

1. 目的

ワラビの毒性の発見は家畜中のワラビ中毒の研究により始まり、1940年代にウシの慢性尿血症がワラビの多い牧場で発生することが報告され、1960年にウシにワラビを投与すると、期間や量により急性ワラビ中毒や慢性尿血症を発生することが明らかになった¹⁾。その後、イギリスの Evans によって1965年に発がん性が明確となった²⁾。日本においては1960年代末より研究が盛んに行われるようになり、日本産のワラビにも強い発がん性が認められたが、木灰や重曹を含む熱湯を用いるあく抜きや塩蔵により、発がん性が消失することがわかった³⁾。このように、ワラビの発がん性に関する研究は多くの研究者によって行われてきたが、発がん性物質及び中毒物質の本体は不明であった。1974年 Evans らによりシキミ酸はワラビの発がん物質であると報告されたが、ラットによる追試では発がん性は認められなかった。さらに、1980年に Pamukcu らはワラビの発がん物質の1つはケルセチンであるとしたが、これもまた発がん性物質ではなかった³⁾。

1984年廣野らは、ワラビの発がん性物質の抽出を行った結果、発がん物質はプタキロサイド(プタキロサイドを以降 PT と表記)であると報告した³⁾。また、PT は不安定な物質であり、弱アルカリ性の条件下でグルコースが切れ dienone になりアルキル化剤として作用し、発がん性を示す。さらに、dienone は酸性条件下で直ちに pterosisin B になり発がん性を失うと報告した。また同時に PT がウシのワラビ中毒の原因物質であることも明らかにした³⁾。さらに、発がん性の機序の解明を進め、dienone が DNA のアデニンやグアニンに結合することや、DNA の二重鎖を切断することも明らかにした⁵⁾。

近年における海外の研究では、「PT はワラビの若芽や若葉に高濃度で検出され、ワラビの含まれた飼料を食べた牛の乳を摂取した人、ワラビの若芽を摂取した人に高い発がん性が認められた。この牛乳中から PT が検出され、ラットが発がん性を示した。」との報告⁶⁾がある。さらに、ワラビ中の発がん物質である PT は食品からだけでなく、「枯れたワラビの堆積物からの土壌への浸出により飲用水からも取り込まれる可能性がある。」との報告がある⁶⁾⁷⁾。

今回の実験はワラビ中の PT 含有量の測定を目的として行った。ワラビの生鮮物、重曹によりあく抜きを行なったワラビ、塩漬後に塩抜きを行ったワラビの、3種の試料の分析を行い PT 含有量の比較を行った。なお、今回行った実験方法(抽出・分析)に関しては2008年度本学研究紀要等に投稿予定で準備を進めているところである。

今回の実験はワラビ中の PT 含有量の測定を目的として行った。ワラビの生鮮物、重曹によりあく抜きを行なったワラビ、塩漬後に塩抜きを行ったワラビの、3種の試料の分析を行い PT 含有量の比較を行った。なお、今回行った実験方法(抽出・分析)に関しては2008年度本学研究紀要等に投稿予定で準備を進めているところである。

2. 実験方法

1) 実験試料

(1) PT 標準試料

PT 標準物質：藤田保健衛生大学 伊藤充也先生提供による。(NMR による構造確認済み) 不純物を含んでいたため、純度 100%に換算を行った。

原液：PT 1mg をメタノール 100 μ L に溶解

原液をメタノールで希釈して 100 倍、200 倍、500 倍を調製した。

(2) ワラビ試料

大田原市にて 2008 年 5 月 5 日、ワラビを採取した。

採取後湿重量 100g のワラビを 1 検体とし、15 検体を作成した。

(ア) 重曹灰汁抜き群 水 2.5L 沸騰させ、火を止めて、重炭酸ソーダ 3g を加え一晩放置、水洗いをして、凍結乾燥 5 検体

(イ) 重曹灰汁抜き後、塩漬け+塩抜き群 水 2.5L 沸騰させ、火を止めて、重炭酸ソーダ 3g を加え一晩放置、水洗いをして、食塩 40g を加え重しをして 12 時間放置、水洗い後、再度食塩 40g を加え

