

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。

2-18. 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* Murrill) 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。

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

3. 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

3-1. CPH、agaritine、PH、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。

3-2. 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。

3-3. 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。

3-4. 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。

3-5. 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、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当する m/z 109 のイオンが検出された。親イオンの $[\text{M}+\text{H}]^+$ 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^+ イオンが検出されたが、 m/z 109 の $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当するイオンは検出されなかった。親イオンの $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンの m/z 355 や M^+ 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^+ イオンと m/z 109 の $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンの両方が検出された。

3-6. 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。

3-7. 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

5種類のキノコおよび3種類のアガリクス健康食品中の CPH、agaritine、PH、MPH 量を調べた結果を Table 1 に示した。*Agaricus bisporus* すなわち西洋マッシュルーム中の agaritine は 1, 836 $\mu\text{g/g dry}$ であった。*Agaricus blazei* Murrill 中の agatritine は 111.9—731.3 $\mu\text{g/g dry}$ であった。シイタケ中の agaritine は 8.3 $\mu\text{g/g dry}$ 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 $\mu\text{g/g dry}$ 、product B で 124.3 $\mu\text{g/g dry}$ 、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。

3-8. agaritine の回収率

agaritine を *Agaricus* 茸 B および *Agaricus* 健康食品 A と C に添加した際の回収率をまとめた。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。

4. 担子菌類中の必須・有害金属の分析

4-1 キノコ中の金属含量に関する文献調査

一般的に、土壌中の金属量とそこで生育した植物中の金属量との相関性は植物により様々な結

果が報告されている。キノコはカドミウムを取り込みやすいことがよく知られ、重金属汚染が懸念されるが、古い報告が多かった。さらに、放射性同位体のセシウム 137 を含むという報告も多くあった。実際に輸入食品についても、最近でも高いレベルのものが報告されている。化学形を調べた報告の中で、シイタケにおいて、セレンがセレノメチオニンとして存在することが明らかにされていた。アガリクス属のキノコやシイタケに含まれるカドミウムが高分子タンパク質に結合しているとの報告があった。ベニテングタケ中に含まれるアマバニンがバナジウムとカルシウムを含有する化合物であること、キノコ類には、バナジウムを含むたんぱく質としてクロロペルオキシダーゼが存在することが報告されていた。

4.2 アガリクス健康食品およびキノコ中の金属含量

文献調査で注目された Cd について、8.7、10.5 mg/kg と高い値の製品が見られた。Pb については、特に高い値は検出されず、約 2 mg/kg が最高であった。

As は低濃度であったが、検出された製品があった (1 mg/kg 以下)。ただし Ge が高濃度に含まれている製品においては、ICP 発光分析装置による測定で 65 mg/kg という As の数値が得られた。ICP 発光分光法においては、Ge の発光線 (193.687 nm) が As の発光線 (193.696 nm)

近くにあり、分光干渉 (妨害) することが知られている。そのため、ある製品で得られた As の高い値は、Ge による分光干渉で説明された。

必須金属では、固体製品の場合、Cu は 4-90 mg/kg、Fe は 15-197 mg/kg と、製品によりさまざまであった。Cu の値の高い製品では Fe も高い値であったが、各製品の成分を十分に考慮して比較する必要があると考えられた。

Ge については、ある健康食品で 3,300 mg/kg と高値であったが、製品への表示から、これはアガリクス本来の Ge ではなく、Ge 化合物を添加したためと判断された。

Cr については、ある健康食品で 9.7 mg/kg、ついで、ある製品で 5.7 mg/kg であり、他の製品に比し高い値であった。Zn については、固体製品の場合、7-111 mg/kg であった。

キノコ類の分析結果では、Cd はアガリクス茸や山アワビで 1 mg/kg (乾燥質量) 以上であった。As や Pb は特に検出されなかった。昨年度の文献調査で注目された Se については、ブラウンマッシュルームで 3 mg/kg 検出された。

