

露地栽培アガリクスの機能性に関する研究

研究分野・紹介教授

生化学・大野尚仁教授

氏名

元井 益郎

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 緒論  | 6  |
| 第一章 原核ならびに真核生物システムを用いた露地栽培アガリクスの安全性試験                                       | 17 |
| 序論  | 17 |
| 実験の部  | 17 |
| 結果  | 23 |
| 第一節 細菌を用いる復帰突然変異試験  | 23 |
| 第二節 マウス小核試験   | 29 |
| 第三節 マウスリンフォーマ TK 試験   | 31 |
| 考察  | 32 |
| 第二章 露地栽培アガリクスの機能性臨床研究   | 34 |
| 序論  | 34 |
| 実験の部  | 34 |
| 結果  | 39 |
| 第一節 有効性の評価  | 39 |
| 第二節 安全性の評価  | 46 |
| 考察  | 50 |
| 第三章 ヒト抗 $\beta$ -グルカン抗体価における露地栽培アガリクス服用の効果とがん患者<br>における抗 $\beta$ -グルカン抗体の研究 | 52 |
| 序論  | 52 |
| 実験の部  | 52 |
| 結果  | 54 |
| 第一節 ヒト血清における抗 $\beta$ -グルカン抗体価 抗体反応性の検討                                     | 54 |
| 第二節 がん患者の抗 $\beta$ -グルカン抗体  | 56 |
| 第三節 露地栽培アガリクス服用者における抗体価変化   | 57 |
| 考察  | 61 |
| 総括  | 62 |
| 謝辞  | 65 |
| 研究結果の掲載誌  | 66 |
| 引用文献  | 67 |

## 略語一覧

本文中に使用した略語は以下のとおりである。

|               |  |
|---------------|--|
| 2AA           | : 2-aminoanthracent  |
| 9AA           | : 9-aminoacridine  |
| AF-2          | : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide                                |
| BF            | : 5,6-benzoflavone   |
| CFE           | : number of colonies/number of cells plated [%]                            |
| DMSO          | : dimethylsulfoxide  |
| MMS           | : methylmethanesulphonate  |
| MPCE          | : micronucleated polychromatic erythrocytes                                |
| NADH          | : nicotinamid-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt            |
| NADPH:        | nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate,reduced form, tetrasodium salt |
| NCE           | : normochromatic erythrocytes  |
| NK            | : natural killer   |
| PB            | : phenobarbital  |
| PCE           | : polychromatic erythrocytes   |
| SA            | : sodium azide   |
| THG           | : thymidine, hypoxanthine, and glycine                                     |
| THMG          | : thymidine, hypoxanthine, methotrexate and glycine                        |
| VB            | : vitamine B   |
| Ab            | : antibody   |
| AgCA          | : <i>A. brasiliensis</i> cold alkaline extract                             |
| AgHWE         | : <i>A. brasiliensis</i> hot water extract                                 |
| AgHA          | : <i>A. brasiliensis</i> hot alkaline extract                              |
| ASBG          | : <i>Aspergillus niger</i> solubilized cell wall glucan                    |
| BRM           | : biological response modifier   |
| BSA           | : bovine serum albumin   |
| CSBG          | : <i>Candida albicans</i> solubilized cell wall glucan                     |
| ELISA         | : enzyme-linked immunosorbent assay  |
| GRN           | : Grifolan   |
| IFN- $\gamma$ | : interferon- $\gamma$   |
| IL-12         | : interleukin-12   |

LAM : Laminaran  
OVA : ovalbumin  
SPG : Sonifilan  
TMB : tetramethylbenzidine  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
Y-Man : yeast mannan  
CRD : Curdlan  
Ig : immunoglobulin  
OX-CA : NaClO-oxidized *Candida* cell  
ALT : alanine aminotransferase  
AST : aspartate aminotransferase  
BAS : basophil  
Cre : creatinine  
CRO : contract research organization  
EOS : eosinophil  
ERB : Ethical Review Board  
Glu : glucose  
Hb : hemoglobin  
HbA1c : hemoglobin A1c  
HDL-C : HDL cholesterol  
Ht : hematocrit  
IgG : immunoglobulin G  
IRI : immunoreactive insulin  
LYM : lymphocyte  
MON : monocyte  
NEUT : neutrophil  
PLT : platelet  
QOL : quality of life  
RBC : red blood cell count  
T-Bil : total bilirubin  
TC : total cholesterol  
TG : triglyceride  
TP : total protein  
UN : urea nitrogen  
WBC : white blood cell count  
 $\gamma$ -GTP :  $\gamma$ -glutamyltransferase

Date of efficacy evaluation

6<sup>th</sup> week      6 weeks from the first day of test food intake

12<sup>th</sup> week     12 weeks from the first day of test food intake

## 緒論

### 日本の医療の現状

近年、日本の人口減少と高齢化は、国力と財政にとって大きなマイナス要因となっている。国立社会保障・人口問題研究所 [www.ipss.go.jp/](http://www.ipss.go.jp/) 『日本の将来推計人口（平成24年1月推計）』によれば、出生率が、おおむね1.35前後の出生中位（死亡中位）の推計で、団塊の世代が全て75歳となる2025年には、75歳以上の人口割合は全人口の18.1%となる。2060年には、人口は8674万人にまで減少し、75歳以上の人口割合は全人口の26.9%になると推計される（図1）。また、その高齢化に伴う国民医療費の増加は、財政に大きな影響を及ぼすことは必至である。

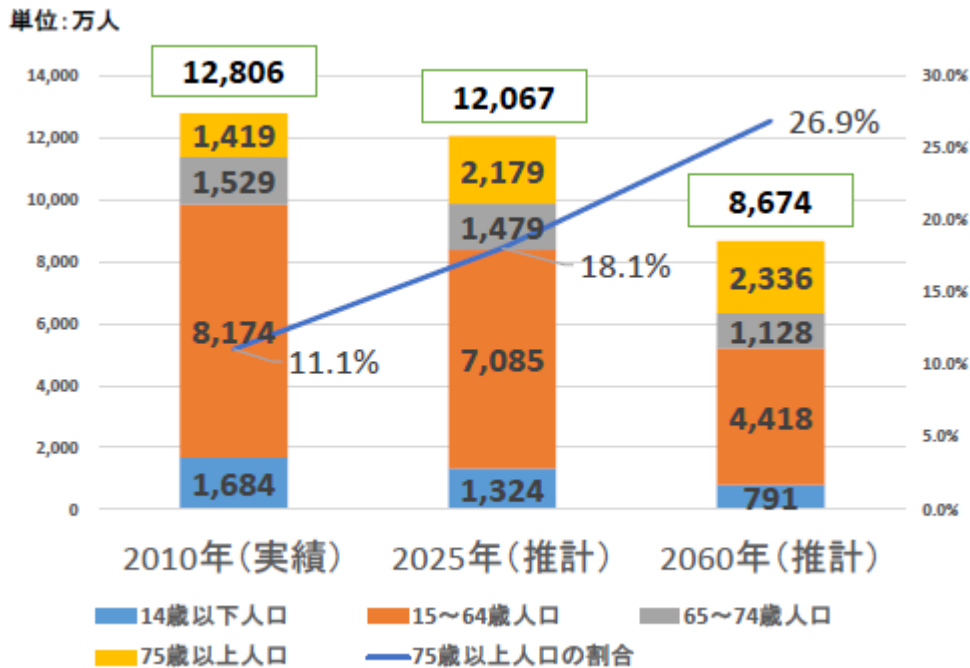


図1 75歳以上の高齢者数の急激な増加

そのような状況の中で、厚生省（当時）は2000年から「健康日本21」<http://www.kenkounippon21.gr.jp/>のビジョンを掲げ、21世紀における国民健康づくり対策を、具体的数値目標を掲げ行ってきた。それは悪性新生物（がん）、高血圧、糖尿病、心疾患、脳血管疾患などの生活習慣病を予防するための行動を国民に促すことにより、壮年期での死亡を減らし、介護なしで生活できる健康寿命（健康上の問題により日常生活が制限されることなく送れる期間＝平均寿命から介護など日常生活に制限のある期間を除いたもの）の延伸及び生活の質の向上を実現することを掲げての施策であ

る。しかし、厚生労働省による平成 25 年度国民医療費の概況([www.mhlw.go.jp](http://www.mhlw.go.jp))によれば、我が国の国民医療費（直接医療費のみで、介護費、健康診断費、分娩費、市販薬購入費等は含まれない）は、年々増加の一途をたどっている。

表1 国民医療費の推移

| 平成25年度 国民医療費の概況を一部改変 |            |           |
|----------------------|------------|-----------|
| 年度                   | 金額         | 国民1人あたり   |
| 昭和40年度               | 1兆1,224億円  | 11,400 円  |
| 昭和50年度               | 6兆4,779億円  | 57,900 円  |
| 昭和60年度               | 16兆0,159億円 | 132,300 円 |
| 平成 2年度               | 20兆6,074億円 | 166,700 円 |
| 平成12年度               | 30兆1,418億円 | 237,500 円 |
| 平成18年度               | 33兆1,276億円 | 259,300 円 |
| 平成19年度               | 34兆1,360億円 | 267,200 円 |
| 平成20年度               | 34兆8,084億円 | 272,600 円 |
| 平成21年度               | 36兆0,067億円 | 282,400 円 |
| 平成22年度               | 37兆4,202億円 | 292,200 円 |
| 平成23年度               | 38兆5,850億円 | 301,900 円 |
| 平成24年度               | 39兆2,117億円 | 307,500 円 |
| 平成25年度               | 40兆0,610億円 | 314,700 円 |

平成 25 年度は 40 兆 610 億円にまで増加し、これは国民一人当たり 314,700 円である（表 1）。また、平成 23 年度患者調査の概況([www.mhlw.go.jp](http://www.mhlw.go.jp))によれば、高血圧、糖尿病、心疾患、悪性新生物（がん）、脳血管疾患のいわゆる生活習慣病で受診中の患者数は、（表 2）のように 1615 万人（糖尿病の疑われる 890 万人、糖尿病の可能性が否定できない 1320 万人は含まず）に達し、その医療費は 11 兆 2700 億円にのぼる。これは国民医療費の 29 %に該当する。このような高齢化社会で国民医療費の増加を防ぐ手立ては、国の財政面から鑑みても喫緊の課題である。

表2 生活習慣病の患者数

| 平成23年度 国民医療費の概況を一部改変 |       |     |
|----------------------|-------|-----|
| 高血圧                  | 907   | 万人  |
| 糖尿病                  | 270   | 万人  |
| （疑われる人               | 890   | 万人） |
| （可能性が否定できない人         | 1,320 | 万人） |
| 心疾患                  | 161   | 万人  |
| 悪性新生物（がん）            | 153   | 万人  |
| 脳血管疾患                | 124   | 万人  |
| 再掲を含む合計              | 1,615 | 万人  |

#### 機能的食品の役割

その急騰する医療費を抑えるため具体的に求められるのは、病気になってからの医療・治療ではなく、未病段階での対策である。

未病とは、言葉自体は中国の最も古い漢方医学古典『黄帝内経素問』（写真 1）や鍼灸等の古典

『難経』などに見られ、字句のままでは単に「未だ病まない」ことであるが、その背景には西洋医学の二元的健康観とは異なる東洋医学の一元的健康観がある。



写真1 黄帝内径素問

すなわち、健康と疾病の状態を二律背反ととらえる（疾病でなければ健康、健康でなければ疾病・・・図2のa）のではなく、図2のbのように健康の程度には高い状態から低い状態まであり、それが低下すると疾病の状態に至るという連続的な見方をするものである。そこで二元的健康観により病気になってからの治療と捉えるのではなく、一元的健康観により「通常の生活で心身を整え、より健康な状態に引き戻す」「未病を治す」ことが大切である。

a



b

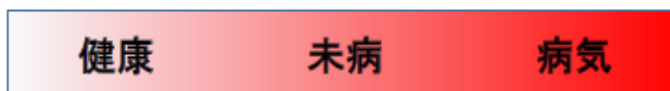


図2 健康、未病、病気の関係

神奈川県ホームページ <http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f531787/> より引用

生活習慣病を例にとると、生活習慣病は、悪化すると命にかかわる重大な問題になったり、介護が必要になったりする。病気になってからの治療ではなく、普段の生活からバランスの良い食事や適度な運動を心がけることが、病気発症のリスクを減らすことになり、結果的に医療費、介護費などの抑制に繋がる。また、この考え方の普及は健康寿命の延伸にも繋がる。逆に、バランスの悪い食生活や運動不足、乱れた生活習慣は、生活習慣病や要介護のリスクが高まり、健康寿命の短縮に繋がることは明らかである。



ビタミンB群のひとつであるパントテン酸の発見者、また、葉酸の名付けの親でもあるロジャー・ウィリアムス（1893-1988）は、自らの著書“The Wonderful World Within You”で、「私たちの体の中には、私たちが食べたもの以外のものから作られるものは何一つ存在しないということは、学問的に真実です。」と、述べている<sup>1)</sup>。この言葉は食生活における栄養学的観点による取捨選択の大切さを端的に伝えている。ところが近年、日本人の食生活が動物性高脂肪食などの欧米型に移行していくにつれ、悪性新生物、循環系の疾病が増加しており<sup>2)</sup>、バランスの良い食生活が改めて大切になってくる。また、それらを整え補う「機能性食品（体調調節機能等第3次機能を有する食品）」の素材の開発と研究も重要になる。

一例を紹介すると、葉酸は、モロヘイヤ、ブロッコリーやほうれん草などの緑黄色野菜に多く含まれ<sup>3)</sup>、女子栄養大学等の研究報告では、Wang Xらの研究により葉酸に脳卒中の予防効果があることが実証されている<sup>4)</sup>。また、Ntaios Gらの研究では、動脈硬化の改善効果があることが立証されている<sup>5)</sup>。これらを受けて埼玉県・坂戸市は、市民に葉酸を含む地元産の野菜を多く食べて貰うことが、健康増進や地域コミュニティ再生、地産地消に役立つとして、2006年に女子栄養大学との協働により、「坂戸市葉酸プロジェクト」[www.city.sakado.lg.jp/](http://www.city.sakado.lg.jp/)が実施された。食品に含まれる葉酸は、比較的体内に吸収されにくいことで知られている。そのため坂戸市では、1日当たり摂取推奨量を厚生労働省推奨水準の240 $\mu$ gではなく、国際水準の400 $\mu$ gと定めた。その「坂戸市葉酸プロジェクト」を核とした栄養、運動指導によって平成18,19年の2年間で22億円の国民健康保険医療費と介護費の節減に成功した<sup>6,7)</sup>。