重しをして一晚放置、次の日に塩抜きをして、凍結乾燥 5 検体

(ウ) 生のまま凍結乾燥群 水洗いの後、凍結乾燥。5 検体

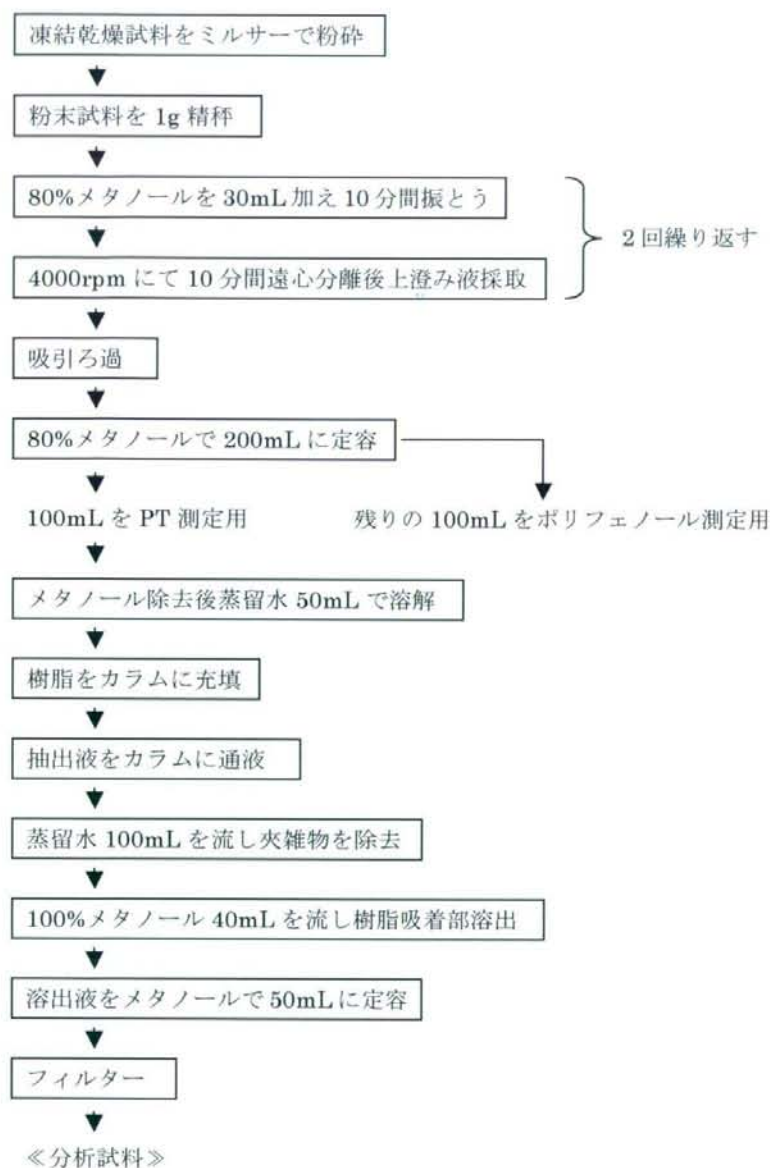
識別番号 3、4 はワラビが腐敗していたため除外し、以上 13 点を分析試料とした。

2)PT 抽出方法

提供された試料は、やや湿っていたため再度凍結乾燥をし直してから実験を行った。ワラビ凍結乾燥試料をミルサー(1FM-6000 IWATANI)で粉末にしたものをポリ容器に移し冷凍保存し、抽出液の作製に用いた。ワラビ粉末は、試料 1 種類につき各 2 点抽出を行った。ワラビ粉末を 1 g 精秤し、80%メタノールを 30mL 加えて CUTE MIXER(CM-1000 EYELA)で 10 分間振とうさせ、遠心分離機(KUBOTA KN-70)を用いて 4000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を採取した。残った沈殿部に 80%メタノール 30mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返した。集めた上澄み液を桐山ロートでろ過し、ろ液を 80%メタノールで 200mL に定容しこれを粗抽出液とした。このうち 100mL を PT 測定用、残りの 100mL をポリフェノール測定用とした。