Cu と Fe の濃度比については、調べたキノコの大部分で Fe の方が Cu よりも高い値を示したが、アガリクスやマッシュルームなどでは逆に、Cu の方が Fe よりも高い値であった。Zn は 41-122 mg/kg であった。V は山あわびとハタケシメジで 2 mg/kg 以上検出された。

以上のように、アガリクス健康食品には Cd 濃

度が高い製品が12製品中2製品(製品B及び製品C)あった。しかしながら、今回分析したサンプル数が限られていることから、2製品を販売していた2社に連絡し、現在、市場に流通している製品についてCd濃度を分析するよう依頼した。その結果、製品Cの販売者からは、4原料ロットにつき2登録検査機関で分析した値が報告され、そのCd濃度は7.62-9.99 mg/kgであった。また、製品Bからは、最近の10ロットの製品の分析値(3.82-5.96 mg/kg、平均4.34 mg/kg)、および参考ロットとして本研究で使用した製品と同時期の1製品の分析値(6.4 mg/kg)が報告された。なお、同社製品は顆粒であるため、何らかの成分を加えて成形してあると考えられた。

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。平成16年度に測定された製品Bと製品CのCd濃度はそれぞれ8.7、10.5 mg/kgであった。平成17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、平成17年度当初に購入したものでは平成16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。

平成17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

今回のマッシュルームおよびアガリクス製品中の agaritine 含量実態調査結果から、市販されている製品のうち、一部の製品（アガリクス茸の乾燥品）には、マッシュルーム同様に高濃度（1500 µg/mL 以上）の agaritine が含まれていることが明らかとなった。それ以外の添加物等を混ぜたアガリクス加工製品中の多くにも agaritine が 3.6~261 µg/mL 含まれていた。アガリクス加工製品中での agaritine 含量がアガリクス茸の乾燥品よりかなり低いのは、アガリクス加工製品がビタミン、アミノ酸などの栄養補助成分を添加しているためアガリクス茸成分含量が製品重量当たり低いこと、およびその加工過程の違いによると考えられる。

LC/MS/MS 法で m/z 122、248 を用いた agaritine 定量が、アガリクスキノコ製品中など夾雑物が多い試料においても、妨害を受けず正確に行えることができた。アガリクスキノコ製品中 agaritine 含

量は、乾燥品が無添加でキノコ成分のみを含むため、2,000 µg/g dry と高濃度に検出された。栄養補助成分を添加したアガリクスキノコ製品中では、一つ 279 µg/g dry 検出されたものがあつた他は、N.D.~1.28 µg/g dry と低濃度であつた。これは、キノコ本来の含量比率が低いことと、加工段階で分解されるためと考えられる。

また、agaritine は 80~100°C 恒温放置では 1 時間後から急速に分解されるが、熱湯を急須に入れ室温放置した場合は、8 時間後でもほとんど agaritine が分解されず残っていた。このことから、実際の摂取の仕方である、熱湯で煎じて飲む、というやり方では agaritine はかなりの量摂取している可能性が示唆された。

Agaricus 属以外のキノコ中には agaritine は今回検出されなかった。agaritine は、*Agaricus* 属に特有の hydrazine 化合物と考えられた。

agaritine は変異原性が報告されているが、アガリクスキノコ全体では変異原性がないとされている。今回、アガリクスキノコ乾燥品中には 2,000 µg/g dry と高濃度検出された。実際の摂取においても、キノコ全体では毒性が全くないかはさらに検討が必要であると考えられる。また agaritine の毒性に関しては、まだ未知な部分が多く正確な毒性評価に関しては今後の研究が必要であることが示唆された。さらに併せて引き続き正確な agaritine を含む hydrazine 化合物の分析学的研究、さらには生体の代謝実験を行う必要性が示唆さ