このように優れた機能性食品の研究・活用は、高騰する国民医療費の低減化に繋がる。また、国が平成27年（2015年）4月より科学的裏付けのある健康食品に対し、機能性表示食品として届出制度を実施した[http://www.caa.go.jp/foods/todoke\\_1-100.html](http://www.caa.go.jp/foods/todoke_1-100.html)のもその期待の表れであろう。

## 機能性食品・アガリクスの役割

予防医学の視点からも機能性食品を活用する時代が到来したのではないかと考えられる。一部の機能性食品は古くから研究されてきた。今回、著者の研究対象のアガリクスもそうである。予防医学の視点、未病を治す機能性食品として、個人の健康状態の回復や増進に繋がり、牽いては国民医療費の抑制に、更に、西洋医学では困難な分野の医療にも貢献出来るのではないかと考える。

アガリクスは、学名を *Agaricus subrufescens*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus rufoteguli*, *Agaricus blazei* などと呼ばれるが、国際薬用キノコ学会では、*Agaricus brasiliensis* と呼ぶことが多い。一般的にブラジル原産の担子菌類で、日本ではヒメ

マツタケやカワリハラタケなどの名称で知られている。

1980 年日本癌学会総会において三重大学医学部より、アガリクスの抗腫瘍活性が報告<sup>8)</sup> されてから、抗がん効果に期待が寄せられ、各方面で精力的に研究が進められ、販売も行われた。2001 年には厚生労働省がん研究助成金による研究班が組織され、「我が国におけるがんの代替療法に関する研究」が行われた。その調査結果は、平成 17 年(2005 年) に学術論文として発表されている<sup>9)</sup>。それによると、がん患者の 44.6 % (1382 名/3100 名) が何らかの補完代替医療を一種類以上行い、そのうち健康食品・サプリメントを使用するとの答えは 96.2 %、気功は 3.8 %、灸 3.7 %、鍼 3.6 % (複数回答可) であった。この健康食品・サプリメントのうち 60.6 % はアガリクスを使用するという回答であり、がんの代替療法として広く受け入れられていた。

しかし、その後、市場規模が拡大して行く過程において、低品質の商品やバイブル本を利用した販売も横行し、まさに市場は玉石混交の状態となった。そして、平成 18 年(2006 年) 2 月厚生労働省より、「アガリクス(カワリハラタケ)を含む製品の安全性に関する食品安全委員会への食品健康影響評価の依頼について」の中間報告書が公表された<sup>10)</sup>。

この報告は、粗悪なアガリクス製品を摂取したヒトに健康被害が発生したことをきっかけとして行われたものであり、ラットを用いた中期多臓器発がん性試験において、実地中の 3 製品のうち 1 製品に発がんプロモーション作用が認められたという内容である。その該当 1 製品は中国産アガリクスを原料としていたのであるが、テレビ、ラジオ、新聞、週刊誌などの多くの報道機関が「アガリクスに発がん作用」「発がん促進作用」などと一斉にセンセーショナルな報道を行った。また、国立がんセンター医師により「アガリクスを使っていたがん患者が重度の肝機能障害を引き起こしたかもしれない(原材料入手先及びメーカー名は不明)」という旨の研究論文<sup>11)</sup> も報告された。先の報道のわずか 1 カ月後の 3 月、厚生労働省は残りの 2 製品について、発がんプロモーション作用は認められなかった<sup>12)</sup>。と発表した。が、報道機関による扱いは皆無に近い状態であり、市場は回復しなかった。

平成 18 年(2006 年) 2 月の厚生労働省の通知の発表以後、事実上の安全宣言である「アガリクスを含む製品について、自治体等から当省に対し、健康被害に関する報告等はないこと(がんの治療を受けている患者において、アガリクスを含む食品を摂取して肝障害が発生した事例も、厚生労働省に報告されていない)等から、これらについてもご承知おき願いたい。」との通知が出されたのは平成 21 年(2009 年) 7 月であった<sup>13)</sup>。それはセンセーショナルな報道以来、3 年 5 カ月後のことであった。

アガリクス事件後の平成 19 年(2007 年) 9 月 23~27 日にスロベニア・リュブリャナで行われた「4<sup>TH</sup> INTERNATIONAL MEDICINAL MUSHROOM CONFERENCE」  
[www.isms.biz/files/Files/feeney\\_rpt1.pdf](http://www.isms.biz/files/Files/feeney_rpt1.pdf) で海外から日本のアガリクス報道を見てい

た国際薬用キノコ学会のソロモン・ワッサー会頭から、アガリクス事件に関して「ただの一企業が起こした問題を、あたかも全体のアガリクスに問題があるとして、今日まで日本は何をやっているのか？おかしい国だ。」との指摘があった。

そして、2006年の報道から2009年の間に、市場でのマーケットサイズは風評被害などで、矢野経済研究所の調査では、2005年対比で1/5まで縮小し、現在に至っている(図3)。それは、一度起きてしまった風評被害は、優れた素材といえども回復には大きなエネルギーを要することを端的に物語っている。

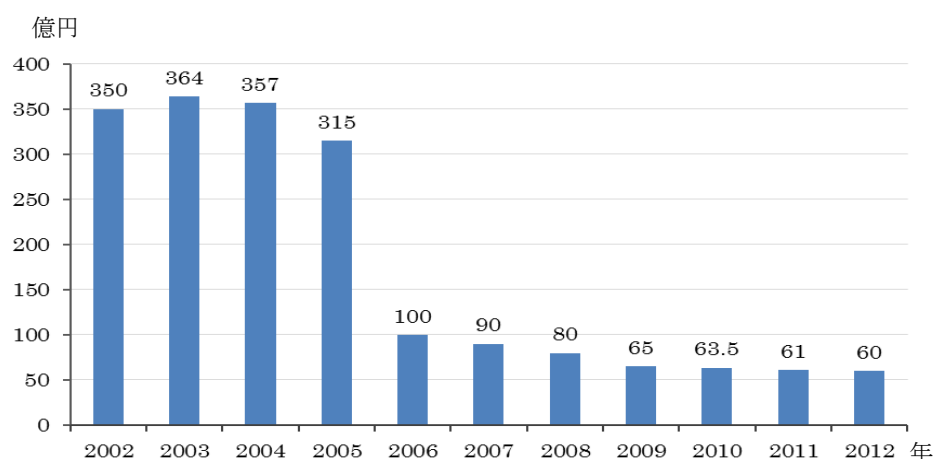


図3 アガリクス市場の推移

### 露地栽培アガリクスの研究

以上のような歴史を有するアガリクスであるが、著者がこの研究に携わるようになったきっかけは、20年ほど前、数名の知人がアガリクスの飲用で、劇的に健康を回復させたことを目の当たりにしたからである。その翌年、ブラジルの栽培地を訪れた。日本と違う広い大地、強い陽射し、清らかな水などの自然環境(写真2)、で大きく生育したアガリクス(写真3)、の栽培方法、製造工程をつぶさに視察した。そして、その乾燥工程が60℃以下で10~12時間掛けること、また、ブラジルの家庭では、健康増進のために冷水抽出エキスを食事とともに常用していたことである。その関与成分などに強い興味を覚え、研究心を強くした。その後、今日まで、途中の日本の風評被害など世の風潮に左右されることなく、年1~2回、通算30数回、栽培地の状況やトレーサビリティの状況を知るためブラジルを訪問、露地栽培アガリクスの機能性研究に携わって来た。



写真2 農場の自然環境 (ブラジル)



写真3 露地栽培アガリクス (ブラジル)

国立健康・栄養研究所 [www.nih.go.jp/eiken/](http://www.nih.go.jp/eiken/)のホームページ[「健康食品」の素材情報データベース]の素材の概要欄でアガリクスは、「菌株、栽培条件や産地により、その特性や含有成分が異なる。」と記述されている。



写真4 ハウス栽培施設 (ブラジル)



写真5 ハウス栽培アガリクス (ブラジル)



写真6 タンク培養装置 (日本)

現在、アガリクスは、子実体を露地栽培する方法、同じく子実体を光の入らない暗い環境下でハウス栽培 (写真4、5) する方法と、菌糸体をタンク培養 (写真6) する方法がある。著者研究対象のアガリクスは露地栽培で、菌株: King・Agaricus 21 (以下 KA21

株) を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託(寄託番号 FERM P-17695)し、それを使いブラジルで栽培されている。ハウス栽培ものに比べ、大きな形態をしている(写真7)。また、その乾燥100g中の栄養素は、表3に示すとおりである。



写真7

左がハウス栽培 右は露地栽培(ともにブラジル産)

厚生労働省の栄養表示基準制度で、含有量が基準値を超え、「高、多、豊富」などの高い旨の強調表示のできる栄養素は、現在、21項目規定されている。そのうち、露地栽培アガリクスは15項目が基準値を超え強調表示が可能な栄養素を含んでいる(表3)。

また、タンパク質を構成するアミノ酸の含有量は図4のとおりであり、多量のビタミンDも含有している。同じ菌株を光の入らない暗い条件下にハウス栽培したところビタミンDはほとんど含まれなかったことから太陽光によって誘導されたものと考えられる(図5)。

表3 露地栽培アガリクスの栄養成分分析

「高い旨の表示」欄の栄養素は、栄養表示制度で強調表示のできる21項目の栄養素、\*印項目は、露地栽培アガリクスが、「高い旨の表示」の基準値を超えている栄養素、乾燥100g中、(日本食品分析センター調べ：分析試験成績書第14032685001号)

| 栄養素の働き                     |                     | 含有量                    |         | 高い旨の表示    |          |
|----------------------------|---------------------|------------------------|---------|-----------|----------|
| エネルギー                      |                     | 179 kcal               |         |           |          |
| たんぱく質                      | 生命の源をつくる            | 38.1 g                 | *       | 16.20 g   |          |
| 脂質                         | 活力を養う               | 2.8 g                  |         |           |          |
| 糖質                         | 燃料の働きをする            | 25.8 g                 |         |           |          |
| 食物繊維                       | 整腸作用、便秘促進、動脈硬化の予防   | 19.3 g                 | *       | 6.00 g    |          |
| ナトリウム                      | 血圧調整、他のミネラル溶解を促進    | 9.1 mg                 |         |           |          |
| カルシウム                      | 骨や歯を形成、神経の興奮を抑制     | 23.0 mg                |         | 204.00 mg |          |
| 鉄                          | 赤血球のヘモグロビンの主成分      | 11.2 mg                | *       | 2.04 mg   |          |
| カリウム                       | 血圧や心筋収縮などの調節、高血圧予防  | 2810 mg                | *       | 840.00 mg |          |
| リン                         | カルシウムと結合し、骨や歯の形成    | 1030 mg                |         |           |          |
| マグネシウム                     | 酵素を活性化、循環器系の働きを助ける  | 97.9 mg                | *       | 96.00 mg  |          |
| 亜鉛                         | 発育促進、味覚、臭覚を正常化      | 24.4 mg                | *       | 2.64 mg   |          |
| 銅                          | 鉄の利用を助け貧血を予防        | 13.0 mg                | *       | 0.27 mg   |          |
| マンガン                       | 糖質、脂質の代謝促進、骨形成の維持   | 0.72 mg                |         |           |          |
| ヨウ素                        | 甲状腺ホルモンの正常化に関与      | 0                      |         |           |          |
| セレン                        | 過酸化脂質を分解する抗酸化酵素     | 42 μg                  |         |           |          |
| 総クロム                       | 糖・脂質の代謝やインスリンの働きを強化 | 0                      |         |           |          |
| ビタミンA(総カロチン)               | 皮膚や粘膜を保護、免疫機能を維持    | 0                      |         | 231.00 μg |          |
| ビ<br>タ<br>ミ<br>ン<br>B<br>群 | ビタミンB1(サイアミン)       | 消化機能と神経の働きを助ける         | 0.94 mg | *         | 0.36 mg  |
|                            | ビタミンB2(リボフラビン)      | 発育促進、過酸化脂質の害を予防        | 3.20 mg | *         | 0.42 mg  |
|                            | ビタミンB6              | タンパク質をつくるビタミン          | 0.75 mg | *         | 0.39 mg  |
|                            | ビタミンB12             | 葉酸と働きあって赤血球を作り出す       | 0.18 μg |           | 0.72 μg  |
|                            | ナイアシン               | 皮膚と精神のビタミン、二日酔い予防、血行改善 | 43.2 mg | *         | 3.90 mg  |
|                            | パントテン酸              | 抗ストレス、副腎の働きを助ける        | 23.5 mg | *         | 1.44 mg  |
|                            | 葉酸                  | 赤血球や細胞の新生を促進、貧血予防      | 290 μg  | *         | 72.00 μg |
|                            | ビオチン                | 髪や皮膚の健康を保ち健康な肌を作る      | 169 μg  | *         | 15.00 μg |
| 総ビタミンC(総アスコルビン酸)           | 活性酸素を低下、免疫機能強化      | 0                      |         | 30.00 mg  |          |
| ビタミンD                      | カルシウムの働きを助け、骨や歯をつくる | 60.6 μg                | *       | 1.65 μg   |          |
| ビタミンE(総トコフェロール)            | 活性酸素を低下、免疫機能強化      | 0                      |         | 1.89 mg   |          |
| ビタミンK1(フィロキノン)             | 出血時に血液を凝固、骨を強化      | 0                      |         | 45.00 μg  |          |