PT 測定用の粗抽出液 100mL をメタノール除去するためにロータリーエバポレーターで濃縮し、蒸留水 50mL で溶解した。これを樹脂(Amberlite XAD-2)を充填したカラムに流し吸着させ、蒸留水 100mL を流し夾雑物を除去した。その後 100%メタノール 40mL を流し樹脂吸着部を溶出させ、その溶出液をメタノールで 50mL に定容し、フィルター(Ekicrodisc 3CR HPLC Certified 3mm 0.45 μ m)に通し分析試料とした。

3)PT 抽出方法フローチャート



4) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC) の分析条件

本体：高速液体クロマトグラフィー

(LIQUID CHROMATOGRAPH LC - 10AD VP SHIMADZU)

カラム：Chromolith Performance RP-18e(4.6×100mm)MERCK

カラムオープン：40℃

移動相：メタノール：超純水=1：1

流量：0.5mL/min

吸収波長：206nm

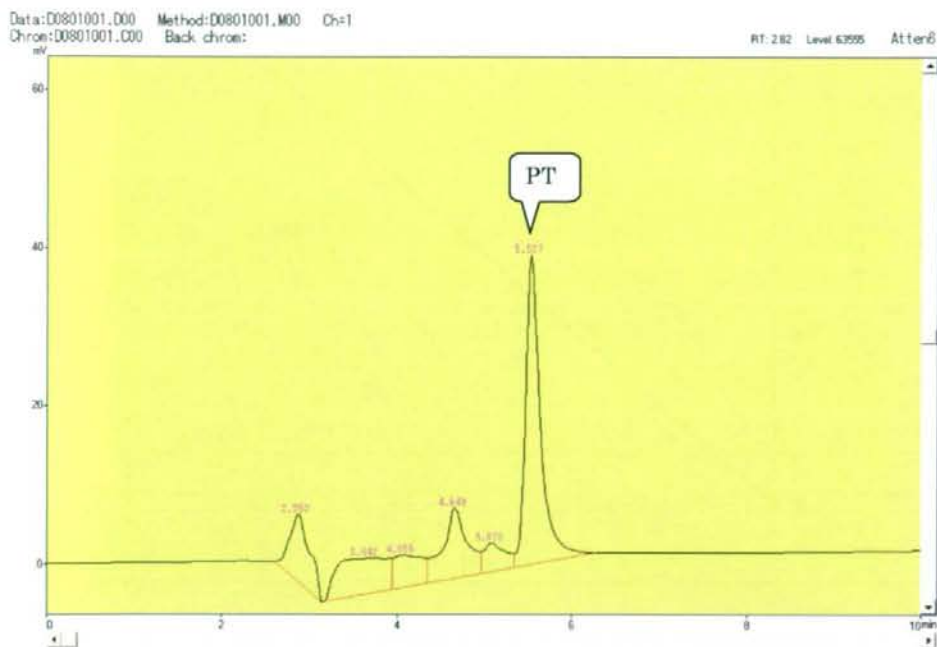
Injection：10 μL

3. 結果

1) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による PT 検量線

PT の標準物質を HPLC により分析した際に得られたクロマトグラムを以下に示す。

リテンションタイム 5.5 分台に PT を検出した。



** ヒートレポート ** D0801001.D00 08/12/08 10:01:22

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.859	133139	8472	E		11.9622	
2	3.642	189638	4507			17.0384	
3	4.055	89951	4127	V		8.0818	
4	4.649	173388	8894	V		15.5784	
5	5.078	61837	3539	V		5.5559	
6	5.527	465049	38958	V		41.7833	