れた。

キノコ中金属含量の分析装置としては、原子吸光分光光度計、ICP 発光分析装置や ICP 質量分析計（四重極型）が用いられている。一方、金属の化学形態の分析は、その画分を分画して分析する方法と、分離手段と分析手段をオンラインで直結した方法、たとえば HPLC/ICP-MS 法が使用されていた。

バナジウムは抗糖尿病作用が注目されている元素で、二重収束型 ICP-質量分析計を用いないと、生物試料中の精密な分析は難しい元素である。生体内では、超微量なレベルでしか存在せず、血中の存在形態は昨年明らかにされたばかりである。一方、環境中（水中）バナジウム濃度が高い地域のタンポポにおいて、バナジウム濃度が高いことが示されており、また、動物のホヤ中で含まれているという報告がある。このバナジウムについては、ベニテングタケ中にバナジウム含有化合物の存在が知られており、興味深い。

いわゆる健康食品としてキノコを培養で生産する場合に、培地中に金属を添加することが考えられる。したがって、キノコ中の有害物質の評価項目の1つとして、バナジウムを含めた有害・必須金属を二重収束型 ICP-質量分析計で一斉分析し、さらに、多量に含まれている場合にはその化学形態を調べることにより、キノコ類を評価することができると考えられる。

前年度において確立した LC/MS/MS 法を用い

た解析方法を用いて 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結果、agaritine 類縁体は検出されず、agaritine は *Agaricus* 属特有の成分でその類縁体も存在しないことが示唆された。

さらに、食品中 agaritine 分析法が、実験動物からの血清等生体試料中の agaritine 分析にも適用できるように検討し、血清試料中の agaritine 定量は、血清試料の除タンパクのみで可能であったが、尿、糞試料は十分な回収率が得られず（30%以下）、さらに検討が必要と考えられた。

agaritine の体内動態を解明するために、アガリクスおよび agaritine 標準品投与マウスを用いて血中への移行を経時的に分析した。その結果、アガリクス熱水抽出液投与マウス（agaritine 3.2 mg/kg）では agaritine は 20 分で血中濃度が最大となり、その後急速に消失、90 分以降は検出されなかった。agaritine 標準品（agaritine 4.0 or 40.0 mg/kg）を用いた実験においても同様に、agaritine は 20 分で血中濃度が最大となりその後急速に消失した。agaritine の吸収代謝は速やかに起こると考えられる。

Agaritine は変異原性が報告されているが、アガリクスキノコ全体では変異原性がないとされている。また agaritine の毒性に関しては、まだ未知な部分が多く正確な毒性評価に関しては今後の研究が必要であることが示唆された。さらに併せて引き続き正確な agaritine を含む hydrazine 化合物

の分析学的研究、さらには生体内挙動実験を継続して検討する必要性があると考えられた。

昨年度の文献調査から注目された Cd については、入手した市販製品で値が高いものがみられた。文献調査結果から、アガリクス茸から製造されるアガリクス健康食品には Cd 含量が高いものがあることが予想されていたが、今回の結果はこのことを裏付けるものであった。

Cd による毒性は、特に長期摂取による腎障害が問題となるとされている。食品由来の Cd の健康影響については、現在、食品安全委員会にリスク評価を依頼し結果を待っているところであるが、国際的な JECFA による PTWI(暫定耐容週間摂取量)は 7 µg/kg/week であり、2003 年の JECFA でもその値を継続することが確認されている。この値は、体重を 50 kg とし、仮に 1 日あたりに換算すると 50 µg の Cd 摂取となる。一方、わが国における汚染物一日摂取量調査によると、日本人は 1 日あたり Cd を平成 13 年度は 29.3、14 年度は 26.2、15 年度は 25.6 µg (ND=0 とした場合の値) 摂取していると報告されている。

健康食品では同一製品を長期にわたり摂取することが考えられる。そのため、アガリクス健康食品中の Cd 濃度は、製品に記載された目安量に従って摂取した場合に、日常食からの摂取とあわせても、PTWI を下回ることが必要と考えられ、そのための方策がとられることが望まれる。今回、Cd 濃度が高い製品を販売していた製品 C の販売