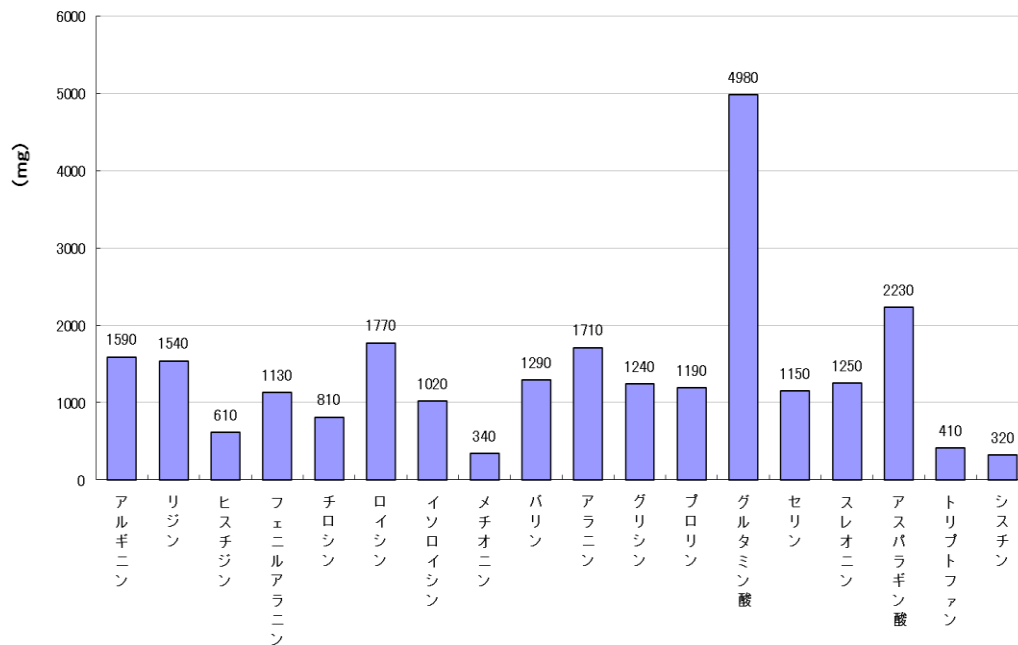


図 4 露地栽培アガリクスのアミノ酸含有量 (乾燥 100 g 中)、  
(日本食品分析センター調べ：分析試験成績書第 14032685001 号)

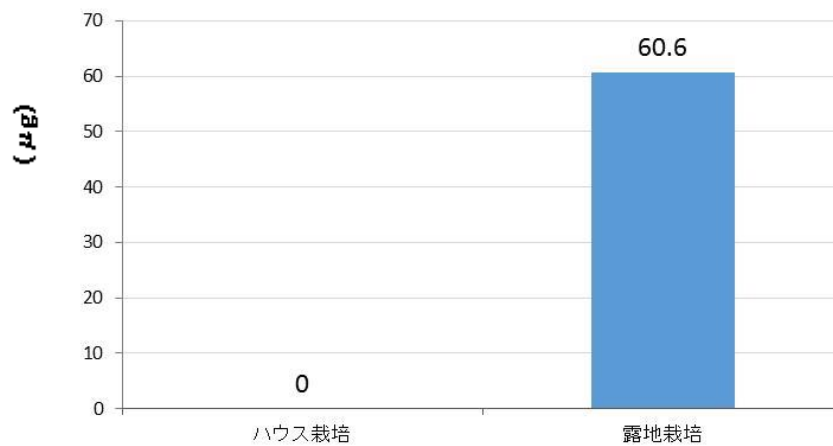
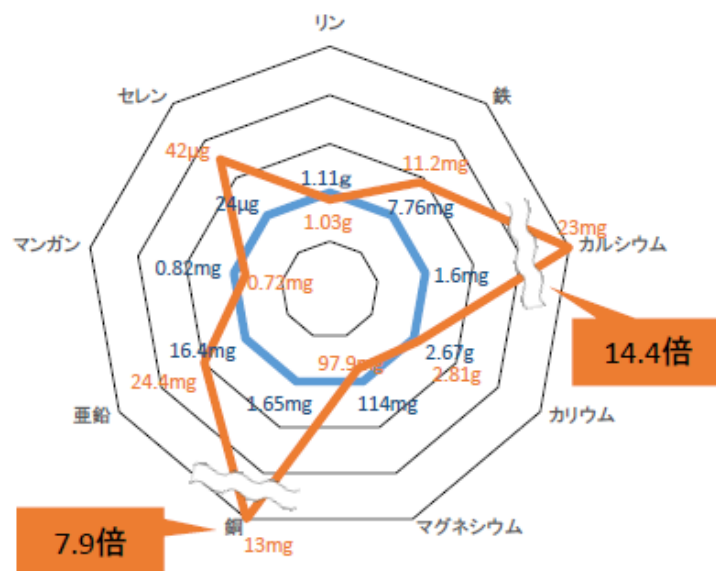


図 5 アガリクス (同じ KA21 菌株使用) の栽培方法の違いによるビタミンD含有量  
(乾燥 100 g 中)、(日本食品分析センター調べ：分析試験成績書番号第 13041417001 号、  
第 14032685001 号)

一方、ミネラルについても図 6 に示すように、銅やカルシウムなどを多量に含んでおり、菌株、栽培条件や産地によって含有成分は大きく異なりその特性は違っている。

また、動物実験でもハウス栽培アガリクスと露地栽培アガリクスでは抗酸化作用、肝臓の保護作用<sup>14)</sup>も著しく異なることを明らかにしている。

このように、露地栽培アガリクスは、機能性食品としての可能性が高く、これまでに、糖尿抑制効果<sup>15,16)</sup>、NK細胞活性化効果、抗メタボリック症候群効果<sup>17)</sup>、循環器機能改善効果<sup>18)</sup>、β-グルカンによる抗腫瘍効果<sup>19)</sup>、などが報告されている。



— 日本産アガリクス      — 露地栽培アガリクス (ブラジル)

図6 国産ハウス栽培アガリクスとブラジル露地栽培アガリクスの産地の違いによるミネラル成分の比較 (乾燥 100 g 中)

日本食品分析センター調べ(分析試験成績書第 11111956001 号、第 14032685001 号)

本研究は、アガリクスは、2006 年の厚生労働省の「ラットを用いた中期多臓器発がん性試験において、実施中の 3 製品のうち 1 製品に発がんプロモーション作用が認められた (その後、残りの 2 製品は認められなかった)」との発表を受けたこと、また、「菌株、栽培条件、産地により特性や含有成分が異なる」と、国立健康・栄養研究所が指摘するように、露地栽培アガリクスの安全性を評価することが重要と考え、*in vitro*、*in vivo* からその安全性を検討した。次に未病の観点も含み、ヒトの臨床研究で、今まで知見の得られていなかった主観的・生理的評価を行った。更に、機能性食品の機能を検証するために、主要構成成分であるβ-グルカンに対する抗体価について、ヒト抗β-グルカン抗体価における露地栽培アガリクス服用の効果を検証した。

本論文は、第一章「原核ならびに真核生物システムを用いた露地栽培アガリクスの安全性試験」、第二章「露地栽培アガリクスの機能性臨床研究」、第三章「ヒト抗β-グルカン抗体価における露地栽培アガリクス服用の効果とがん患者における抗β-グルカン抗体の研究」により構成されている。



## 第一章 原核ならびに真核生物システムを用いた露地栽培アガリクスの安全性試験

### 序論

1965年ブラジル原産のアガリクスが日本に持ち込まれ、その後の1980年日本癌学会総会において、三重大学医学部よりアガリクスの抗腫瘍活性が報告<sup>8)</sup>されると、その抗がん効果に期待が寄せられ、各方面で栽培方法から研究、販売まで精力的にその活動が行われた。しかし、2006年、ラットを用いた中期多臓器発がん性試験において3製品のうち中国産アガリクスを原料とした1製品に発がんプロモーション作用が認められた(その後、他の2製品は認められなかった)、との厚生労働省よりの発表が報道機関に大きく報道されたことにより、結果的にただ1社の製品で全てのアガリクス製品の安全性が疑問視される結果となった。

アガリクスは、食品の3次機能として、生体防御や疾病予防などに期待の高い食品である。微生物は菌株、栽培条件や産地により、特性や含有成分が変化する可能性があるため、本研究では食用として既に用いられている *A. brasiliensis* の安全性について、汎用されている変異原性試験(復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験)ならびに遺伝毒性試験(小核試験)を行い評価した。

尚、この試験の組み合わせ方法は、遺伝子の変化に基づく発がん性のリスク評価の精度向上を目的とした平成24年の厚生労働省の「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス<sup>20)</sup>」と合致するものである。

### 第一章 実験の部

#### 1. 被験物質

ブラジルにて露地栽培された *Agaricus brasiliensis* KA21 株子実体(以下、*A. brasiliensis* と略)の乾燥粉末を用いた。使用時まで冷蔵で保管した。

#### 2. 細菌を用いる復帰突然変異試験(エームス試験, Ames test)

##### 2.1. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調整法は、Table 1-1 に示した。

| Name                                      | Abbreviation | Lot no.(purchase date)          | Manufacturer          | Purity             |
|---|--------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|
| 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide | AF-2         | PKE1831<br>(April 18, 2006)     | Wako Pure<br>Chemical | 99.5%              |
| Sodium azide                              | SA           | LTQ5118<br>(April 18, 2006)     | Wako Pure<br>Chemical | 99.7%              |
| 9-Aminoacridine                           | 9AA          | A0176874001<br>(April 25, 2006) | Acros Organics        | 97.6% or<br>higher |
| 2-Aminoanthracene                         | 2AA          | EWL3616<br>(April 18, 2006)     | Wako Pure<br>Chemical | 95.8%              |

AF-2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド（DMSO：和光純薬工業）に、SA は日局注射用水（大塚製薬工業）に溶解し、所定の濃度に調整したのち、冷凍保存（設定温度：-20℃）し、調整後 6 か月以内に用時に解凍して用いた。

## 2.2. 検定菌

試験には、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いた。*S. typhimurium* 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異、*E. coli* WP2uvrA 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。検定菌は冷凍保存（設定温度：-80℃）したものを用いた。冷凍保存菌は、液体培地にて 37℃で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加え、急速凍結して調製し、試験に用いた。

## 2.3. 試験材料

### 2.3.1. 最少グルコース寒天平版培地

極東製薬工業で製造した最少グルコース寒天平版培地を用いた。培地組成は、Table 1-2 に示した。径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めた。

|  |        |
|--|--------|
| Magnesium sulfate heptahydrate             | 0.2 g  |
| Citric acid monohydrate                    | 2 g    |
| Dipotassium hydrogen phosphate             | 10 g   |
| Ammonium phosphate                         | 1.92 g |
| Sodium hydroxide                           | 0.66 g |
| Glucose                                    | 20 g   |
| Taiyo-agar (Shimizu Shokuhin Kaisha, Ltd.) | 15 g   |

| Table 1-3 Composition of Top Ager     |            |
|---------------------------------------|------------|
| (A) Bacto ager(Becton Dickinson CO.)  | 0.6 w/v%   |
| Sodium chloride                       | 0.5 w/v%   |
| (B) For <i>Salmonella typhimurium</i> |            |
| L-histidine                           | 0.5 mmol/L |
| D-biotin                              | 0.5 mmol/L |
| (C) For <i>Escherichia coli</i>       |            |
| L-tryptophan                          | 0.5 mmol/L |

### 2.3.2. トップアガー

水溶液 (A) をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した (B) または (C) を容量比 10 : 1 の割合で混合した。トップアガーの組成は、Table 1-3 に示した。

### 2.3.3. ラット肝臓から調製した S9

キッコーマンで製造した S9 を購入して用いた。Sprague-Dawley 系ラット、雄 7 週齢に、フェノールバルビタール (PB) および 5, 6-ベンゾフラボン (BF) を、1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg を腹腔内投与した。5 日目に致死させて摘出した肝臓を生理食塩液で灌流したのち、3 倍量の 0.15 mol/L 塩化カリウム溶液を加えてホモジナイズし、9000×g で 10 分間遠沈して得た上清画分を冷凍保存(設定温度：-80 °C)し、製造後 6 か月以内に使用した。

### 2.3.4. S9 mix の組成および調製

S9 mix 1mL あたりの組成は、Table 1-4 に示した。用時氷冷下で混合して調整した。

| Table 1-4 Composition and Preparation of S9 mix   |                |                        |
|---|----------------|------------------------|
| Component   | Volume in      | Concentration          |
|   | 1 mL of S9 mix |                        |
| S9  | 0.1 mL         | 10 vol%                |
| 0.2 mol/L Sodium phosphate buffer (pH 7.4)  | 0.5 mL         | 100 $\mu\text{mol/mL}$ |
| Coenzyme solution*  | 0.38 mL        | —                      |
| Potassium chloride  | —              | 33 $\mu\text{mol/mL}$  |
| Glucose-6-phosphate   | —              | 5 $\mu\text{mol/mL}$   |
| NADH  | —              | 4 $\mu\text{mol/mL}$   |
| NADPH   | —              | 4 $\mu\text{mol/mL}$   |
| 0.4 mol/L Magnesium chloride solution   | 0.02 mL        | 8 $\mu\text{mol/mL}$   |
| NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt  |                |                        |
| NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt  |                |                        |
| *Coenzyme solution was prepared by mixing the components listed above. The solution was sterilied by filtration, astored at $-80^{\circ}\text{C}$ , and thawed before use for the test witin 6 months of preparation. |                |                        |

### 2.3.5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、水および DMSO には溶解しないが、水中で良好な懸濁状態が得られることから、溶媒には日局注射用水を用いた。試験に際し、*A. brasiliensis* をガラス容器に取り分けた。加熱時の検討分については、用時にオートクレーブ（ $105^{\circ}\text{C}$ 、1 分間）で加熱した。加熱後、オートクレーブから取り出し、試験に必要な量の被験物質を秤量し、日局注射用水に懸濁して最高容量の被験物質調製液を調製し、以下同溶媒で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製した。

