

Lack of Carcinogenicity of Lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 Rat Two Year Bioassay

F344ラットを用いたアガリクス・ブラゼイ・ムリルによる
2年間長期発がん性試験でのがん原性“陰性”報告



Insu P.Lee, Ph.D.

NCI Rapid Program アガリクス臨床開発責任研究官

金沢大学大学院医学系研究科 臨床研究開発補完代替医療講座

Objective: To determine the safety of long term use of dietary supplement

目的: 新開発食品における安全性の確認

- **Long term consumption of dietary supplement should be tested for a long term toxicity to ascertain the safety of dietary supplement (Voluntary decision)**

長期間（一生に）にわたってアガリクスを飲用した場合の安全性検討が必要。

※H. 18. 2. 13厚生労働省新開発保健対策室による1社のアガリクス製品における中期多臓器発がん性試験の結果“発がん促進作用あり”との報告。

*本試験はICHのガイドラインではスクリーニングにあたり、本来の発がん性の有無については2年間の長期発がん性試験が必要とされている。

*本試験実施期間：1998年2月慢性発癌試験開始－2001年終了

- **To evaluate effects of the long term use of dietary supplement with respect to age-related disease**

各種成人病の予防や健康影響評価についての検証となる基礎データ

※ラットに2年間投与して生化学検査を実施した。（GLP基準）

<ラットの2年間は、ほぼ人の一生のモデルとなる。>

Exp. Method: 実験方法

ラットを4群(各群、雄・雌100匹)に分け餌だけ与える群、餌に協和アガリクス(以下ABMK)を6250ppm、12500ppm、25000ppmを与える群を設定、それぞれ混餌投与にて2年間(104週)経過観察を行なった。

Food consumption and intake 餌の摂取状況

Table 1.

Food consumption and intake of *Agaricus blazei* Murill powder

| Group (ppm) | Mean Food consumption (g/rat/day) | | Mean intake of <i>Agaricus blazei</i> Murill Powder (mg/rat/day) | | | | Total intake of <i>Agaricus blazei</i> Murill powder (g/rat/104 wks) | |
|-------------|--------------------------------------|--------|---|--------|------|--------|---|--------|
| | Male | Female | Male | Female | Male | Female | Male | Female |
| 0 | 15.4 | 11.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6,250 | 15.5 | 11.6 | 97 | 73 | 292 | 391 | 71 | 53 |
| 12,500 | 15.6 | 11.4 | 195 | 149 | 567 | 805 | 143 | 108 |
| 25,000 | 15.5 | 11.2 | 386 | 281 | 1176 | 1518 | 281 | 204 |