者からは販売を終了する旨の、また、製品 B の販売者からは、日常食とあわせても PTWI を下回るように社内規格 (Cd 濃度 5 mg/kg 以下) を設定し、それ以上の値の製品については市場に流通させない方針である旨の報告があった。

なお、今回 Cd 濃度が高かった製品については当面の対応策はとられたが、次年度もアガリクス健康食品中の Cd については、フォローアップが必要と考えられた。

必須金属の Zn については、Cd の値が高い製品で高値を示す傾向が、部分的に認められた。Zn と Cd は周期表で同族の元素であり、化学的性質が類似しているため、性質の類似する元素が同じ挙動を示したものと考えられた。

キノコ類では、Cd はアガリクス茸、バイリング、山アワビで、1 mg/kg (乾燥質量) 程度含まれていたが、他のキノコでは低い値であった。

多くのキノコでは Cu よりも Fe の方が高い値であったが、アガリクスやマッシュルームなどアガリチンを含有するキノコでは逆に Cu の方が Fe よりも高い値であった。しかし、アガリチンの生合成との関連については、今後の検討課題である。

なお、今年度の分析で注目された Cd、Cr、Cu、Ge、Se、V、Zn などについては、来年度に化学形や存在状態についての研究が必要であると考えられた。また、今回は分析対象に入れなかったが、キノコには Hg 濃度が高いものがあることが文献調査で

判明した。Hg についても分析する必要があると
考えられた。

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
ま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。

agaritine 40 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。

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序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ているアミノ酸は、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つ

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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ 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 を下回ることが必要と

考えられ、そのための方策がとられることが望まれる。

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。またポルチーニ茸では 0.7、2 mg/kg (乾燥質量) であった。ポルチーニ茸 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、土壤中の 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、土壤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、ポルチーニ茸で 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) 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。

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. Nagaoka MH, Akiyama H, Maitani T. Binding patterns of vanadium to transferrin in healthy human serum studied with HPLC/high resolution ICP-MS.

The Analyst, 129, 51-54. (2004)

2. Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani, Analysis of agaritine in mushrooms and in agaritine-administered mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatography B* 834, 55-61 (2006).

3. Kazunari Kondo, Asako Watanabe, Yuko Iwanaga, Ikuro Abe, Hideya Tanaka, Megumi Hamano Nagaoka, Hiroshi Akiyama and Tamio Maitani, Determination of genotoxic phenylhydrazine agaritine in several mushrooms using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry *Food Additives and Contaminants accepted*.

4. 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).

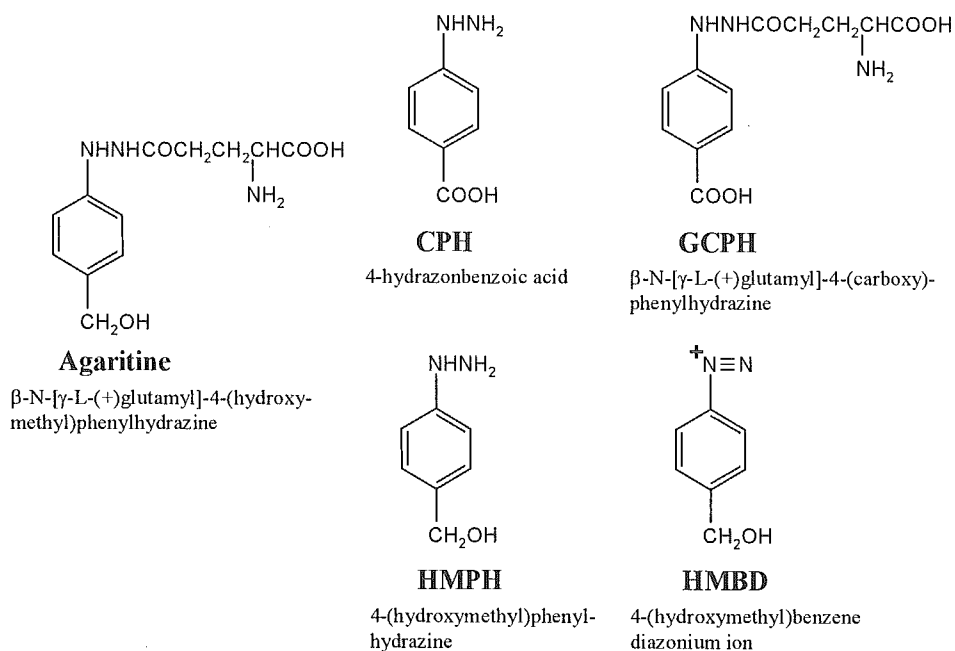
5. M.H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani: Measurement of a genotoxic hydrazine, agaritine, and its derivatives by HPLC with fluorescence derivatization in the *Agaricus* mushroom and its products. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* in press.