### 2.3.6. 試験菌液の作成

試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2 を 12 mL 入れた L 字型試験管に解凍した菌液を  $12\ \mu\text{L}$  (TA100、TA1535 および TA98)、 $24\ \mu\text{L}$  (TA1537) あるいは  $6\ \mu\text{L}$  (WP2uvrA) 接種し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保冷後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計（型式：UV-120-02、島津製作所）により 660 nm の吸光度を測定して試験菌液の増殖を確認した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。その結果各試験菌液の生菌数は  $1 \times 10^9$  cells/mL 以上であった。

### 2.3.7. 試験の実施方法

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リ

ン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37 °C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37 °C で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス) または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。

平板は各用量につき 2 枚ずつとし、それぞれの平均値を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。上記の方法により、用量設定試験および本試験を実施した。

#### 2.3.8. 試験用量

用量設定試験においては、「遺伝毒性試験ガイドライン」に従って最高用量をすべての検定菌で 5000  $\mu$ g/plate とし、50.0、150、500、1500 および 5000  $\mu$ g/plate の 5 段階の用量を設定した。本試験においては、用量設定試験で生育阻害が認められなかったこと、および、変異コロニー数の増加について、用量依存性あるいは再現性を確認するために、最高用量を 5000  $\mu$ g/plate とし、1000、2000、3000、4000 および 5000  $\mu$ g/plate の 5 段階の容量を設定した。

#### 2.3.9. 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix のみ 0.5 mL を入れ、37 °C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガー (*Salmonella typhimurium* 用) を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37 °C で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。

### 3. マウス小核試験

#### 3.1. 実験動物および飼育条件

クローズドコロニーマウス (ICR/Kw1) 9 週齢の雄を、ニノクスラボサプライから購入し、1 週間以上予備飼育を行い、健康な 10 週齢で使用した。床敷としてホワイトフレック (日本チャールズ・リバー社) を入れた樹脂製ケージに 5~6 匹ずつ収容し、設定温度 24 °C、明暗サイクル 12 時間の飼育室で、実験動物用餌料 MF (オリエンタル酵母工業) と水道水を自由摂取条件で飼育し、動物の群分けは無作為に行った。

### 3.2. 検体の調製と投与方法

#### 3.2.1. 検体

投与検体は所用量を正確に採取後、蒸留水に懸濁 100 mg/mL (1000 mg/kg) とし、検体の投与用量はマウスの体重 kg あたり 10 mL とした。検体は用時調製し、単回強制経口投与を実施した。検体投与から 24 時間および 48 時間後に 5 個体ずつ採取した。

#### 3.2.2. 陰性対照

被験物質の溶媒は蒸留水を使用し、上記と同条件で単回強制経口投与および個体の採取を行った。

#### 3.2.3. 陽性対照

シクロfosファミド(和光純薬)を使用し、10 mg/mL (100 mg/kg) に調製し、被験物質と同条件で単回強制経口投与を実施し、投与から 24 時間後に 5 検体を採取した。

#### 3.2.4. 標本の作製および染色

マウスを安楽死させた後、右側大腿骨を摘出し、大腿骨の両端を切断、骨髓細胞を 0.3mL の生理食塩水 (大塚製薬工場) で洗い出し、エッペンチューブに集め、遠心分離後上清を除き、ウシ胎児血清 0.1 mL を加えて再懸濁した。その細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗末 (各個体につき 2 枚の標本) し、自然乾燥させた後にメタノールで 5 分間固定し、2 %ギムザ溶液で 20 分間染色し、一晚以上自然乾燥させた後にカナダバルサムで封入した。

#### 3.2.5. 試験の実施方法

小核の観察は、マウス 1 個体あたり 2000 個の幼若赤血球 (PCE) を観察し、その中の小核を有する細胞の数を記録した。赤血球をマウス 1 個体あたり 200 個観察し、その中の幼若赤血球の比率を調べて、骨髓細胞の増殖抑制の指標とした。

#### 3.2.6. 検定

有意差検定は、小核の出現頻度について  $X^2$  検定により、陰性対照群と検定投与群および陽性対照群との間で、5 %水準で有意差検定を実施した。赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、陰性対照群と検体投与群および陽性対照群との間で、5 %水準で  $t$  検定を実施した。

### 4. マウスリンフォーマ TK 試験

#### 4.1. 細胞培養

L5178Y TK+/-マウスリンパ種細胞は、突然変異試験で高いクローニング率と低い偶発突然変異頻度を有している。この細胞をフラスコで RPMI 1640 培地に懸濁させ、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で培養した。毎週、TK-変異体を選択するため、THMG (チミジン、ヒポキサンチン、メソトレキサート、グリシン) を含む RPMI 1640 培地中で増殖させ、その後、変異原性試験に使用のため、THG (チミジン、ヒポキサンチン、グリシン) を含む RPMI 1640 培地に交換した。

#### 4.2. 代謝活性

細胞を、先に示されるように S9 mix 存在下および非存在下で被験物質に暴露した。

#### 4.3. 検体及び陽性対照

*A. brasiliensis* を 95 °C で 2 時間熱水抽出を行ったものを検体とし、試験にはリン酸バッファー (PBS) で希釈、ろ過滅菌して用いた。また、最高濃度は 5000  $\mu\text{g/mL}$  とした。DNA 塩基損傷を誘導する薬剤である Methyl methanesulfonate (MMS) を陽性対照として用いた。

#### 4.4. 実施方法

S9 mix 存在下または非存在下、試験物質で刺激した細胞 (各々、 $6 \times 10^6$  細胞数/10 mL に調製した) を、37 °C で 3 時間又は 24 時間培養した。細胞は 2 回の遠心分離で洗浄し、試験物質を除去し、 $3 \times 10^5$  細胞数/mL になるよう溶媒に再懸濁し、37 °C で、2 日間培養した。試験物質の毒性は、コロニー形成効率の減少によって示した。

## 第一章 結果

### 第一節 細菌を用いる復帰突然変異試験

検定菌として、Base-pair substitution type と Frame-shift type を用い、検体は 50.0, 150, 500, 1500 および 5000  $\mu\text{g/plate}$  の 5 段階の容量を設定して容量設定試験を行った (Table 1-5, 1-7)。また、酵素など熱に不安定な成分影響について検討するため、加熱の有無での活性の違いも比較した。その結果、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix 非存在下および存在下ともに、菌の成育阻害は認められなかった。

変異コロニー数は、加熱無の状態では、S9 mix 非存在下の WP2uvrA、S9mix の非存在下、存在下の TA1537 のいずれも 5000  $\mu\text{g/plate}$  の容量で陰性対照値の 2 倍以上となった。また、加熱有の状態下では S9 mix の非存在下の TA1537 において、5000  $\mu\text{g/plate}$  の容量で陰性対照値の 2 倍以上になった。その他の検定菌においても、5000  $\mu\text{g/plate}$  の容量で変異コロニー数に増加傾向が認められた。これらの結果に基づき、本試験における最高用量を 5000  $\mu\text{g/plate}$  とした。変異コロニー数の増加について用量依存性あるいは再現性を確認するために、5 段階の濃度 (1000~5000  $\mu\text{g/plate}$ ) を設定して本試験を行った (Table 1-6, 1-8)。その結果、用いたいずれの検定菌においても S9 mix 非存在下および存在下ともに、菌の生育阻害は認められなかった。変異コロニー数は、加熱無の TA1537 の S9 mix 非存在下において、1000  $\mu\text{g/plate}$  以上で、S9 mix 存在下では 4000  $\mu\text{g/plate}$  以上の容量で、また、WP2uvrA の S9 mix 非存在下において、4000  $\mu\text{g/plate}$  以上の容量で陰性対照値の 2 倍以上となり用量依存性を示した。加熱有の状態では TA1537 の S9 mix 非存在下の 3000  $\mu\text{g/plate}$  以上の用量で、陰性対照値の 2 倍

以上となり、用量依存性を示した。

*A. brasiliensis* には各種の遊離アミノ酸が含まれており (Table1-9)、遊離ヒスチジンは 130 mg/100 g、遊離トリプトファン含有は 70 mg/100 g であるのでこれらのアミノ酸が試験結果に影響を与えた可能性がある。この点を確認するため、WP2uvrA と TA1537 を用いてアミノ酸確認試験を実施した。その結果、被験物質調製液が含まれている条件下では、含まれていない条件下と比較して、最少グルコース寒天平版培地上の菌叢の増加が認められた。細菌を用いる復帰突然変異試験においては、アミノ酸の存在下では変異コロニー数が増加する<sup>21)</sup> ことが知られており、この *A. brasiliensis* は用いた試験系において、非加熱及び加熱条件下の本試験ともに変異コロニー数が増加したが、被験物質中のアミノ酸 (ヒスチジン、トリプトファン) が影響している可能性が示唆された。



Table 1-5 Bacterial reverse mutation test with *A. brasiliensis* (Dose-finding study)

| With/without metabolic activation system | Test substance dose (µg/plate)     | Number of revertant colonies/plate (mean) |        |                 |                  |        |
|--|------------------------------------|---|--------|-----------------|------------------|--------|
|  |                                    | Base-pair substitution type               |        |                 | Frame-shift type |        |
|  |                                    | TA100                                     | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98             | TA1537 |
| S9 mix (-)                               | Negative control                   | 106                                       | 9      | 24              | 24               | 9      |
|  | 50.0 †                             | 125                                       | 15     | 27              | 18               | 10     |
|  | 150 †                              | 118                                       | 11     | 30              | 20               | 9      |
|  | 500 †                              | 141                                       | 10     | 23              | 25               | 11     |
|  | 1500 †                             | 153                                       | 12     | 36              | 28               | 15     |
|  | 5000 †                             | 205                                       | 16     | 77              | 47               | 32     |
| S9 mix (+)                               | Negative control                   | 122                                       | 11     | 29              | 35               | 18     |
|  | 50.0 †                             | 129                                       | 15     | 29              | 34               | 15     |
|  | 150 †                              | 135                                       | 9      | 33              | 26               | 17     |
|  | 500 †                              | 166                                       | 8      | 28              | 33               | 13     |
|  | 1500 †                             | 168                                       | 12     | 36              | 48               | 19     |
|  | 5000 †                             | 221                                       | 21     | 56              | 58               | 40     |
| Positive control                         | Name                               | AF-2                                      | SA     | AF-2            | AF-2             | 9AA    |
|  | No S9mix-requiring Dose (µg/plate) | 0.01                                      | 0.5    | 0.01            | 0.1              | 80     |
|  | Number of colonies/Plate           | 442                                       | 389    | 111             | 478              | 372    |
|  | Name                               | 2AA                                       | 2AA    | 2AA             | 2AA              | 2AA    |
|  | S9mix-requiring Dose (µg/plate)    | 1   | 2      | 10              | 0.5              | 2      |
|  | Number of colonies/Plate           | 943                                       | 313    | 618             | 377              | 219    |

Negative control: Japanese Pharmacopoeia distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine; 2AA: 2-Aminoanthracene

† : Precipitation was observed.

The colony count used the mean of two times of measurements.

Table 1-6 Bacterial reverse mutation test with *A. brasiliensis* (Main test)

| With/without metabolic activation system | Test substance dose (µg/plate)     | Number of revertant colonies/plate (mean) |        |                 |                  |        |
|--|------------------------------------|---|--------|-----------------|------------------|--------|
|  |                                    | Base-pair substitution type               |        |                 | Frame-shift type |        |
|  |                                    | TA100                                     | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98             | TA1537 |
| S9 mix (-)                               | Negative control                   | 118                                       | 14     | 37              | 23               | 7      |
|  | 1000 †                             | 134                                       | 13     | 53              | 24               | 19     |
|  | 2000 †                             | 148                                       | 13     | 50              | 32               | 27     |
|  | 3000 †                             | 172                                       | 20     | 56              | 44               | 23     |
|  | 4000 †                             | 176                                       | 14     | 76              | 32               | 30     |
|  | 5000 †                             | 196                                       | 17     | 75              | 44               | 32     |
| S9 mix (+)                               | Negative control                   | 125                                       | 14     | 37              | 34               | 12     |
|  | 1000 †                             | 159                                       | 15     | 46              | 32               | 17     |
|  | 2000 †                             | 188                                       | 16     | 52              | 39               | 20     |
|  | 3000 †                             | 192                                       | 17     | 44              | 47               | 19     |
|  | 4000 †                             | 221                                       | 19     | 60              | 54               | 31     |
|  | 5000 †                             | 210                                       | 14     | 71              | 56               | 32     |
| Positive control                         | Name                               | AF-2                                      | SA     | AF-2            | AF-2             | 9AA    |
|  | No S9mix-requiring Dose (µg/plate) | 0.01                                      | 0.5    | 0.01            | 0.1              | 80     |
|  | Number of colonies/Plate           | 402                                       | 417    | 114             | 468              | 409    |
|  | Name                               | 2AA                                       | 2AA    | 2AA             | 2AA              | 2AA    |
|  | S9mix-requiring Dose (µg/plate)    | 1   | 2      | 10              | 0.5              | 2      |
|  | Number of colonies/Plate           | 999                                       | 322    | 717             | 414              | 262    |

Negative control: Japanese Pharmacopoeia distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine; 2AA: 2-Aminoanthracene

† : Precipitation was observed.

The colony count used the mean of two times of measurements.