F344 Rats Growth Curve

ラットの成長率

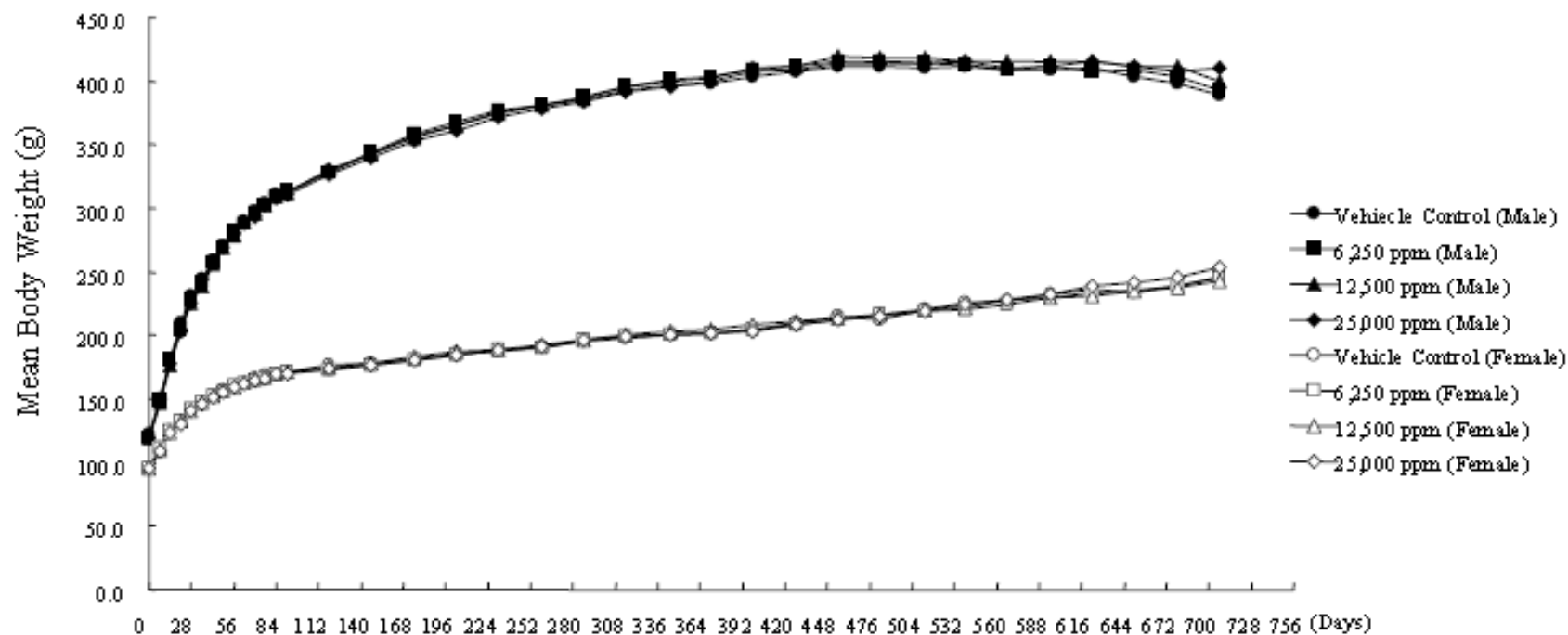


Fig.1 Growth curve of male and female F344 rats treated with *Agaricus blazei* Murill in diet for 104 weeks

Result 結果(1)

Table 2

Survival of F344 rats at 104 weeks

雄ラットの生存率と死亡率で有意差を確認

| | | Dose (ppm) | | | | |
|--------------------------------------|--------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| | | Control | 6,250 | 12,500 | 25,000 | |
| Total initial number of F344 rats | Gender | | | | | |
| | Male | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| | Female | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| Total number of F344 rats surviving | Male | 26 | 52% 36** | 71% 42** | 84% 35** | 70% |
| | Female | 45 | 41 | 43 | 45 | |
| Found moribund (sacrificed) and dead | Male | 24 | 48% 14** | 28% 8** | 16% 15** | 30% |
| | Female | 5 | 9 | 7 | 5 | |

Statistical analysis by Cochran-Armitage and Fisher's exact test using SAS Ver.9.

*p<0.01~0.03, **p<0.006

Result 結果(2)

Table 3

Clinical findings

| | | | | | | |
|------------------------------|-----------|--------|----|-----|-----|-----|
| Cataract | 白内障 | Male | 10 | 2* | 3* | 2* |
| | | Female | 1 | 2 | 3 | 2 |
| Decreased locomotor activity | 活動/運動能力 | Male | 19 | 14* | 6* | 9* |
| | | Female | 42 | 36* | 29* | 33* |
| Dark periocular material | 眼滲出分泌物 | Male | 14 | 8* | 7* | 6* |
| | | Female | 42 | 36* | 29* | 33* |
| Emaciation | 痩せ(食欲の低下) | Male | 9 | 7 | 6 | 6 |
| | | Female | 1 | 5 | 3 | 2 |
| Lacrimation | 流涙 | Male | 3 | 0 | 0 | 1 |
| | | Female | 26 | 23 | 22 | 18 |
| Paralysis | 麻痺(筋肉) | Male | 3 | 2 | 0 | 1 |
| | | Female | 3 | 2 | 0 | 1 |
| Scars | 傷跡 | Male | 5 | 2 | 2 | 4 |
| | | Female | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Paleness | 蒼白 | Male | 13 | 13 | 8 | 9 |
| | | Female | 4 | 13 | 7 | 4 |

Statistical analysis by Cochran-Armitage and Fisher's exact test using SAS Ver.9.

* $p < 0.01 \sim 0.03$, ** $p < 0.006$

Result <癌発生率> 結果(3-1)

Table 5-1.