学会発表

1. 近藤一成, 阿部 郁朗, 田中秀弥, 長岡 (浜野)

- 恵, 穂山 浩, 米谷民雄. LC/MS を用いたアガリクス中 agaritine の分析. 第 83 回日本食品衛生学会 (2003, 10)
2. 蛍光誘導体化による食品中ヒドラジン類の分析法の検討, 長岡(浜野)恵, 長岡寛明, 武田健, 近藤一成, 穂山浩, 米谷民雄, 日本薬学会第 124 年会(大阪) (講演要旨集 3, p. 42)
3. 近藤一成, 渡辺麻子, 岩永祐子, 阿部 郁朗, 田中秀弥, 長岡(浜野)恵, 穂山 浩, 米谷民雄. LC/MS/MS を用いたキノコ中の変異原性ヒドラジン agaritine の分析. 日本薬学会第 125 年会(東京)
4. 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)
5. 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)
6. 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, 穂山 浩, 米谷民雄, 日本薬学会第 126 年会 (仙台) (2006, 3)
7. 第 126 回日本薬学会「スギヒラタケ中のシア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)
8. 長岡(浜野)恵, 近藤一成, 穂山 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)
9. 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)

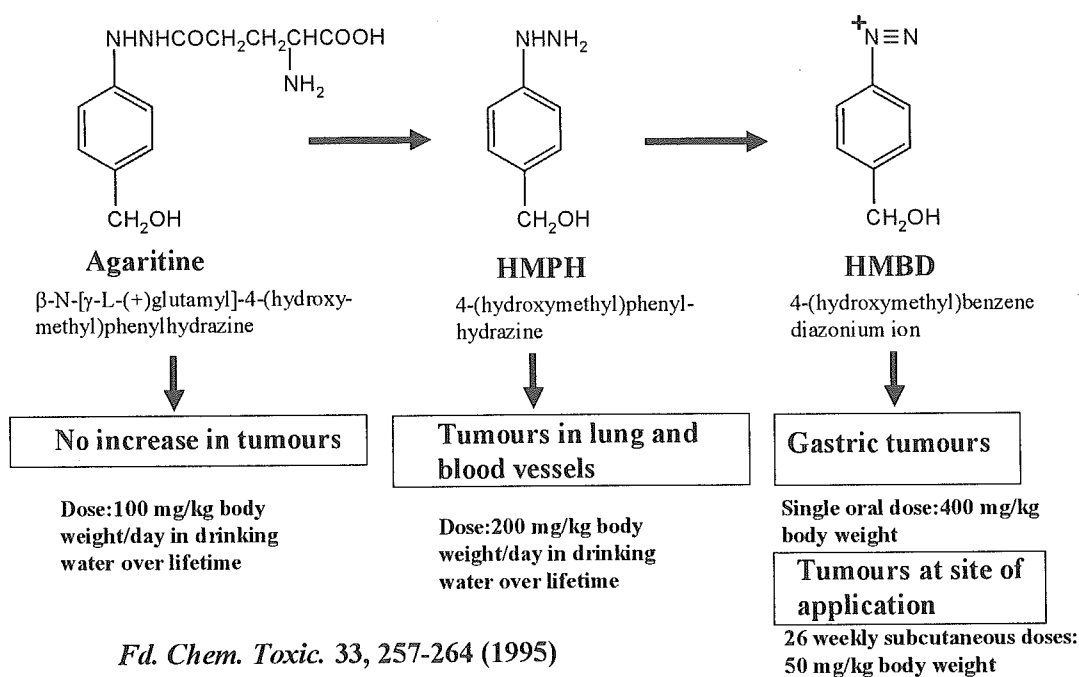
Type of product	Agaritine content (mg/kg fresh weight)	Reference
Frozen mushrooms	330	Ross et al., 1982b
Mushrooms sautéed in olive oil at 300°C(7 min.)	300	Ross et al., 1982b
Sliced mushrooms and mushroom powder used as ingredients for dehydrated soups	100-250*	Stijve et al., 1986
Pasta sauce (n=4)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