Table 1-7 Bacterial reverse mutation test with *A. brasiliensis* (heated for 1 min at 105°C)  
(Dose-finding study)

| With/without metabolic activation system | Test substance dose (µg/plate)              | Number of revertant colonies/plate (mean) |        |                 |                  |        |
|--|---|---|--------|-----------------|------------------|--------|
|  |   | Base-pair substitution type               |        |                 | Frame-shift type |        |
|  |   | TA100                                     | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98             | TA1537 |
| S9 mix (-)                               | Negative control                            | 115                                       | 13     | 29              | 24               | 14     |
|  | 50.0 †                                      | 132                                       | 13     | 24              | 26               | 10     |
|  | 150 †                                       | 131                                       | 14     | 28              | 25               | 11     |
|  | 500 †                                       | 119                                       | 10     | 25              | 28               | 14     |
|  | 1500 †                                      | 148                                       | 10     | 25              | 30               | 22     |
|  | 5000 †                                      | 174                                       | 13     | 49              | 45               | 38     |
| S9 mix (+)                               | Negative control                            | 122                                       | 12     | 35              | 29               | 20     |
|  | 50.0 †                                      | 133                                       | 13     | 33              | 31               | 15     |
|  | 150 †                                       | 129                                       | 10     | 35              | 34               | 15     |
|  | 500 †                                       | 136                                       | 11     | 32              | 34               | 18     |
|  | 1500 †                                      | 196                                       | 16     | 32              | 39               | 20     |
|  | 5000 †                                      | 210                                       | 19     | 46              | 55               | 31     |
| Positive control                         | Name  | AF-2                                      | SA     | AF-2            | AF-2             | 9AA    |
|  | No S9mix-requiring Dose (µg/plate)          | 0.01                                      | 0.5    | 0.01            | 0.1              | 80     |
|  | No S9mix-requiring Number of colonies/Plate | 489                                       | 485    | 115             | 577              | 444    |
|  | Name  | 2AA                                       | 2AA    | 2AA             | 2AA              | 2AA    |
|  | S9mix-requiring Dose (µg/plate)             | 1   | 2      | 10              | 0.5              | 2      |
|  | S9mix-requiring Number of colonies/Plate    | 1069                                      | 356    | 820             | 445              | 297    |

Negative control: Japanese Pharmacopoeia distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine; 2AA: 2-Aminoanthracene

† : Precipitation was observed.

The colony count used the mean of two times of measurements.

Table 1-8 Bacterial reverse mutation test with *A. brasiliensis* (heated for 1 min at 105°C)  
(Main test)

| With/without metabolic activation system | Test substance dose (µg/plate)     | Number of revertant colonies/plate (mean) |        |                     |                  |        |
|--|------------------------------------|---|--------|---------------------|------------------|--------|
|  |                                    | Base-pair substitution type               |        |                     | Frame-shift type |        |
|  |                                    | TA100                                     | TA1535 | WP2 <sub>uvrA</sub> | TA98             | TA1537 |
| S9 mix (-)                               | Negative control                   | 129                                       | 12     | 32                  | 21               | 9      |
|  | 1000 †                             | 129                                       | 9      | 32                  | 22               | 11     |
|  | 2000 †                             | 145                                       | 13     | 32                  | 30               | 15     |
|  | 3000 †                             | 148                                       | 14     | 30                  | 36               | 23     |
|  | 4000 †                             | 152                                       | 10     | 44                  | 36               | 32     |
|  | 5000 †                             | 166                                       | 11     | 50                  | 35               | 30     |
| S9 mix (+)                               | Negative control                   | 117                                       | 9      | 37                  | 28               | 16     |
|  | 1000 †                             | 147                                       | 10     | 31                  | 36               | 19     |
|  | 2000 †                             | 170                                       | 9      | 31                  | 38               | 13     |
|  | 3000 †                             | 184                                       | 17     | 45                  | 39               | 21     |
|  | 4000 †                             | 192                                       | 15     | 48                  | 53               | 19     |
|  | 5000 †                             | 184                                       | 15     | 51                  | 46               | 26     |
| Positive control                         | Name                               | AF-2                                      | SA     | AF-2                | AF-2             | 9AA    |
|  | No S9mix-requiring Dose (µg/plate) | 0.01                                      | 0.5    | 0.01                | 0.1              | 80     |
|  | Number of colonies/Plate           | 438                                       | 419    | 101                 | 568              | 530    |
|  | Name                               | 2AA                                       | 2AA    | 2AA                 | 2AA              | 2AA    |
|  | S9mix-requiring Dose (µg/plate)    | 1   | 2      | 10                  | 0.5              | 2      |
|  | Number of colonies/Plate           | 1077                                      | 313    | 777                 | 394              | 305    |

Negative control: Japanese Pharmacopoeia distilled water for injection

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine; 2AA: 2-Aminoanthracene

† : Precipitation was observed.

The colony count used the mean of two times of measurements.

Table 1-9 Free amino acid content of *A. brasiliensis*

| Free amino acid | Result (g/100 g) | Method                                 |
|-----------------|------------------|--|
| Arginine        | 0.3              | Automatic analysis of amino acids      |
| Lysine          | 0.23             | Automatic analysis of amino acids      |
| Histidine       | 0.13             | Automatic analysis of amino acids      |
| Phenylalanine   | 0.24             | Automatic analysis of amino acids      |
| Tyrosine        | 0.3              | Automatic analysis of amino acids      |
| Leucine         | 0.29             | Automatic analysis of amino acids      |
| Isoleucine      | 0.15             | Automatic analysis of amino acids      |
| Methionine      | 0.04             | Automatic analysis of amino acids      |
| Valine          | 0.22             | Automatic analysis of amino acids      |
| Alanine         | 0.64             | Automatic analysis of amino acids      |
| Glycine         | 0.15             | Automatic analysis of amino acids      |
| Proline         | 0.29             | Automatic analysis of amino acids      |
| Glutamic acid   | 1.12             | Automatic analysis of amino acids      |
| Serine          | 0.26             | Automatic analysis of amino acids      |
| Threonine       | 0.32             | Automatic analysis of amino acids      |
| Aspartic acid   | 0.2              | Automatic analysis of amino acids      |
| Tryptophan      | 0.07             | High-performance liquid chromatography |
| Cysteine        | 0.11             | Automatic analysis of amino acids      |

## 第二節 マウス小核試験

小核試験の結果は、(TABLE 1-10, 1-11)に示した。陽性対照としてシクロフォスファミドを 100 mg/kg 投与した群における小核の出現頻度は、陰性対照群と比較して有意に増加した。一方、*A. brasiliensis* については、 $\chi^2$  検定による有意差検定の結果、小核の出現頻度は陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった。また、赤血球に占める幼弱赤血球の比率は、いずれの群も陰性対照群との間に有意差はなかった。これらの結果から *A. brasiliensis* 1 mg/kg の投与は、骨髄細胞における小核作用を示さず、遺伝毒性を示さないことが明らかとなった。

Table 1-10 Results of mouse micronucleus test at 24 hours after administration

| Group              | Animal No. | Cell Count |         | Percent PCE | MPCE per 2000 PCE | P Value for MPCE*** |
|--------------------|------------|------------|---------|-------------|-------------------|---------------------|
|                    |            | PCE        | NCE**** |             |                   |                     |
| Control            | 1          | 63         | 137     | 31.5%       | 2                 |                     |
|                    | 2          | 88         | 112     | 44.0%       | 8                 |                     |
|                    | 3          | 74         | 126     | 37.0%       | 4                 |                     |
|                    | 4          | 80         | 120     | 40.0%       | 5                 |                     |
|                    | 5          | 76         | 124     | 38.0%       | 6                 |                     |
|                    | Mean       | 76.2       | 123.8   | 38.1%       | 5                 |                     |
|                    | SD         | 9.12       | 9.12    |             | 2.24              |                     |
| Test (1000mg/kg)   | 1          | 100        | 100     | 50.0%       | 2                 |                     |
|                    | 2          | 83         | 117     | 41.5%       | 1                 |                     |
|                    | 3          | 83         | 117     | 41.5%       | 1                 |                     |
|                    | 4          | 77         | 123     | 38.5%       | 0                 |                     |
|                    | 5          | 96         | 104     | 48.0%       | 1                 |                     |
|                    | Mean       | 87.8       | 112.2   | 43.9%       | 1                 | *                   |
|                    | SD         | 9.73       | 9.73    |             | 0.71              |                     |
| Positive control** | 1          | 70         | 130     | 35.0%       | 13                |                     |
|                    | 2          | 91         | 109     | 45.5%       | 62                |                     |
|                    | 3          | 71         | 129     | 35.5%       | 31                |                     |
|                    | 4          | 79         | 121     | 39.5%       | 28                |                     |
|                    | 5          | 54         | 146     | 27.0%       | 17                |                     |
|                    | Mean       | 73         | 127     | 36.5%       | 30.2              | 0                   |
|                    | SD         | 13.55      | 13.55   |             | 19.28             |                     |

\* Test was not performed if the total value was lower than or equal to the control value.

\*\* Oral administration of 100 mg/kg cyclophosphamide.

\*\*\* P < 0.05 was considered statistically significant.

\*\*\*\* PCE: polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes;  
 MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

Table 1-11 Results of mouse micronucleus test at 48 hours after administration

| Group            | Animal No. | Cell Count |         | Percent PCE | MPCE for 2000 PCE | P Value for MPCE*** |
|------------------|------------|------------|---------|-------------|-------------------|---------------------|
|                  |            | PCE        | NCE**** |             |                   |                     |
| Control          | 1          | 94         | 106     | 47.0%       | 2                 |                     |
|                  | 2          | 77         | 123     | 38.5%       | 3                 |                     |
|                  | 3          | 90         | 110     | 45.0%       | 2                 |                     |
|                  | 4          | 66         | 134     | 33.0%       | 3                 |                     |
|                  | 5          | 95         | 105     | 47.5%       | 1                 |                     |
|                  | Mean       | 84.4       | 115.6   | 42.2%       | 2.2               |                     |
|                  | SD         | 12.54      | 12.54   |             | 0.84              |                     |
| Test (1000mg/kg) | 1          | 100        | 100     | 50.0%       | 2                 |                     |
|                  | 2          | 82         | 118     | 41.0%       | 2                 |                     |
|                  | 3          | 100        | 100     | 50.0%       | 2                 |                     |
|                  | 4          | 77         | 123     | 38.5%       | 2                 |                     |
|                  | 5          | 77         | 123     | 38.5%       | 4                 |                     |
|                  | Mean       | 87.2       | 112.8   | 43.2%       | 2.4               | 0.8344              |
|                  | SD         | 11.86      | 11.86   |             | 0.89              |                     |

\*\* PCE: polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes;

\*\*\* P < 0.05 was considered statistically significant.

\*\*\*\* PCE: polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes;

MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

### 第三節 マウスリンフォーマ TK 試験

本試験において、625, 1250, 2550, 5000  $\mu$ g/mL のそれぞれの検体群とコントロール群の突然変異の頻度を比較した結果、3h の短時間処理法においては代謝活性化系非存在下 (-S9) および存在下 (+S9) とともに有意な増加は見られなかったが、検出感度が高い 24h の長時間 (代謝活性化系非存在下) において僅かに増加の傾向が見られた。しかし、その値は小さく、試験成立の必要条件である自然突然変異頻度の値 ( $200/10^6$ ) を超えていないこと、また、陽性対照の Methyl methanesulfonate (MMS) と比較してもかなり低いことより (Table 1-12)、*A. brasiliensis* は、マウスリンフォーマ試験において遺伝毒性は示さないことが明らかとなった。

Table 1-12 Mutation frequency of *A. brasiliensis* assessed by mouse lymphoma test

| Sample concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | mutation frequency ( $/10^6$ ) |             |              |
|--|--------------------------------|-------------|--------------|
|  | 3h<br>(-S9)                    | 3h<br>(+S9) | 24h<br>(-S9) |
| Control                                      | 128                            | 67          | 87           |
| 625  | 147                            | 77          | 65           |
| 1250   | 139                            | 81          | 62           |
| 2550   | 198                            | 53          | 107          |
| 5000   | 177                            | 69          | 175          |
| MMS  | 618                            | 262         | 736          |

## 第一章 考察

アガリクスは、食品の3次機能として、生体防御や疾病予防などに期待の高い食品である。しかし、菌株、栽培条件や産地により、その特性や含有成分が異なるため<sup>14,22)</sup>、ブラジル露地栽培の *A. brasiliensis* について、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「マウス小核試験」及び「マウスリンフォーマ TK 試験」を行い、安全性を検討した。

「細菌を用いる復帰突然変異試験」では、*A. brasiliensis* を用いた試験系において変異コロニー数は増加したが、被験物質中のアミノ酸（ヒスチジン、トリプトファン）が影響している可能性が示唆された。「マウス小核試験」においては、*t* 検定の結果、赤血球に占める幼弱赤血球の比率は、いずれの群も陰性対照群との間に有意差はないため、骨髄細胞における小核作用を示さず遺伝毒性は認められなかった。「マウスリンフォーマ TK 試験」においても、*A. brasiliensis* は遺伝毒性を示さなかった。以上の *in vitro*、*in vivo* の結果から、*A. brasiliensis* は食品素材として安全性に問題がないことが示された。

また、申請者は劉らとともに、*A. brasiliensis* のヒト健常人の安全性についての共同研究を実施してきた。その試験では、*A. brasiliensis* 100%錠剤を通常量 3000 mg を3カ月間、健常人 13 名に摂取させ、摂取前、摂取後に体重・腹囲・BMI・体脂肪率・内臓脂肪値を測定し、採血を行い、血液生化学的検査を測定した。その結果、体重、腹囲、BMI、体脂肪率の有意な変化は見られず、ほとんどが基準値の範囲で変化し、大きな変化は観察されず、安全性は当該ヒト試験でも確保されている。さらに *A. brasiliensis* を通常量の3倍量 (9000 mg) を長期 (6 カ月) 11 名に摂取させ、摂取前



後の問診による自覚症状、採血による血液生化学検査、肝機能検査、腎機能検査をすることによりさらに詳細に解析した。この条件でも、肝機能検査値（GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP）は摂取前後で有意な変化はなく、尿素窒素、クレアチニン値は正常の範囲であり、腎機能にも影響を与えず、特別な有害事象は認められなかった。また、併せて行った臨床研究では健常人のNK細胞を活性化させること、半健康人の血中コレステロール値、中性脂肪値を適度に下げ、肝機能を調整する効果が認められた<sup>17)</sup>。

本章で得られた「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「マウス小核試験」及び「マウスリンフォーマTK試験」の結果ならびに劉らと行ってきた健常人の安全性についての研究成果は、緒論に示したアガリクス製品に対する安全性に関する情報とは著しく異なり、*A. brasiliensis*が食品として安全であること強く示している。また、同じ食用・薬用茸であっても産地や菌株、栽培方法によって安全性に大きな差が生じることを再確認することができた。我が国では様々な機能性食品が流通しているが、いずれも十分な安全性が確保されていなければならぬため、その管理に関しては販売者側が徹底して検査を行い、利用者に対する責任を果たすべきであろう。