Summary of tumor burden in dead and moribund animals (% of tumor bearing animals)

| Animal numbers /Lesions | Gender | Control | 6,250 | 12,500 | 25,000 | ^a Historical data |
|---|--------|---------|---------|---------|----------|------------------------------|
| Total number of animals/Group | Male | 24 | 14** | 8** | 15** | Range(%) |
| | Female | 5 | 9 | 7 | 5 | |
| Total number of animals with tumors | Male | 22(92%) | 13(93%) | 8(100%) | 15(100%) | 90-100% |
| | Female | 3(60%) | 8(89%) | 5(71%) | 4(80%) | 64-98% |
| Total number of animals with malignant tumors | Male | 19(79%) | 12(86%) | 5(63%) | 11(73%) | 38-82% |
| | Female | 2(40%) | 6(67%) | 3(43%) | 4(80%) | 18-56% |
| Total number of animals with benign tumors | Male | 17(71%) | 9(64%) | 6(75%) | 14(93%) | 82-100% |
| | Female | 2(40%) | 2(22%) | 2(57%) | 0(0%) | 58-86% |

^aBoorman, GA, Eustis, SL, Montgomery, C, and Elwell, M. (eds.), 1990 Pathology of the F344 rat, Reference and Atlas. Academic Press, San Diego, CA

**Statistical analysis by Cochran-Armitage and Fisher's exact test using SAS Ver.9.p<0.01 and p<0.006, respectively.

Result <癌発生率> 結果(3-2)

Table 5-2

Summary of tumor burden in animals at terminal sacrifice (% of tumor bearing animals)

| Animal numbers /Lesions | Gender | Control | 6,250 | 12,500 | 25,000 | ^a Historical data |
|---|--------|---------|---------|---------|----------|------------------------------|
| Total number of animals/Group | Male | 26 | 36** | 42** | 35** | Range(%) |
| | Female | 45 | 41 | 43 | 45 | |
| Total number of animals with tumors | Male | 25(96%) | 35(97%) | 41(98%) | 35(100%) | 90-100% |
| | Female | 28(62%) | 24(59%) | 24(56%) | 28(62%) | 64-98% |
| Total number of animals with malignant tumors | Male | 5(19%) | 13(36%) | 17(40%) | 15(43%) | 38-82% |
| | Female | 5(11%) | 8(20%) | 6(14%) | 5(11%) | 18-56% |
| Total number of animals with benign tumors | Male | 24(92%) | 33(92%) | 39(93%) | 35(100%) | 82-100% |
| | Female | 26(58%) | 21(51%) | 19(44%) | 27(60%) | 58-86% |

^aBoorman, GA, Eustis, SL, Montgomery, C, and Elwell, M. (eds.), 1990 Pathology of the F344 rat, Reference and Atlas. Academic Press, San Diego, CA

**Statistical analysis by Cochran-Armitage and Fisher's exact test using SAS Ver.9.p<0.01 and p<0.006, respectively.

Result <癌発生率> 結果(3-3)

Table 5-3

Summary of tumor burden in total number of animals (% of tumor bearing animals)

| Animal numbers /Lesions | Gender | Control | 6,250 | 12,500 | 25,000 | ^a Historical data |
|---|--------|---------|---------|---------|----------|------------------------------|
| Total number of animals/Group | Male | 50 | 50 | 50 | 50 | Range(%) |
| | Female | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| Total number of animals with tumors | Male | 47(94%) | 48(96%) | 49(98%) | 50(100%) | 90-100% |
| | Female | 31(62%) | 32(64%) | 29(58%) | 32(64%) | 64-98% |
| Total number of animals with malignant tumors | Male | 24(48%) | 25(50%) | 22(44%) | 26(52%) | 38-82% |
| | Female | 7(14%) | 14(28%) | 9(18%) | 9(18%) | 18-56% |
| Total number of animals with benign tumors | Male | 41(82%) | 42(84%) | 45(90%) | 49(98%) | 82-100% |
| | Female | 28(56%) | 23(46%) | 23(46%) | 27(54%) | 58-86% |

aBoorman, GA, Eustis, SL, Montgomery, C, and Elwell, M. (eds.), 1990 Pathology of the F344 rat, Reference and Atlas. Academic Press, San Diego, CA

癌発生率において対照群とABMK投与群における有意差は確認されなかった。

※24ヶ月の剖検前では、対象群と比較してABMK投与群では癌の発生率が減少していた。

Clinical observation : 考察(1)

■ Locomotor activity: 活動力

- Locomotor activities in ABM treatment in males as compared to controls were significantly superior