TOTAL		1113002	68499			100.0000	
-------	--	---------	-------	--	--	----------	--

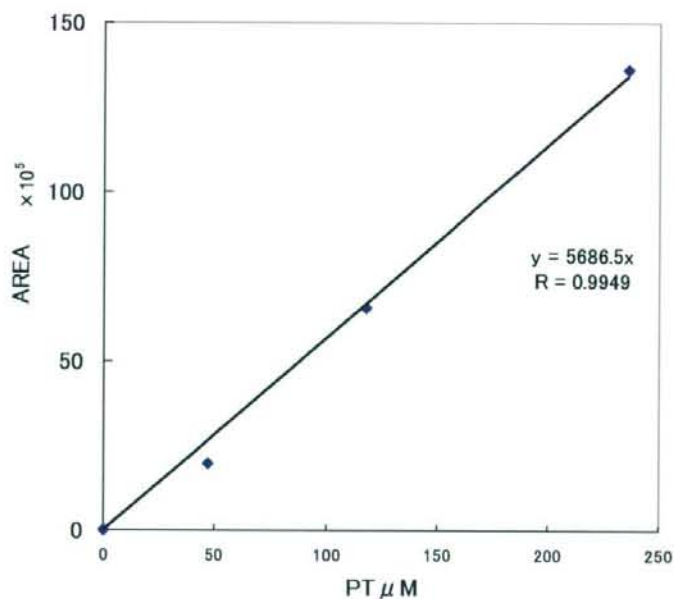
今回の実験に用いた PT の検量線を以下に示す。

試料は PT 標準粉末 1mg をメタノール 100 μ L に溶解した後、それを 100 倍、200 倍、500 倍したものを用いた。面積値を用い図 1 に検量線を示した。直線性について検定を行ったところ相関係数 0.9949 で直線性が認められた。