## 第二章 露地栽培アガリクスの機能性臨床研究

### 序論

アガリクスは日本では1975年に人工栽培に成功し、1990年代初めより原料として安定的に流通するようになった健康食品素材である。ブラジルでの食経験に基づく疫学調査にはじまり、その後の国内外での治験データからも「人が本来もつ自然治癒力・免疫力を高めQOL（生活の質）の改善に寄与する」健康食品素材として20年以上にわたり市場を形成してきた。

近年の研究により、ブラジルで自然露地栽培された *A. brasiliensis* は、免疫賦活作用が示唆されている  $\beta$ -グルカン 하우스栽培アガリクスに比べ1.5倍多く含むだけでなく、暗所で栽培されたハウス栽培品にはほとんど含まれないビタミンDを多量に含むことが確認されている。また製品化の過程において低温温風乾燥を行っているためペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼなどの熱に弱い抗酸化酵素が失活していない<sup>22)</sup>ことも明らかとなり、それらの生体機能に対する効果も注目されている。これまでの臨床研究から、*A. brasiliensis*の摂取により、ヒトの体内の免疫機能を賦活する<sup>17)</sup>結果（NK細胞の活性化）などが得られている。しかしながら、*A. brasiliensis*の日常生活における、QOLへの効果に関しては知見が得られていない。

そこで本章では、*A. brasiliensis*を含有する食品の摂取がQOLに与える効果について検証するために、*A. brasiliensis*含有食品を12週間連続摂取させ、日常生活のQOLをアンケート調査し、安全性と有効性を評価することとした。

## 第二章 実験の部

### 1. 研究実施機関

本研究は、日本橋循環器科クリニック（所在地：〒103-0001 東京都中央区）、株式会社ティーティーシー（所在地：〒150-0021 東京都渋谷区）、イーケンコム株式会社（所在地：〒171-0014 東京都豊島区）、株式会社エスアールエル（所在地：〒191-0002 東京都日野市）の協力のもとに実施した。

### 2. 倫理的配慮

#### 2.1. 倫理委員会による承認

本研究は、ヘルシンキ宣言の精神に則り、常に被験者の人権保護に配慮し、疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省告示）に従って実施した。本研究は、日本橋循環器科クリニック試験委員会の審査を受け、その承認を得た後に実施した。（承認

日：平成23年5月24日)

## 2.2. プライバシーおよび個人情報の保護

試験責任医師は、有害事象およびその他試験成績関連データを匿名化し、被験者の氏名や身元が特定される番号、住所等は使用しなかった。加えて、当該試験に係わった者は試験の実施にあたって被験者の個人情報保護に最大限の注意を払った。

## 2.3. 同意の取得

試験責任医師は、試験実施に先立ち、被験者に対して、試験の目的や方法、試験への参加は自分の自由意思で決めることなどを記載した説明文書を交付の上、試験の趣旨および内容を十分説明し、被験者の自由意思に基づく同意を文書で取得した。

## 2. 被験者の選択方法

同意を取得した被験者候補49名に摂取前検査を受診させ、生活習慣アンケート、体調確認、身体測定、理学検査、一般臨床検査（血液）、唾液検査および特殊検査の各検査と使用感アンケートへの記入を実施した。摂取前検査の結果から、唾液中sIgA分泌速度が低く、試験の目的に適した被験者を24名選択し、低用量摂取群（1日3錠）または高用量摂取群（1日5錠）に組入れた。被験者に試験食品および摂取期間中日誌を配布し、試験食品の摂取および摂取期間中日誌の記録を開始させた。試験期間中に試験食品を摂取した時刻と量を日誌に記録させた。被験者に摂取開始から6週後（43日目）に6週目検査および12週後（85日目）に12週目検査のため来院してもらい、体調確認、身体測定、理学検査、唾液検査、特殊検査の各検査および使用感アンケート記入を実施した。

12週目検査には上記検査に追加して、一般臨床検査（血液）も行った。ただし、検査来院予定日の前7日間以内に感冒症状（発熱、喉の痛み、咳、鼻水など）および感染性の下痢症状が発現した場合、自覚症状の消失日から7日後以降に検査日を変更した。各検査来院前日は禁酒し、夜10時頃までに飲食を終え、その後は検査終了まで水またはぬるま湯以外の飲食を禁止した。夜12時頃までに就寝し、十分に睡眠をとることとした。検査当日の朝は自宅で歯磨きを行い、歯磨きの後は水またはぬるま湯以外の飲食および喫煙を禁止し、空腹で来院させた。

## 4. 試験デザイン：オープン試験

4.1. 登録被験者数：24名

4.2. 試験実施期間：2011年5月から2011年11月に実施した。

4.3. 被験者の選択および除外基準：以下の選択基準をすべて満たし、かつ除外基準に抵触しない被験者を登録した。

### 4.3.1. 選択基準

1) 年齢が20歳以上60歳未満の男女

2) 唾液中 sIgA 分泌速度が低めの者（摂取前検査を受診した49名のうち、唾液中sIgA

分泌速度の低い24名を選択した)

#### 4.3.2. 除外基準

- 1) 本試験食品の有効成分 ( $\beta$ -グルカン) を多く含む食品あるいは強化した健康食品を摂取している者
- 2) アレルギー性疾患 (季節性アレルギー性鼻炎 (花粉症)、通年性アレルギー性鼻炎、ぜん息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎) の既往歴を有する者
- 3) 試験に影響がある治療を実施している者
- 4) 昼夜交代制勤務または重量物運搬等の肉体労働に従事している者
- 5) マラソンなどの激しい運動を習慣的に行っている者
- 6) 本試験期間中に実施する各種検査の手順を規定どおりに実施できない者 (唾液の採取など)
- 7) 治療中の疾患を有する者、または治療が必要と判断される者
- 8) 糖尿病、肝疾患、腎疾患、高血圧、虚血性心疾患、耐糖能異常等の重篤な疾患の既往歴を有する者
- 9) 試験食品によりアレルギーを引き起こす恐れのある者
- 10) 事前の臨床検査値、理学検査値から、被験者として不適と判断される者
- 11) 試験期間中に妊娠を希望する者、または現在妊娠中、授乳中である者
- 12) 本試験への参加同意取得時に他の臨床試験に参加している者
- 13) その他、試験責任医師が被験者として不適当と判断した者

#### 4.3.3. 試験食品 : *A. brasiliensis* 子実体含有食品

#### 4.3.4. 試験食品の組成

本試験で使用した試験食品の組成、関与成分含量等をTable 2-1に示す。

Table 2-1 Test Food Composition, Ingredients and Other Related Information

|                 |   | Test food |   |
|-----------------|---|-----------|---|
| Composition,etc | Raw material  |           | <i>Agaricus brasiliensis</i> KA21   |
|                 | Form  |           | Tablets,PTP packaging   |
|                 | Active ingredient   |           | $\beta$ -glucan   |
|                 | Date of manufacture   |           | April 22,2011   |
|                 | Expiration date   |           | April 22,2013   |
|                 | Storage method  |           | Store at room temperature; avoid direct sunlight,<br>high temperature,and high humidity |
|                 | Test food provider  |           | Terra Forte Co,Ltd  |
| Nutrient        | $\beta$ -glucan   | *1 (g)    | 12.4  |
| Composition     | Energy  | (kcal)    | 179   |
| (per 100g)      | Protein   | *2 (g)    | 39.8  |
|                 | Lipid   | *3 (g)    | 2.9   |
|                 | Carbohydrate  | *4 (g)    | 43.1  |
|                 | Sodium  | *5 (mg)   | 3.4   |
| Assessed by     | *1:enzymatic method , *2:Kjeldahl method(total nitrogen x6.25),<br>*3:acid hydrolysis method,*4:100-(moisture+protein+lipid+ash),*5:atomic absorption spectrophotometry |           |   |

#### 4. 3. 5. 摂取量および摂取期間

試験食品は、1日あたりの摂取量3錠（900mg）または5錠（1500mg）を12週間連日摂取とした。摂取する時間帯は朝食後とし、摂取し忘れた場合はその日のうちに摂取することとした。但し、検査当日は検査終了後まで摂取させなかった。摂取期間は12週間（84日間）とした。

#### 4. 3. 6. 関与成分摂取量の設定根拠

過去のアンケート調査において試験食品800mgの摂取で水虫症状の改善がみられている。また、過去に試験依頼者が実施した過剰摂取試験で、1日30錠（9g）までの安全性が確認されていることから、本試験の摂取量を設定した。

#### 4. 3. 7. 主観的使用感アンケート（QOLアンケート）

使用感アンケートは34の質問項目（Table 2-2）で構成され、肌の状態、排便の状態、髪の毛の状態、体の状態および睡眠の習慣について回答させた。肌の状態、排便の状態、髪の毛の状態および体の状態については、非常に悪い状態（1点）から非常に良い状態（5点）までの5段階で回答させた。睡眠の習慣については、ピッツバーグ睡眠質問票（日本語

版)の質問項目と目覚めのよさについて、非常に良い状態(0点)から非常に悪い状態(3点)までの4段階で回答させた<sup>23-25)</sup>。ピッツバーグ睡眠質問票(日本語版)の質問項目は、ピッツバーグ睡眠質問票(日本語版)の定法に従い、合計スコアと睡眠の質、入眠時間、睡眠時間、睡眠効率、睡眠困難、眠剤の使用、日中覚醒困難の下位尺度スコアを計算した。

Table 2-2 アンケート項目と質問内容

| 項目    | 質問内容   |
|-------|--|
| 肌の状態  | 最近1週間の肌のハリや弾力、最近1週間の肌のトラブル、最近1週間の水虫の状態   |
| 排便の状態 | 最近1週間のお通じ、最近1週間の便の状態・性状  |
| 髪の状態  | 最近1週間の髪の毛のコシ、最近1週間の抜け毛の量、最近1週間の白髪の量  |
| 体の状態  | 最近1週間の身体の疲れ(疲労感・倦怠感)、最近1週間の目の疲れ(眼精疲労)、最近1週間の肩こり、最近1週間のストレス、最近1週間の手足の冷え、最近1週間のドライアイの状態、最近1ヶ月の(風邪など)体調                                   |
| 睡眠の習慣 | ピッツバーグ睡眠質問票質問項目<br>過去1か月の就寝時間、過去1か月の入眠時間、過去1か月の起床時間、過去1か月の睡眠時間、過去1か月の睡眠困難頻度と理由、過去1か月の睡眠の質、過去1か月の睡眠剤の使用頻度、過去1か月の社会活動中の覚醒困難頻度、過去1か月の意欲維持 |
|       | 過去1か月の目覚めのよさ   |

#### 4.3.8. 有効性解析対象者

所定の試験スケジュールおよび試験内容を全て終了した被験者のうち、以下の解析対象除外基準に該当する被験者を除外した者とした。

#### 4.3.9. 解析対象除外基準

- 1) 日誌記録の欠損、検体採取手順の不遵守など検査結果の信頼性を損なう行為が顕著に見られる場合
- 2) 除外基準に該当していたことや、制限事項を遵守できないことが試験組み入れ後に明らかになった場合

#### 4.3.10. 安全性解析対象者

- 4.3.10.1. 有害事象：試験食品を一度でも摂取した被験者全員とした。
- 4.3.10.2. 測定値：検査値の解析対象者は、有効性解析対象者と同一とした。
- 4.3.11. 評価方法
  - 4.3.11.1. 有効性評価項目：使用感アンケート
  - 4.3.11.2. 有効性評価方法：使用感アンケートについては、摂取後各時点の値の摂取前値からの変化をWilcoxonの符号付き順位検定を用いて評価した。
  - 4.3.11.3. 安全性評価項目：有害事象（自覚症状、臨床検査値、身体測定値、理学検査値）
  - 4.3.11.4. 安全性評価方法：有害事象については、試験食品との因果関係および関連性の有無を試験責任医師が判断した。臨床検査、計測値の数値データは、個々の被験者の検査値を試験実施医療機関で定める基準範囲（臨床検査値の場合は検査機関の基準範囲）を参考にして、試験責任医師が評価した。また、各検査項目について摂取前値と摂取12週目検査の値を1標本 $t$ 検定を用いて評価した。
- 4.3.12. 表示および有意水準：各検査値は平均値±標準偏差で示し、検定の有意水準はいずれも両側5%とした。

## 第二章 結果

### 第一節 有効性の評価

QOLは使用感アンケート調査を行い評価した。質問項目は実験の部Table 2-2 に示したとおり、肌の状態、排便の状態、髪の状態、体の状態および睡眠の習慣について34項目を設定した。肌の状態、排便の状態、髪の状態および体の状態については、非常に悪い状態（1点）から非常に良い状態（5点）までの5段階で回答させた。睡眠の習慣については、ピッツバーグ睡眠質問票（日本語版）の質問項目と目覚めのよさについて、非常に良い状態（0点）から非常に悪い状態（3点）までの4段階で回答させた。ピッツバーグ睡眠質問票（日本語版）の質問項目は、ピッツバーグ睡眠質問票（日本語版）の定法に従い、合計スコアと睡眠の質、入眠時間、睡眠時間、睡眠効率、睡眠困難、眠剤の使用、日中覚醒困難の下位尺度スコアを計算した。

男性12名、女性12名の計24名を登録し、低用量群と高用量群に各12名ずつ（低用量群：男性6名、女性6名、高用量群：男性6名、女性6名）組入れ、試験食品を摂取させた（Table 2-1）。

なお、一部の被験者では、摂取前の理学検査値または臨床検査値に基準範囲外の項目が見られたが、責任医師が試験参加に問題がない事を確認した後、試験に組み入れた。

#### 試験経過

摂取開始後、同意撤回による脱落が2名（ID. 808、女性、43日目、高用量群、ID. 840、

女性、45日目、低用量群) あった。また、ID. 812 は高用量群に組入れたが、1日3錠しか摂取していなかったため、低用量群として取り扱った。この他に試験実施計画書からの逸脱、禁止食品の摂取はなかった。また、試験食品の摂取率は、ID. 803 が91.7 %、ID. 836 が91.8 %、ID. 812 が98.8 %であり、それ以外の19名は100%であった。その結果、有効性解析対象者数は22名となった。なお、ID. 849 は摂取78日目から85日目に感冒症状が発現したため、12週目検査を7日間延期し、92日目に実施した。