オスABMK非投与ラットに比べオスABMK投与ラットは活動力が明らかに良くなった。

※メスはあまり変化が見られなかった

- Incidence of cataract: 白内障発生率

- Male ABM treatment group showed significantly reduced incidence of cataract, and statistically significant

オスABMK非投与ラットに比べオスABMK投与ラットは白内障発生率が2~5倍減少した。メスもABMK投与群は白内障発生率が減少している傾向が見られたが、統計学的有意差はみられなかった。

■ 全身諸症状

- As compared to control, ABMK treatment group showed reduced incidence of orbital secretion of dark material, alopecia, emaciation, respiratory distress, skin wounds, paralysis, exophthalmia, etc.

ABMK非投与ラットに比べABMK投与ラットは眼滲出分泌物、脱毛、毛の汚れ、呼吸困難、眼球突出症、流涙、壊死、小結節、麻痺、傷跡等が減少した。

食欲

ABMK非投与ラットとABMK投与ラットに餌の摂取量に差は見られなかった。

ABMK非投与ラットとABMK投与ラットに水の摂取量に差は見られなかった。

Clinical observation : 考察(2)

- Hematology and blood chemistry of ABMK treated groups were not significantly different from controls.

血液検査

ABMK非投与ラットとABMK投与ラットの白血球数、赤血球数、血小板数に変化は見られなかった。

- ABMK treatment groups (12500 and 25000ppm) at 22 months after the start of the experiment, showed significant improvement in aptitude and memory function as compared to controls.

認識力及び記憶力

ABMK投与後22ヶ月後認識力及び記憶力を検査した結果、良い傾向が見られた。(12500・25000ppm)

Clinical observation : 考察(3)

●Immune Function

免疫機能

- ABM treatment groups after 22-month of ABM treatment, T-cell dependent Sheep red blood cell antibody formation was increased by 2~2.5 fold
- ABMK投与後22ヶ月後の免疫機能について検査した結果、T-cell dependent 羊赤血球に対する抗体反応を促進することが確認された。

●DNA oxidative damage

DNA酸化障害(抗酸化作用)

- 24 month after ABM treatment, 8-OH dG levels of brain, heart, and lung were significantly reduced as compared to that of controls.
- ABMK投与後24ヶ月後の遺伝子の酸化障害について検査した結果、メスでは心臓の酸化障害が、オスでは脳、心臓、肺の酸化障害が有意に減少した。

Conclusion : 結論

- **Dietary feeding of ABMK for 24 months (6259, 12500, 25000ppm demonstrated clinical improvement with respect to locomotor activity, incidence of cataract, health status of animals, and survival were significantly superior than controls**
ABMKを24ヶ月飼料に混ぜて与えたところ(6250・12500・25000ppm) 対照群に比べ臨床的に、活動力、生存率、健康状態が優れていた。また白内障の発生率も有意に減少した。
- **Comprehensive histopathological examination demonstrated that no significant tumor burden was observed in chronically fed ABM groups.**
剖検異常等も見られずABMK摂取は安全であると評価された。
- **No abnormality was found in cardiovascular, reproductive, and neurological function in animals treated with a long term dietary feeding of ABMK.**
その他循環器官の機能、生殖機能等においても異常は見られなかった。
- **A long term feeding ABMK showed no carcinogenicity.**
摂取による発がん性が無い事が確認された。

Conclusion : 結論 (追記)

- NCI Rapid programにおいて、ABMK の安全性の再現性を確認するために、ラットとイヌにおける亜急性毒性試験を実施し、陰性結果により安全性を確認している。
本試験はNCI(米国国立がん研究所)契約研究所であるSouthern Research Instituteにより実施された。
実施期間:2002. 10~2003. 3

Natural Products and the Ames Assay – Potential for False Positives

=天然物を用いたエームス試験における疑陽性の潜在性=

- Paul E. Kirby and I. P. Lee
- SITEK Research Laboratories
- Rockville, MD, USA & Faculty,
- Complimentary & Alternative Medicine,
- Graduate Faculty of Medical Sciences,
- Kanazawa University, Kanazawa, Japan

本試験はNCI(米国国立がん研究所)の契約研究所(サイテックリサーチ)において実施され、NCI Rapid programにおけるABMKの安全性試験データとして提出された。

