多くの溶媒が必要であり、最終検液が希釈されるのみであった。

2-4. agaritine の熱安定性

1) agaritine 標準品水溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$) を調整し、4°C、25°C、60°C、100°Cでの安定性を検討した。その結果、60°Cまでは 24 時間以内にほとんど分解されないが、100°Cでは、1 時間後から分解が始まり、その後急速に分解が進行することが分かった。また、agaritine の分解に比例して、HMPH が生成

してくることも分かった。

2) アガリクスキノコ乾燥品について、80℃放置では、agaritine 標準品同様急速に分解し、8時間後では大部分が分解された。しかし、実際の摂取条件により近い条件である急須に熱湯注ぎ、その後室温放置の条件では、8時間後でもほとんど agaritine は分解されなかった。15分から4時間では、agaritine は分解されないが、抽出されてくるため、agaritine 濃度は最も高かった。

2-5. agaritine 分析に用いる HPLC 用カラムの検討

両イオン性で高極性である agaritine の保持時間、ピークの挙動を、逆相系 ODS 2 種および水系順相 HILIC カラムで検討した。その結果、ODS-3 カラムでは agaritine の保持時間は 6.1 分（移動相 0.01%酢酸：メタノール=99：1）であるが、移動相をいったん止めた後、分析を開始すると保持時間が早くなった。移動相に 99%水系溶媒を用いているため、典型的なカラム上の炭素鎖の巻き込み、細孔からの移動相の抜けによる現象が見られた。また、ODS-3 を用いて実試料を分析すると同一試料においても測定値の変動が大きく（40%）問題があった。一方、100%水系移動相での使用ができる Capcellpak AQ は保持時間の変動、測定値の変動もなく良好であった。また、agaritine の保持時間は（移動相 0.01%酢酸：メタノール=99：1）、炭素率が少ないためか少し早くなり 5.2 分であった。

次に、agaritine と夾雑物との分離をできるかぎ

りよくすることを考え、強い保持が期待されるカラムとして水系順相 HPLC カラムを検討した。しかし、2本に割れたブロードなピークが得られ、agaritine の分析には不適當と考えられた。

2-6 アガリクスキノコ製品中の agaritine 含量

アガリクスキノコ 9 製品について、agaritine 含量の実態調査を行った。乾燥品試料中の agaritine 含量は、1,437~2,017 $\mu\text{g/g dry}$ 、製品中 agaritine 含量は、一部 279 $\mu\text{g/g dry}$ と高いものがあったが、その他の製品 5 種には ND~1.28 $\mu\text{g/g dry}$ と agaritine 含量は低かった。検出下限は、0.05 $\mu\text{g/g dry}$ であった。

2.7 その他のキノコ中の agaritine 含量

マッシュルームには、198 $\mu\text{g/g wet}$ の agaritine が検出されたが、それ以外のキノコ中には agaritine は検出されなかった。agaritine は *Agaricus* 属キノコに特有の hydrazine 化合物を考えられた。検出下限は、0.05 $\mu\text{g/g wet}$ であった。

2-8. 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。

2-9. 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、またマススペクトルからも agaritine である確認された。

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

次に、グルタミン酸の代わりにアスパラギン酸が HMPH と縮合した agaritine 類縁体の存在を検討するためニュートラルロススキャンを行った。最初に、agaritine 標準品を用いて確認したところ、agaritine 保持時間に検出され、ニュートラルロス

スキャンが有効であることを確認した。次に、乾燥アガリクスで検討したところ、agaritine のピークは認められたが、アスパラギン酸縮合型 agaritine 類縁体 (m/z 252) は検出されなかった。

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

2-10. 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、日内変動はアガリクス製品の 4.15 とマイタケの 5.47% (m/z 122)、日間変動は、アガリクス製品の 15.2 とマイタケ 22.5% (m/z 122)で、酸やアルカリ、熱、空気による酸化で分解しやすい agaritine 分析として良好な結果であった。

2-11. 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。

3) 2) と同様に、今度は agaritine 標準品を用いて実験を行った。agaritine 標準品 (4.0 または 40.0 mg/kg) を 8 週齢雌 ddY マウスに投与し、20 分間隔で 180 分まで経時的に血清中 agaritine 濃度を測定した。その結果、agaritine 標準品 4.0 mg/kg 投与の場合は、20 分で血中濃度は最大となるのは乾燥アガリクス熱水抽出液投与と同じであるが、その agaritine 濃度はアガリクス熱水抽出液投与の場合に比べて低かった。アガリクス熱水抽出液投与では他成分が agaritine 吸収に関係している可能性が示唆された。agaritine 標準品 40.0 mg/kg 投与の場合は、血中 agaritine 量が LC/MS/MS での agaritine 分析の定量下限より高い濃度検出できるためよ

り正確な結果が期待された。実験の結果、20 分をピークとして、急激に消失するきれいな変化が見られ、agaritine の血中への移行と消失はマウスでは早いと考えられた。

2-12. アガリクスの細胞毒性活性

agaritine 以外にも毒性成分が含有されていないかを調べる目的で、細胞傷害性試験によく用いられるヒト口腔癌細胞株 KB cell を用いて、各種アガリクスの抽出エキスについて細胞傷害性について調べた。その結果、200-500 µg/ml の濃度において弱い細胞障害性を認める ergosterol の peroxide 体 2 種が少量 (アガリクス 450 g から 22 mg と 72 mg) 得られた。また、細胞障害性は認められないがメジャー成分の一つとして ergosterol を単離した (450 g から 220 mg)。ergosterol の peroxide 体である、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-methyl-chlesta-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。

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。

2-13. 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。

2-14. 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。

2-15. 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。

2-16. 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。

2-17. 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、