Table 2-3 Background Features of Subjects in Efficacy analysis

| Item                        |        | Unit     | Low-dose (L) group | High-dose (H) group |
|-----------------------------|--------|----------|--------------------|---------------------|
| Number of subjects          |        |          | 12                 | 10                  |
| Sex                         | Male   | (people) | 7                  | 5                   |
|                             | Female |          | 5                  | 5                   |
| Age                         |        | (years)  | 42.8±9.9           | 43.2±10.7           |
| Salivary IgA secretion rate |        | (µg/min) | 36.57±10.53        | 36.02±9.41          |

#### 解析対象者の背景因子

Table 2-3 に有効性解析対象者の背景因子として、年齢、性別、摂取前検査時の唾液中sIgA分泌速度を示した。

Table 2-4、2-5に使用感アンケート結果を示した。抜け毛の量のスコアは、高用量群において摂取前の $2.7 \pm 0.5$  から6週目に $3.2 \pm 0.4$ 、12週目に $3.2 \pm 0.6$  とそれぞれ有意に増加した (Figure 2-1)。白髪の量のスコアは高用量群において、摂取前の $2.4 \pm 1.1$  から6週目に $3.2 \pm 0.7$ 、12週目に $3.2 \pm 1.0$  とそれぞれ有意に増加した (Figure 2-2)。疲労感・倦怠感のスコアは、低用量群において摂取前の $2.1 \pm 0.9$  から、12週目に $2.9 \pm 0.8$  と有意に増加した。高用量群において摂取前の $2.1 \pm 1.1$  から、12週目に $3.0 \pm 0.9$  とそれぞれ有意に増加した (Figure 2-3)。目の疲れのスコアは、高用量群において摂取前の $2.4 \pm 0.8$  から、12週目に $3.3 \pm 0.8$  とそれぞれ有意に増加した (Figure 2-4)。肩こりのスコアは、低用量群において、摂取前の $2.1 \pm 1.0$  から6週目に $2.8 \pm 0.6$ 、12週目に $3.1 \pm 0.9$  と有意に増加した。高用量群においては摂取前の $2.5 \pm 1.1$  から12週目に $3.5 \pm 1.1$  と有意に増加した (Figure 2-5)。手足の冷えのスコアは、高用量群において摂取前の $3.5 \pm 1.0$  から6週目に $3.9 \pm 0.7$  と有意に増加した (Figure 2-6)。日中覚醒のスコアは、低用量群において接種前の $1.3 \pm 1.1$  から6週目に $0.5 \pm 0.5$ 、12週目に $0.4 \pm 0.5$  とそれぞれ有意に低下した。高用量群において摂取前の $1.0 \pm 0.5$  から6週目に $0.5 \pm 0.7$ 、12週目に $0.5 \pm 0.7$  とそれぞれ有意に低下した (Figure 2-7)。目覚めのよさのスコアは、低用量群において摂取前の $1.3 \pm 0.5$  から12週目に $1.0 \pm 0.0$  と有意に低下した (Figure 2-8)。また、水虫の症状のスコアについては、有症者が低用量群の2名のみであったため統計的な有意差はみられなかったが、2名とも症状が改善した。



Table 2-4 Subjective Evaluation Questionnaire (1)

| Item                             | Group               | Pre-intake | At 6 <sup>th</sup> week | At 12 <sup>th</sup> week |
|----------------------------------|---------------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| Skin suppleness and resilience   | Low-dose (L) group  | 2.6±0.7    | 3.1±0.8                 | 2.9±0.8                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.9±0.9    | 3.4±0.5                 | 3.1±0.3                  |
| Skin problems                    | Low-dose (L) group  | 2.8±0.8    | 3.0±0.7                 | 2.9±0.9                  |
|                                  | High-dose (H) group | 3.7±1.1    | 3.5±0.8                 | 3.8±0.6                  |
| Athlete's foot *1                | Low-dose (L) group  | 2.0±0.0    | 3.0±0.0                 | 4.0±0.0                  |
|                                  | High-dose (H) group | -          | -                       | -                        |
| Bowel movement                   | Low-dose (L) group  | 3.6±1.4    | 3.3±1.0                 | 3.7±1.0                  |
|                                  | High-dose (H) group | 3.2±0.6    | 3.5±0.8                 | 3.7±0.7                  |
| Stool condition and form         | Low-dose (L) group  | 3.6±0.9    | 3.3±1.1                 | 3.9±0.9                  |
|                                  | High-dose (H) group | 3.4±0.7    | 3.5±0.7                 | 3.6±0.8                  |
| Stiffness of hair                | Low-dose (L) group  | 2.5±0.9    | 3.2±0.8                 | 3.1±0.9                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.8±0.6    | 3.0±0.5                 | 3.2±0.6                  |
| Amount of hair loss              | Low-dose (L) group  | 3.0±1.0    | 3.0±0.0                 | 3.0±0.7                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.7±0.5    | 3.2±0.4*                | 3.2±0.6*                 |
| Amount of gray hair *2           | Low-dose (L) group  | 2.8±0.9    | 3.4±0.9                 | 3.3±1.0                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.4±1.1    | 3.2±0.7*                | 3.2±1.0*                 |
| Fatigue and general malaise      | Low-dose (L) group  | 2.1±0.9    | 2.7±0.9                 | 2.9±0.8*                 |
|                                  | High-dose (H) group | 2.1±1.1    | 2.7±0.8                 | 3.0±0.9*                 |
| Eyestrain                        | Low-dose (L) group  | 2.6±1.2    | 2.8±0.8                 | 3.3±1.0                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.4±0.8    | 2.7±0.9                 | 3.3±0.8*                 |
| Shoulder stiffness               | Low-dose (L) group  | 2.1±1.0    | 2.8±0.6*                | 3.1±0.9*                 |
|                                  | High-dose (H) group | 2.5±1.1    | 3.1±1.3                 | 3.5±1.1*                 |
| Stress                           | Low-dose (L) group  | 2.4±0.7    | 2.6±0.9                 | 3.1±0.9                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.6±0.8    | 2.5±1.0                 | 3.1±0.9                  |
| Coldness of extremities          | Low-dose (L) group  | 3.0±0.9    | 3.2±0.7                 | 3.3±0.6                  |
|                                  | High-dose (H) group | 3.5±1.0    | 3.9±0.7*                | 3.6±0.8                  |
| Dry eye condition *3             | Low-dose (L) group  | 2.2±0.4    | 3.2±0.8                 | 3.3±0.5                  |
|                                  | High-dose (H) group | 2.5±1.7    | 3.3±1.3                 | 3.3±1.3                  |
| Physical condition (e. g., cold) | Low-dose (L) group  | 3.8±1.1    | 3.8±1.0                 | 3.8±0.9                  |
|                                  | High-dose (H) group | 3.8±0.6    | 3.9±1.0                 | 3.6±1.0                  |

• Low-dose(L)group: n=12; High-dose(H)group: n=10

\*1 Low-dose(L)group: n=2; High-dose(H)group: n=0

\*2 Low-dose(L)group: n=12; High-dose(H)group: n=9

\*3 Low-dose(L)group: n=5(at 6<sup>th</sup> week); n=4(at 12<sup>th</sup> week); High-dose(H)group: n=4

• Values are expressed as mean ± standard deviation

• Wilcoxon signed-rank test compared with pre-intake \*\* ; p<0.01 \* ; p<0.05

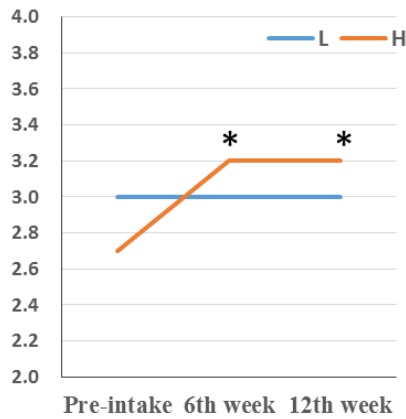


Figure 2-1 Amount of hair loss

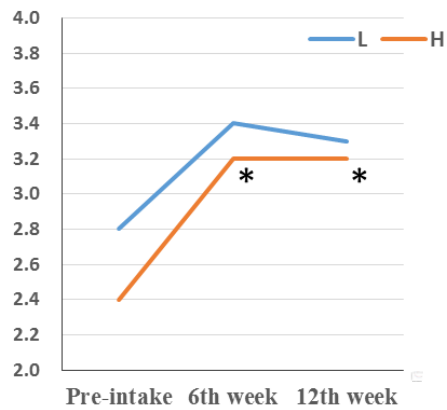


Figure 2-2 Amount of gray hair

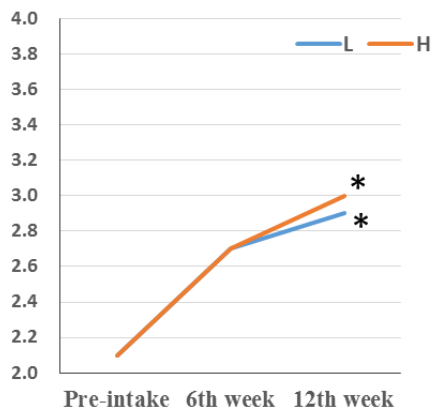


Figure 2-3 Fatigue and general

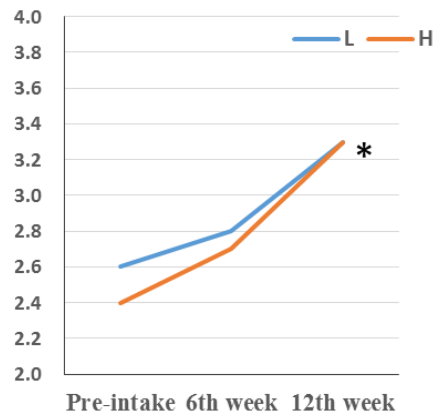


Figure 2-4 Eyestrain

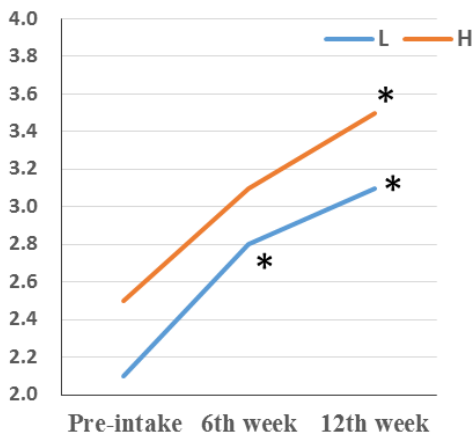


Figure 2-5 Shoulder stiffness

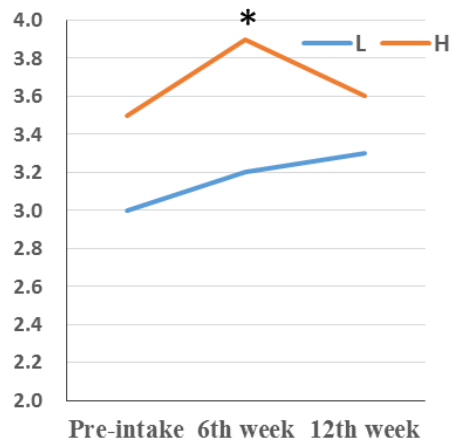


Figure 2-6 Coldness of extremities

Figure 2-1~2-6 は、いずれも *A. brasiliensis* の6週後、12週後時点の値と摂取前の値からの変化を Wilcoxon の符号付順位検定を用いて評価した。

Table 2-5 Subjective Evaluation Questionnaire (2)

|  | Group               | Pre-intake | At 6 <sup>th</sup> week | At 12 <sup>th</sup> week |
|--|---------------------|------------|-------------------------|--------------------------|
| Total score                                    | Low-dose (L) group  | 5.1±2.6    | 4.0±1.2                 | 3.7±1.4                  |
|  | High-dose (H) group | 4.7±1.5    | 4.5±1.4                 | 3.9±1.1                  |
| <b>Item</b>                                    | Low-dose (L) group  | 1.2±0.6    | 1.1±0.3                 | 0.9±0.5                  |
|  | High-dose (H) group | 1.4±0.5    | 1.3±0.5                 | 1.1±0.3                  |
| C2: Time required for falling asleep           | Low-dose (L) group  | 0.3±0.7    | 0.1±0.3                 | 0.3±0.5                  |
|  | High-dose (H) group | 0.2±0.4    | 0.4±0.5                 | 0.1±0.3                  |
| C3: Sleep duration                             | Low-dose (L) group  | 1.5±0.7    | 1.4±0.5                 | 1.5±0.7                  |
|  | High-dose (H) group | 1.2±0.8    | 1.3±0.5                 | 1.2±0.6                  |
| C4: Sleep efficiency                           | Low-dose (L) group  | 0.0±0.0    | 0.0±0.0                 | 0.0±0.0                  |
|  | High-dose (H) group | 0.0±0.0    | 0.0±0.0                 | 0.0±0.0                  |
| C5: Difficulty in sleeping                     | Low-dose (L) group  | 0.8±0.6    | 0.9±0.5                 | 0.6±0.5                  |
|  | High-dose (H) group | 0.9±0.3    | 1.0±0.0                 | 1.0±0.0                  |
| C6: Sleeping pill use                          | Low-dose (L) group  | 0.0±0.0    | 0.0±0.0                 | 0.0±0.0                  |
|  | High-dose (H) group | 0.0±0.0    | 0.0±0.0                 | 0.0±0.0                  |
| C7: Difficulty in staying awake during the day | Low-dose (L) group  | 1.3±1.1    | 0.5±0.5*                | 0.4±0.5*                 |
|  | High-dose (H) group | 1.0±0.5    | 0.5±0.7*                | 0.5±0.7*                 |
| Q5: Ease in getting out of bed                 | Low-dose (L) group  | 1.3±0.5    | 1.2±0.4                 | 1.0±0.0*                 |
|  | High-dose (H) group | 1.4±0.5    | 1.3±0.5                 | 1.1±0.3                  |