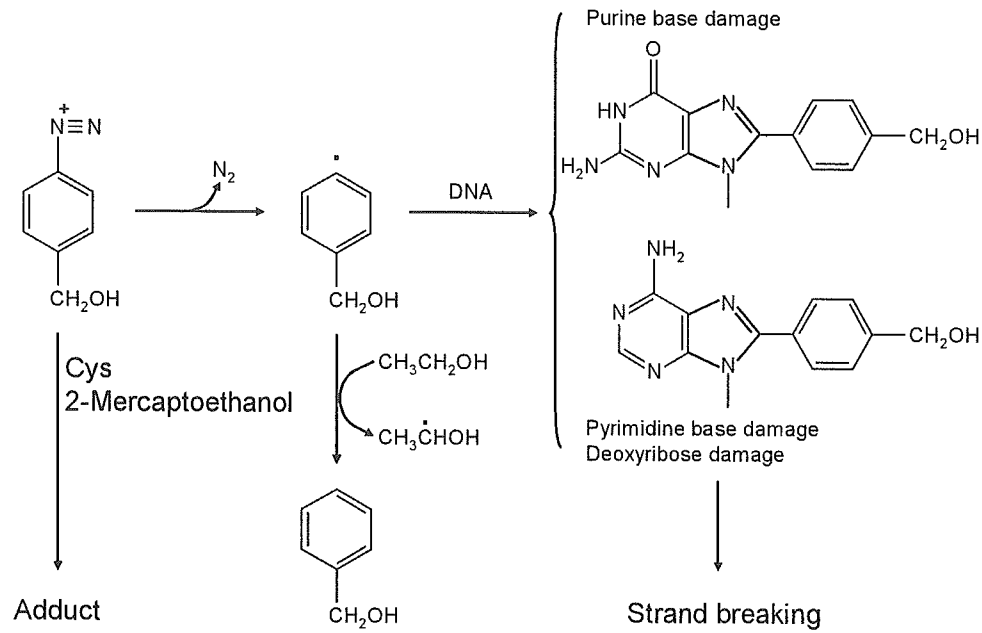
Phenylhydrazines in the Cultivated Mushroom (*Agaricus bisporus*)
- occurrence, biological properties, risk assessment and recommendations

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



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)			(+)	(+)						(+)		Sterner 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)	(-)	(+)	(+)	(-)		+	+	(+)	-	-			
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; (+) = bactericidal 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 cultured mushrooms; (f) preincubation assay instead of plate incorporation assay; (g) extract from dry-cured mushrooms; (h) boiled; (i) metal-binding system from mouse liver; (j) mushrooms with various agaroline contents; (k) metabolising system from aroclor-induced hamster liver; (l) mushrooms purchased in a market 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	-S9 +S9		
Agaritine (a)		-	(+)	(-)						spot test	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	Sierker et al., 1982
Agaritine (c)		(+)	(+)	(+)	(-)					preincubation	Uejima et al., 1986
Agaritine (d)	+	-	-	-		-	(+)	-		preincubation	Friederich et al., 1986
Agaritine (e)					(+)					plate incorporation	Walton et al., 1997b
Agaritine (d) - γ-GT	+	(+)	-	+		-	+	+		preincubation	Friederich et al., 1986
CPH								-	-	preincubation	Milcu-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 (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		Organ	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. Tumorigenicity of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in randomly bred Swiss albino mice.