Introduction

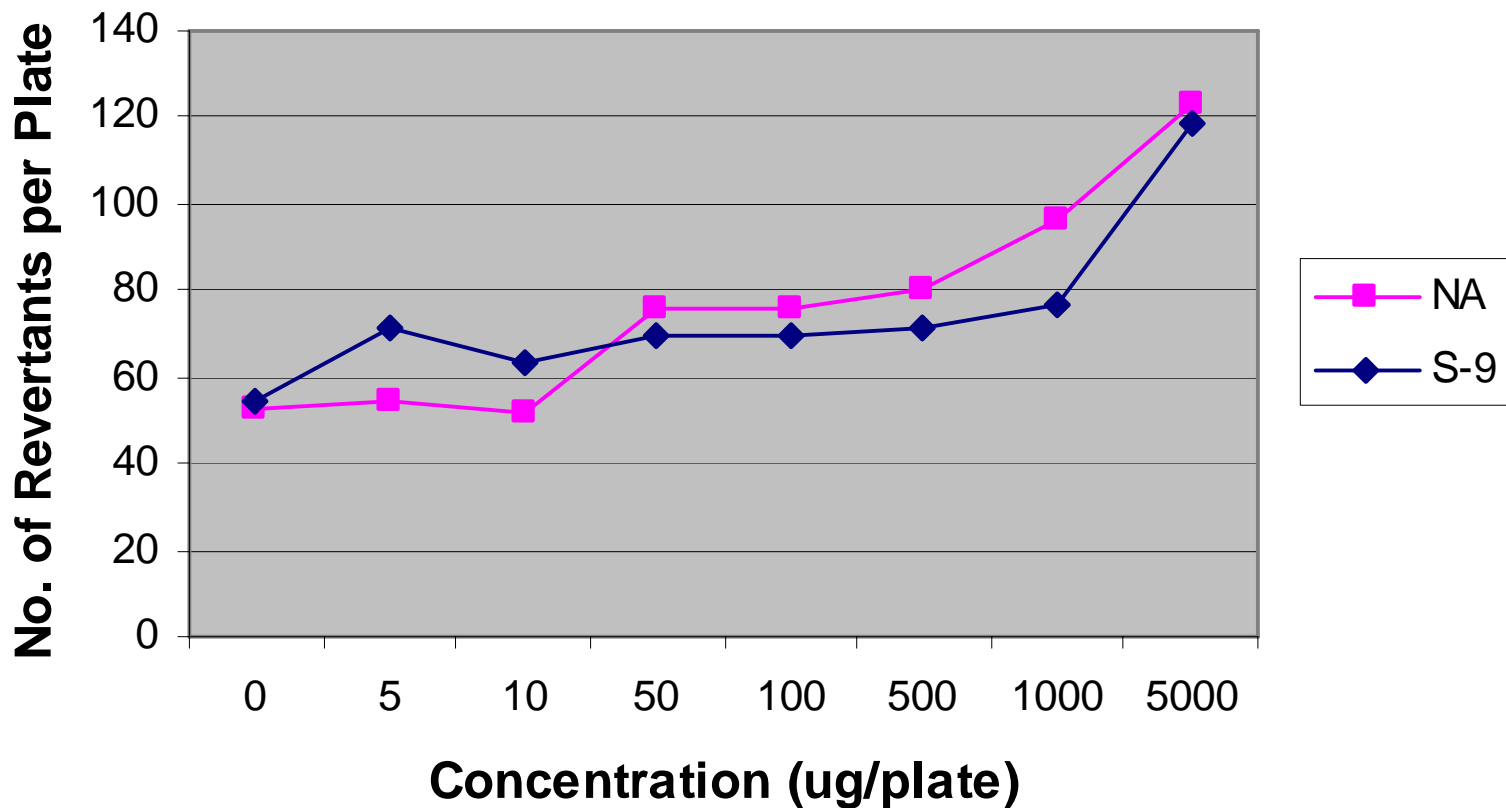
- High and low molecular weight extracts from Japanese *Agaricus blazei* Murill Kyowa mushrooms were tested for genetic toxicity in:
 - *Salmonella typhimurium* (Ames) Assays
 - Chinese Hamster Ovary Chromosome Aberrations Assays
 - Mouse Bone Marrow Micronucleus Assays