表 1 PT 検量線
吸収波長：206nm

希釈倍率	AREA
100 倍	1363413
200 倍	656170
500 倍	196992

図 1 PT 検量線

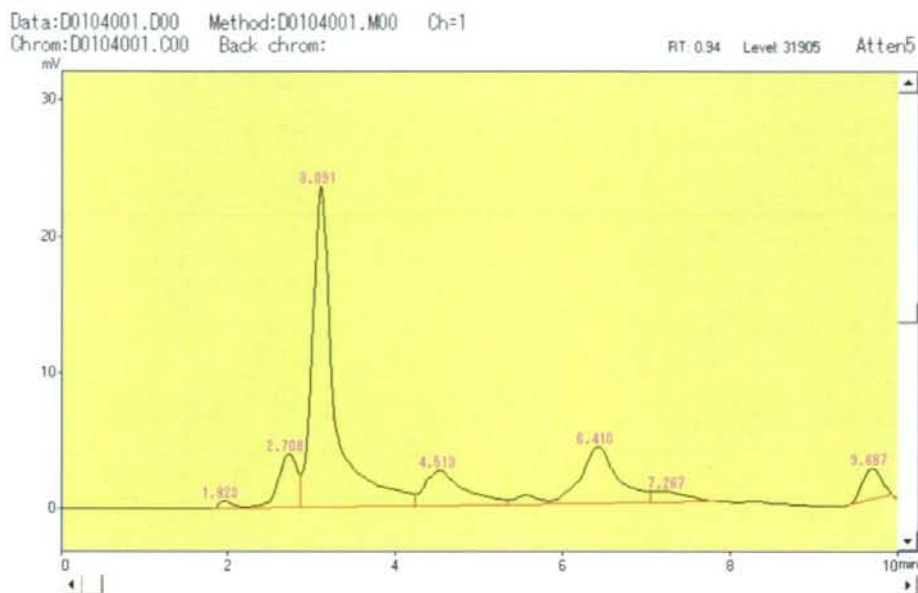


2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるワラビ中 PT の分析結果

ワラビ抽出液を HPLC により分析した際に得られたクロマトグラムの代表例を以下に示す。

(1) 重曹あく抜き+塩漬け+塩抜き処理ワラビ

リテンションタイム 5 分代にピークは確認できず、PT をほとんど含有していないことが明らかとなった。



** ピークレポート ** D0104001.D00 08/12/01 14:11:10

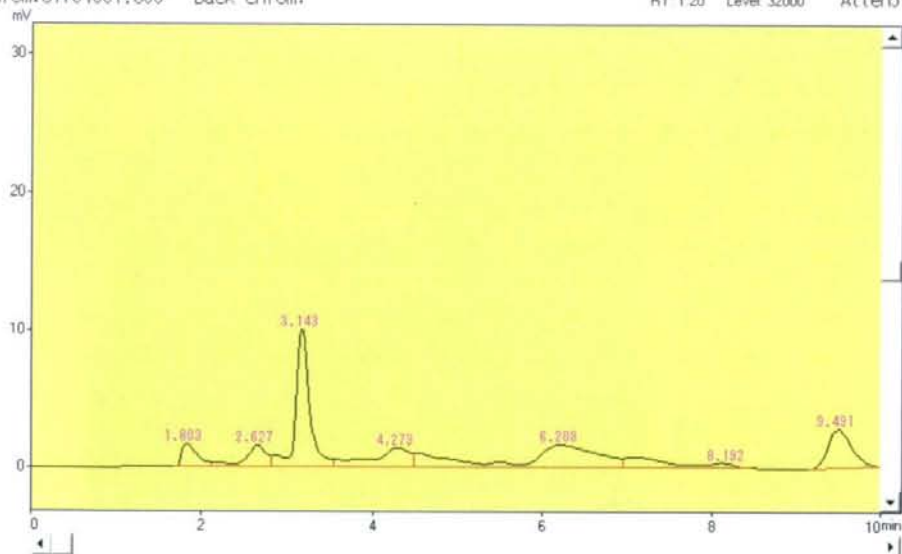
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.923	6090	562			0.7727	
2	2.708	62326	3908	V		7.9080	
3	3.091	436553	23547	V		55.3903	
4	4.513	82545	2543	V		10.4734	
5	6.410	142864	4134	V		18.1268	
6	7.267	21735	769	V		2.7578	
7	9.687	36027	2257			4.5711	
TOTAL		788141	37719			100.0000	

(2)重曹処理ワラビ

リテンションタイム 5 分代にピークは確認できず、PT をほとんど含有していないことが明らかとなった。

Data:01704001.D00 Method:01704001.M00 Ch=1
Chrom:01704001.C00 Back chrom:

RT 1.20 Level 32000 Atten5

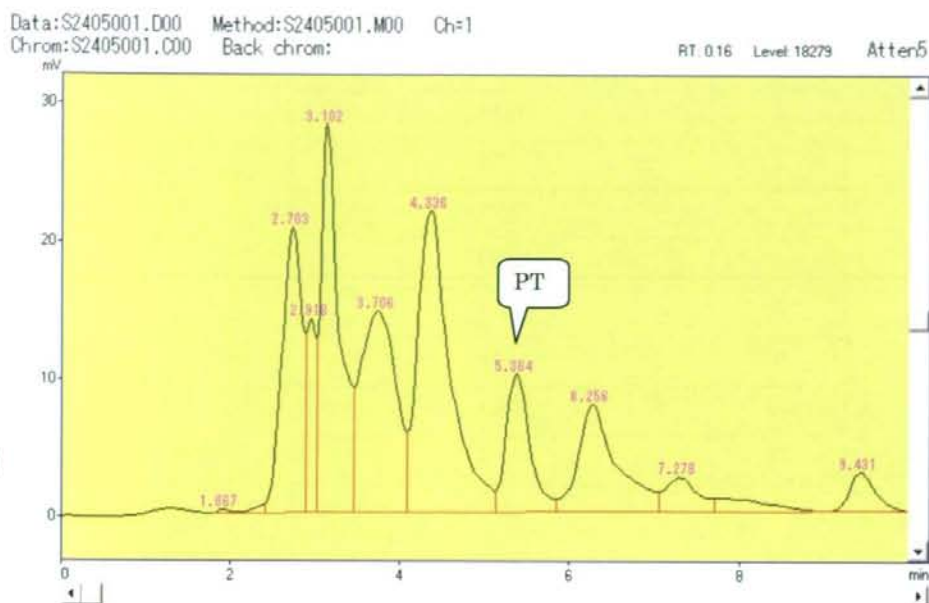


** ヒートレポート ** O1704001.D00 08/10/17 15:04:54

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.803	20709	1679			5.0423	
2	2.627	27379	1609	V		6.6663	
3	3.143	114657	10051	V		27.9173	
4	4.273	46022	1400	V		11.2058	
5	6.208	114067	1658	V		27.7736	
6	8.192	33418	298	V		8.1368	
7	9.491	54450	2800			13.2579	
TOTAL		410703	19495			100.0000	

(3) 生鮮ワラビ

リテンションタイム約 5.4 分に PT のピークが確認できた。



** ヒートレポート ** S2405001.D00 08/09/24 11:55:28

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.867	8212	243			0.3249	
2	2.703	344628	20691	V		13.6370	
3	2.918	107937	14071	V		4.2711	
4	3.102	430249	28126	V		17.0251	
5	3.706	430833	14652	V		17.0482	
6	4.336	591929	21866	V		23.4228	
7	5.364	197431	10000	V		7.8124	
8	6.256	248282	7810	V		9.8246	
9	7.278	66692	2482	V		2.6390	
10	9.431	100956	2812	V		3.9949	

TOTAL		2527148	122754			100.0000	

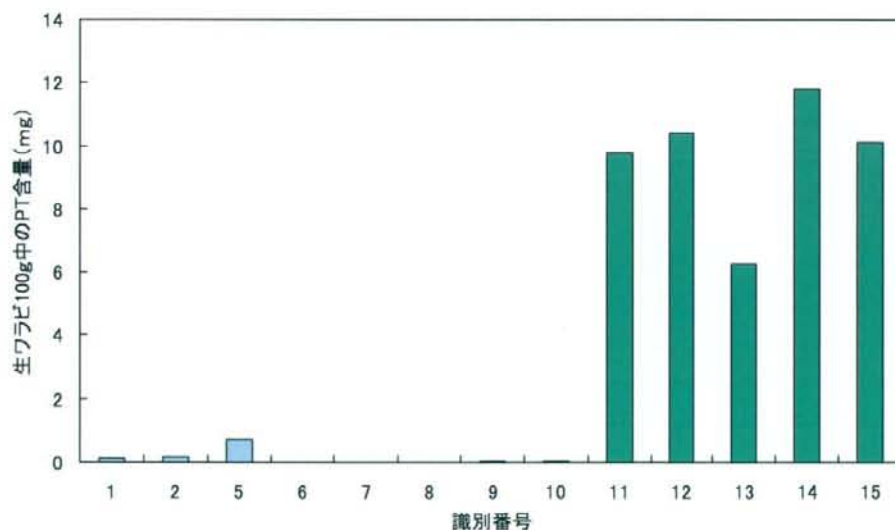
(4)PT 含有量

HPLC によりワラビ抽出液を分析した結果を以下に示す。

表 2 ワラビ生鮮物 100g 中の PT 含有量

識別番号	ワラビ生鮮物 100g 中の PT 含量(mg)
1	0.13
2	0.16
5	0.73
6	0.00
7	0.00
8	0.00
9	0.06
10	0.03
11	9.76
12	10.41
13	6.28
14	11.79
15	10.11