資料8-2. *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	females		males		females
				(50/group)	(50/group)		(100/group)		(100/group)
<i>Agaricus bisporus</i> lyophilized	p.o.	10% of feed	lifelong	30 (60%)*	13 (26%)	lung	19 (38%)	14 (28%)	
				20	12	adenomas	11	9	
				10	1	adenocarcinomas	8	5	
				3 (6%)	0 (0%)	forestomach	0 (0%)	0 (0%)	
				2	0	squamous cell papillomas	0	0	
				1	0	squamous cell carcinomas	0	0	
				1 (2%)	1 (2%)	glandular stomach	0 (0%)	0 (0%)	
				1	1	adenocarcinomas	0	0	
					11 (22%)**	ovaries		1 (2%)	
					3	adenomas		0	
		8	adenocarcinomas		1				
		25 (50%)*	19 (38%)	lung	19 (38%)	14 (28%)			
		21	13	adenomas	11	9			
		4	6	adenocarcinomas	8	5			
		2 (4%)	1 (2%)	forestomach	0 (0%)	0 (0%)			
		2	1	squamous cell carcinomas	0	0			
		3 (6%)	6 (12%)*	glandular stomach	0	0			
		1	1	adenomas	0 (0%)	0 (0%)			
		2	5	adenocarcinomas	0	0			
			4 (8%)	ovaries		1 (2%)			
		2	adenomas		0				
		2	adenocarcinomas		1				

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

資料8-3. *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	females		males		females
				(50/group)	(50/group)		(100/group)		(100/group)
<i>Agaricus bisporus</i> lyophilized	p.o.	2.5% in feed	lifelong	23 (46%)*	17 (34%)	lung	19 (38%)	14 (28%)	
				16	12	adenomas	11	9	
				7	5	adenocarcinomas	8	5	
				5 (10%)*	5 (10%)*	forestomach	0 (0%)	0 (0%)	
				3	5	squamous cell papillomas	0	0	
				2	0	squamous cell carcinomas	0	0	
				2 (4%)	3 (6%)	glandular stomach	0 (0%)	0 (0%)	
				2	3	adenocarcinomas	0	0	
					1 (2%)	ovaries		1 (2%)	
					1	adenocarcinomas		1	
<i>Agaricus bisporus</i> dry-baked	p.o.	12 h a day for 5 days per week	lifelong	26 (52%)	17 (34%)	lung	19 (38%)	14 (28%)	
				17	8	adenomas	11	9	
				9	9	adenocarcinomas	8	5	
				4 (8%)	12 (24%)	blood vessels	3 (6%)	7 (14%)	
				2	3	hemangiomas	2	5	
				2	12	hemangiosarcomas	1	2	
				9 (18%)	6 (12%)	cecum	4 (8%)	4 (8%)	
				9	6	polypoid adenomas	?	?	
				3 (6%)	1 (2%)	colon	0 (0%)	0 (0%)	
				2	1	polypoid adenomas	0	0	
1	0	adenocarcinomas	0	0					

Table 17A cont. 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%)	
				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%)	
				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%)	
				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%)	
				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)benzenediazonium 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)benzenediazonium sulfate [HMBD]	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. Tumourigenicity 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 ² -[γ-L(+)-glutamyl]-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. Tumourigenicity of the phenylhydrazines and related compounds occurring in the mushroom in randomly bred Swiss albino mice.