日本産アガリクス・ブラゼイ・ムリル(ABMK)を用いた遺伝毒性試験

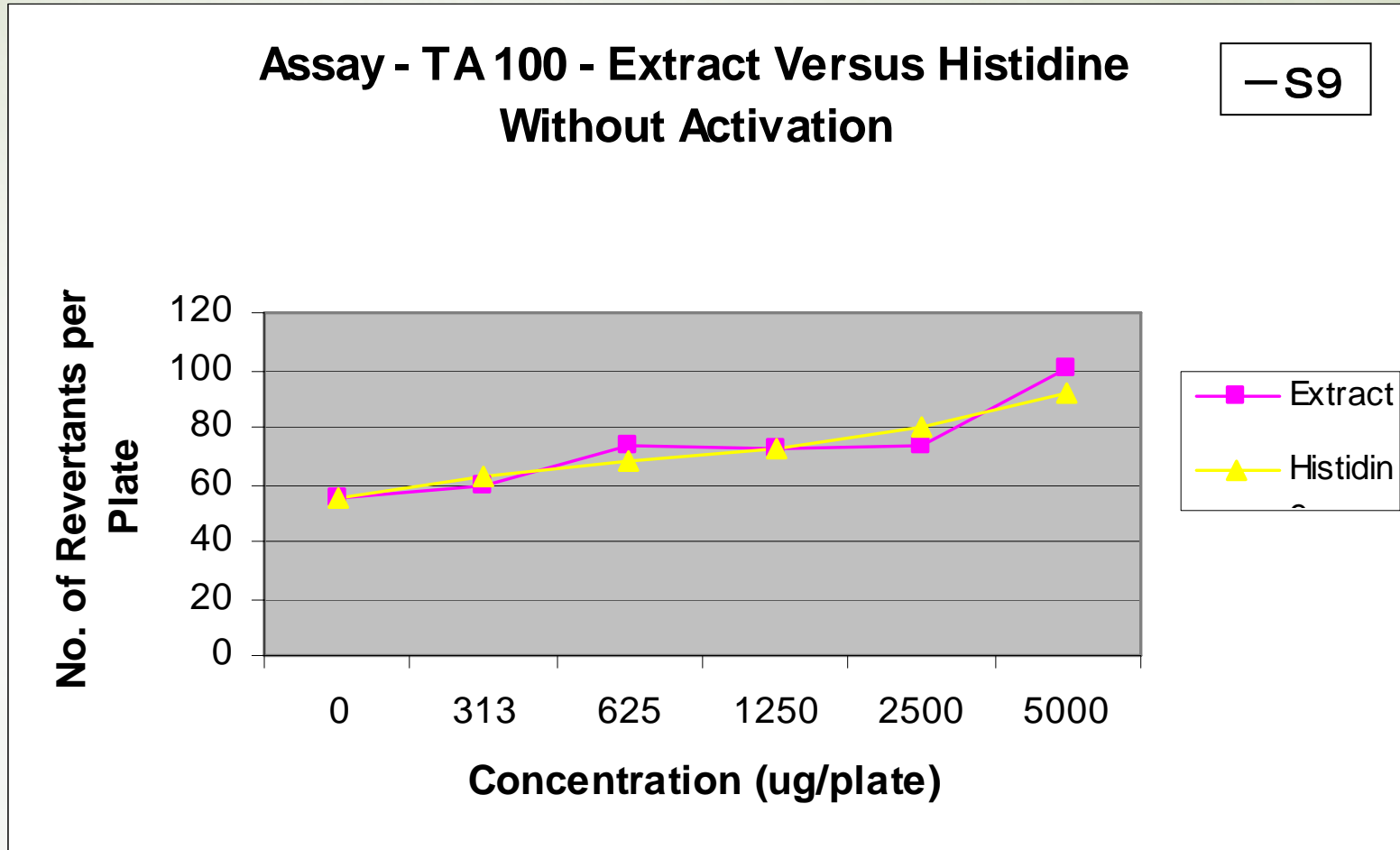
- 復帰突然変異原生試験
- 染色体異常誘発試験
- 小核細胞試験

TA100におけるコロニー形成の増加傾向グラフ

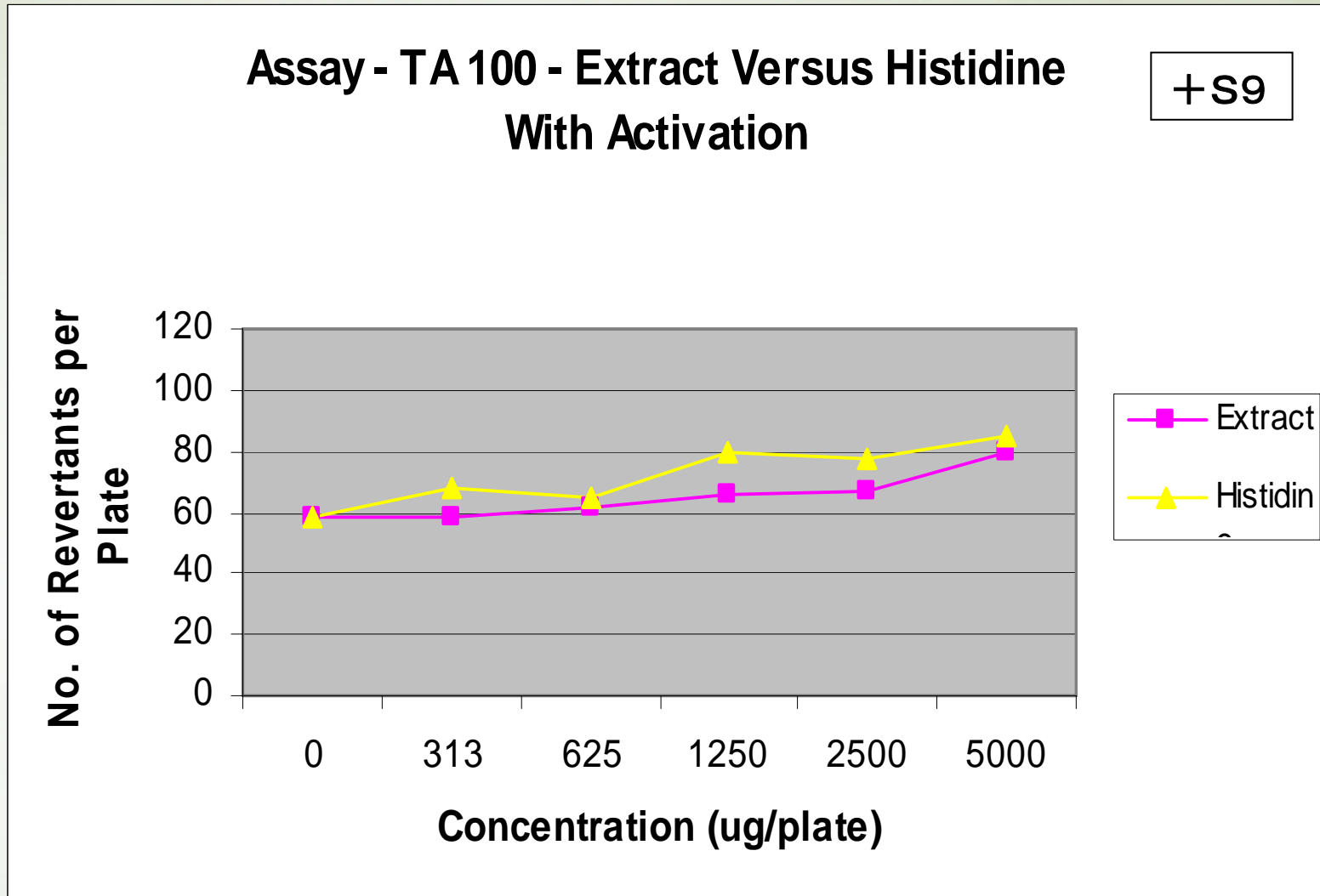
TA 100 - Edible Mushroom Extracts



TA100におけるコロニー形成:ヒスチジンによる疑陽性を示唆



TA100におけるコロニー形成:ヒスチジンによる疑陽性を示唆



Conclusion : 結論

Extraneous factors that can cause increases in revertants must be controlled to prevent false positive results.

Ames tests results was negative with false positive due to the presence of L-histidine in “ABMK”.

天然物を用いたエームス試験ではヒスチジン(アミノ酸)の影響による疑陽性結果を得ることがある。

アガリクス茸・ABMKにおいても、同様の結果から疑陽性となったが、ヒスチジンによる影響であり結果として陰性が確認された。

※染色体異常誘発試験、小核細胞試験においても陰性確認済