図 2 ワラビ生鮮物 100g 中の PT 含有量

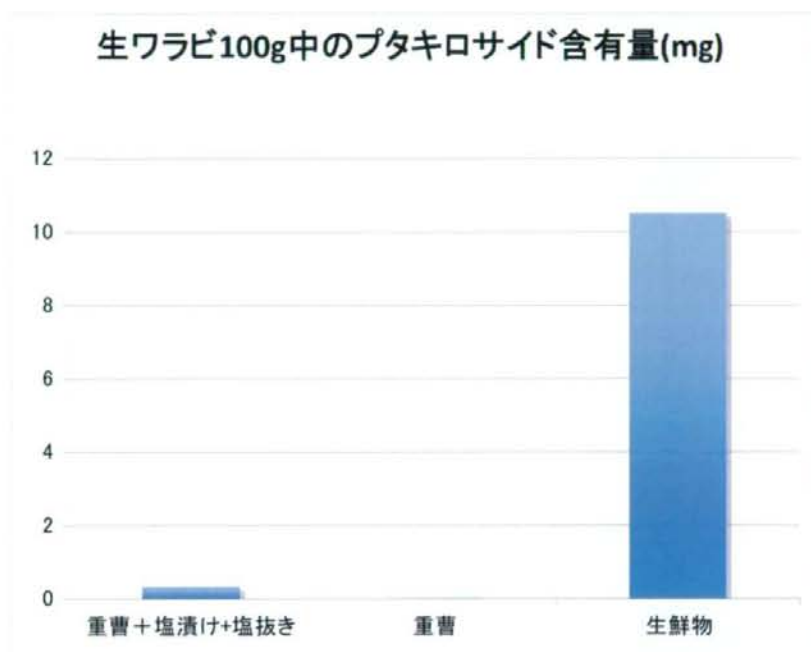


塩漬け+塩抜き、重曹、生鮮物の項目ごと値を平均した表、グラフを以下に示す。なお、識別番号 13 については他の生鮮物と比較し値に差異がみられたため、平均より除外した。

表3 ワラビ生鮮物 100g 中の PT 含有量 (平均)

試料	生ワラビ 100g 中の PT 含有量(mg)
塩漬け+塩抜き	0.34
重曹	0.02
生鮮物	10.52

図3 ワラビ生鮮物 100g 中の PT 含有量 (平均)



ワラビ生鮮物の PT 含有量は 10.52mg%であったのに対し、塩漬け+塩抜きは 0.34mg%と約 96.8% 減少、また重曹でのあく抜きを行ったワラビは 0.02mg%と約 99.8%減少した。

4. 考察

今回の実験の結果、ワラビ生鮮物の PT 含有量は約 10.52mg%、塩漬け+塩抜きでは約 0.34mg%、重曹では約 0.02mg%であった。生鮮物と比較し、塩漬け+塩抜き、または重曹であく抜きを行ったものは PT をほとんど含有していないことが明らかとなった。

今後の課題としては、今回は一地域より採取されたワラビを分析したため、採取される地域あるいは品種によってワラビに含有される PT 含有量には差異があることが考えられる。また今回は塩漬け+

塩抜き処理、または重曹処理によってあく抜きを行ったが、処理方法によっても値には差異があることが考えられる。食品製造やあるいは家庭や地域での利用に際し、安全に食すための処理法についての基準が必要ではないかと考える。さらに市販されているワラビ加工品についても、国産・輸入品の各々について、現在のところ PT 含有量は明らかにされていないため、今後分析が必要であると考えらる。

5.参考文献

- 1) 山田 静之. ワラビの発がん物質. 化学と工業, vol.37, No.11, 1894, p767-769
- 2) Evans, I, A & Mason, J, Nature(London), 208, 913(1965)
- 3) 廣野 巖. 化学発がん 3 ワラビより抽出された発癌物質「プタキロサイド」. 代謝, vol.22, 臨増, 1985, p719-723
- 4) 廣野 巖. 植物成分の発癌性 食品を中心に. 診断と治療, 72 卷, 9 号, 1984, p13-15
- 5) 廣野 巖. 植物性天然発癌物質. 環境科学総合研究所年報, Vol.10, 1991, p 105-110
- 6) Bracken carcinogens in the human diet. Shahin M, Prakash A S , Smith B L. Mutat Research, Vol.443, No.1/2, 1999, p69-79.
- 7) Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. Rasmussen L H, Hansen H C B, Kroghsbo S, Frisvad J C . Chemosphere, Vol.51, No.2, 2003, p 117-127.