- Low-dose (L) group: n=12; High-dose (H) group: n=10
- Values are expressed as mean±standard deviation
- Wilcoxon signed-rank test compared with pre-intake \*\*: p<0.01, \*: p<0.05

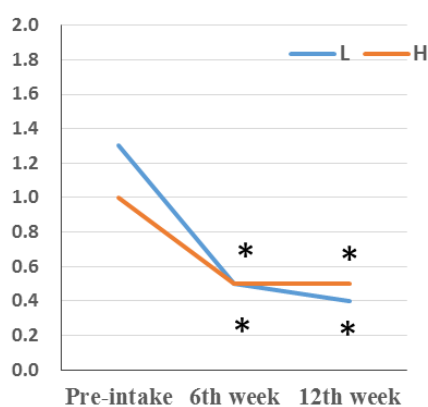


Figure 2-7 Difficulty in staying awake during the day

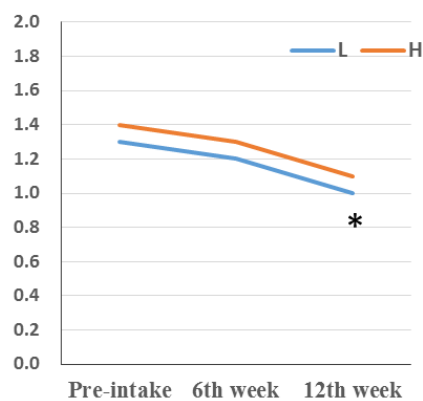


Figure 2-8 Ease in getting out of bed

Figure 2-7~2-8 は、いずれも *A. brasiliensis* の6 週後、12 週後時点の値と摂取前の値からの変化を Wilcoxon の符号付順位検定を用いて評価した。

Table 2-6 Hematology test

| Item               | Unit                        | Group               | Pre-intake  | At 12 <sup>th</sup> week |
|--------------------|-----------------------------|---------------------|-------------|--------------------------|
| WBC                | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 4.55±0.98   | 5.06±1.30                |
|                    |                             | High-dose (H) group | 4.67±0.60   | 5.29±1.64                |
| RBC                | $(\times 10^4 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 450.5±44.6  | 445.8±42.8               |
|                    |                             | High-dose (H) group | 450.3±35.4  | 451.3±42.7               |
| Hb                 | (g/dL)                      | Low-dose (L) group  | 13.16±1.48  | 13.43±1.60               |
|                    |                             | High-dose (H) group | 13.42±0.89  | 13.60±1.46               |
| Ht                 | (%)                         | Low-dose (L) group  | 40.78±4.17  | 41.56±4.48               |
|                    |                             | High-dose (H) group | 41.30±2.57  | 42.16±4.02               |
| PLT                | $(\times 10^4 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 23.13±6.07  | 22.38±5.65               |
|                    |                             | High-dose (H) group | 24.48±3.10  | 24.79±4.21               |
| Percentage of NEUT | (%)                         | Low-dose (L) group  | 58.5±3.4    | 59.4±5.4                 |
|                    |                             | High-dose (H) group | 51.6±9.1    | 52.2±10.2                |
| NEUT count         | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 2.670±0.654 | 3.030±0.880              |
|                    |                             | High-dose (H) group | 2.411±0.528 | 2.807±1.246              |
| Percentage of EOS  | (%)                         | Low-dose (L) group  | 1.8±1.0     | 2.8±1.3                  |
|                    |                             | High-dose (H) group | 3.6±3.1     | 4.3±3.8                  |
| EOS count          | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 0.080±0.041 | 0.140±0.062*             |
|                    |                             | High-dose (H) group | 0.166±0.141 | 0.215±0.166*             |
| Percentage of BAS  | (%)                         | Low-dose (L) group  | 0.8±0.5     | 0.6±0.5                  |
|                    |                             | High-dose (H) group | 0.8±0.6     | 0.8±0.6                  |
| BAS count          | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 0.033±0.021 | 0.027±0.025              |
|                    |                             | High-dose (H) group | 0.036±0.030 | 0.037±0.030              |
| Percentage of MON  | (%)                         | Low-dose (L) group  | 6.6±1.4     | 6.8±1.9                  |
|                    |                             | High-dose (H) group | 5.7±1.1     | 4.6±0.8**                |
| MON count          | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 0.294±0.061 | 0.331±0.072              |
|                    |                             | High-dose (H) group | 0.266±0.061 | 0.244±0.093              |
| Percentage of LYM  | (%)                         | Low-dose (L) group  | 32.3±3.8    | 30.3±4.7                 |
|                    |                             | High-dose (H) group | 38.3±6.7    | 38.1±8.5                 |
| LYM count          | $(\times 10^3 \mu\text{L})$ | Low-dose (L) group  | 1.472±0.348 | 1.531±0.474              |
|                    |                             | High-dose (H) group | 1.791±0.378 | 1.987±0.584              |

• Low-dose(L)group: n=12; High-dose(H)group: n=10

• Value are expressed as mean ± standard

• One-sample t-test compared with pre-intake\*\*: p<0.01, \*:p<0.05

Table 2-7 Biochemical Blood Test

| Item              | Unit    | Group               | Pre-intake   | At 12 <sup>th</sup> week |
|-------------------|---------|---------------------|--------------|--------------------------|
| AST               | (IU/L)  | Low-dose (L) group  | 20.7±7.9     | 22.8±11.0                |
|                   |         | High-dose (H) group | 20.5±4.9     | 19.4±3.3                 |
| ALT               | (IU/L)  | Low-dose (L) group  | 15.5±5.4     | 21.3±17.2                |
|                   |         | High-dose (H) group | 18.2±7.2     | 19.1±8.3                 |
| γ-GTP             | (IU/L)  | Low-dose (L) group  | 19.4±12.6    | 28.5±21.8                |
|                   |         | High-dose (H) group | 19.8±9.7     | 23.1±13.7                |
| T-Bil             | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 0.72±0.15    | 0.71±0.24                |
|                   |         | High-dose (H) group | 0.81±0.38    | 0.71±0.35                |
| TP                | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 6.68±0.31    | 6.92±0.34**              |
|                   |         | High-dose (H) group | 6.89±0.31    | 7.06±0.32*               |
| UN                | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 10.80±2.30   | 10.37±2.73               |
|                   |         | High-dose (H) group | 10.40±1.68   | 10.33±1.93               |
| Cre               | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 0.746±0.125  | 0.747±0.105              |
|                   |         | High-dose (H) group | 0.668±0.151  | 0.661±0.160              |
| TC                | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 184.8±20.3   | 188.7±20.8               |
|                   |         | High-dose (H) group | 196.9±29.6   | 200.7±32.2               |
| HDL-C             | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 65.8±14.6    | 73.8±14.9**              |
|                   |         | High-dose (H) group | 62.9±15.9    | 67.4±16.5*               |
| TG                | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 69.8±30.5    | 74.7±38.3                |
|                   |         | High-dose (H) group | 61.6±43.4    | 78.1±58.1*               |
| Glu               | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 90.8±10.1    | 90.8±9.9                 |
|                   |         | High-dose (H) group | 91.7±3.7     | 92.3±5.2                 |
| IRI               | (μU/mL) | Low-dose (L) group  | 6.20±2.49    | 5.49±2.26                |
|                   |         | High-dose (H) group | 5.08±2.35    | 5.00±3.25                |
| Na                | (meq/L) | Low-dose (L) group  | 142.1±1.4    | 140.9±1.1*               |
|                   |         | High-dose (H) group | 141.6±1.3    | 141.2±0.6                |
| K                 | (meq/L) | Low-dose (L) group  | 4.32±0.39    | 4.24±0.43                |
|                   |         | High-dose (H) group | 4.32±0.36    | 4.22±0.20                |
| Cl                | (meq/L) | Low-dose (L) group  | 105.3±1.8    | 104.6±1.6                |
|                   |         | High-dose (H) group | 105.3±1.1    | 105.1±1.5                |
| IgG               | (mg/dL) | Low-dose (L) group  | 1178.3±241.8 | 1217.8±246.2             |
|                   |         | High-dose (H) group | 1259.0±215.6 | 1278.2±195.7             |
| HbA <sub>1c</sub> | (%)     | Low-dose (L) group  | 4.84±0.22    | 4.73±0.20                |
|                   |         | High-dose (H) group | 5.02±0.34    | 4.97±0.31                |

- Low-dose(L)group: n=12; High-dose(H)group: n=10
- Value are expressed as mean ± standard deviation
- One-sample t-test compared with pre-intake\*\*: p<0.01, \*:p<0.05

Table 2-8 Physical Measurements

| Item   | Unit                 | Group             | Pre-intake  | At6th week  | At12th week |
|--|----------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| Body height  | (cm)                 | Low-dose(L)group  | 165.18±9.62 |             |             |
|  |                      | High-dose(H)group | 167.26±9.15 |             |             |
| Body weight  | (kg)                 | Low-dose(L)group  | 59.52±10.59 | 59.22±11.17 | 59.70±10.81 |
|  |                      | High-dose(H)group | 62.68±12.13 | 62.93±12.30 | 63.06±11.71 |
| BMI  | (kg/m <sup>2</sup> ) | Low-dose(L)group  | 21.68±2.60  | 21.56±2.81  | 21.74±2.66  |
|  |                      | High-dose(H)group | 22.23±2.56  | 22.32±2.72  | 22.39±2.63  |
| Systolic blood pressure                                      | (mmHg)               | Low-dose(L)group  | 107.1±14.0  | 108.2±12.9  | 109.8±13.3  |
|  |                      | High-dose(H)group | 119.1±11.5  | 115.4±12.6* | 120.0±12.4  |
| Diastolic blood pressure                                     | (mmHg)               | Low-dose(L)group  | 66.4±11.1   | 66.5±8.8    | 68.8±9.9    |
|  |                      | High-dose(H)group | 73.7±11.3   | 72.5±9.5    | 74.9±7.8    |
| Pulse rate   | (beats/min)          | Low-dose(L)group  | 62.8±4.2    | 65.6±6.2    | 64.3±4.9    |
|  |                      | High-dose(H)group | 66.9±5.1    | 67.1±5.4    | 68.9±7.5    |
| *Low-dose(L)group: n=12;High-dose(H)group: n=10              |                      |                   |             |             |             |
| *Values are expressed as mean ±standard deviation            |                      |                   |             |             |             |
| *One-sample t-test compared with pre-intake **p<0.01,*p<0.05 |                      |                   |             |             |             |

## 第二節 安全性の評価

安全性の評価のために、各被験者の有害事象をモニターした。臨床検査、計測値の数値データは、個々の被験者の検査値を試験実施医療機関で定める基準範囲（臨床検査値の場合は検査機関の基準範囲）を参考にして、試験責任医師が評価した。血液学的検査、血液生化学検査および計測値の推移をTable2-6～2-8に示した。ならびに試験期間中に観察された有害事象の数と一覧をTable2-9、2-10に示した。

有害事象については、試験期間中にいくつかの自覚症状の訴えと、他覚症状が観察された。症状はすべて軽度であり、重篤な有害事象は見られなかった。胃もたれの2件（ID. 808、高用量群）は、試験責任医師により、試験食品との関連性が「あるかもしれない」と判定されたが、それ以外はすべて「なし」あるいは「多分なし」と判定された。Table 2-10のID. 808 の胃もたれの症状は、摂取18日目から発現した。症状発現後、被験者が自主的に試験食品の摂取を中断したところ、5日後に症状が消失した。試験責任医師の指示により、症状消失から3日間経過観察をした後、体調に問題がないことを確認したうえで、摂取量を1日2錠に減らして試験食品の摂取を再開した。3日間連続して症状が発現しなかったため、試験責任医師の指示により、規定量（1日5錠）に戻して試験食品を摂取したところ、同様の胃もたれ症状が発現したため、摂取を中止した。摂取中止の5日後に症状は消失した。被験者への聴取において、過去にも食物繊維を多く含

む食品を摂取した場合に同様の症状が発現したことが度々あったと自己申告があった。なお、試験食品には一錠当たり56.7 mg の食物繊維が含まれている。試験責任医師は本症状について、試験食品以外の原因も否定できないが、被験者の体質ならびに試験食品に含まれる豊富な食物繊維の摂取により症状が発現した可能性を否定できないため、本事象と試験食品摂取との関連性を「あるかもしれない」と判定した。血液検査では、低用量群でEOS（細胞数）、TP、HDL-C、Na および高用量群でEOS（細胞数）、MON（百分率）、TP、HDL-C、TG がいずれも摂取前と比較して有意に変動したが、いずれも基準範囲内の軽微な変動であり、試験責任医師は臨床上的問題はないと判断した。計測値では、高用量群で6週目の収縮期血圧が摂取前に比べて有意な変動を示したが軽微な変動であり、試験責任医師は臨床上的問題はないと判断した。

Table 2-9 Number of Adverse Events

| Item  | Unit       | Group              |                     |
|---|------------|--------------------|---------------------|
|   |            | Low-dose (L) group | High-dose (H) group |
| Number of subjects analyzed                 | (subjects) | 13                 | 11                  |
| Number of subjects with adverse events      | (subjects) | 4                  | 4                   |
| Frequency of incidence                      | (%)        | 31                 | 36                  |
| Total number of incidents                   | (cases)    | 5                  | 11                  |
| Number of incidents by symptom              |            |                    |                     |
| Itching in the back of the knees            | (cases)    | 1                  | 0                   |
| Feeling of heaviness of stomach             | (cases)    | 0                  | 2                   |
| Diarrhea                                    | (cases)    | 0                  | 2                   |
| Stomachache                                 | (cases)    | 0                  | 1                   |
| General malaise                             | (cases)    | 0                  | 1                   |
| Abdominal pain                              | (cases)    | 0                  | 2                   |
| Runny nose                                  | (cases)    | 1                  | 0                   |
| Abdominal pain, abdominal discomfort        | (cases)    | 1                  | 0                   |
| Diarrhea, abdominal pain                    | (cases)    | 0                  | 1                   |
| Loose stool                                 | (cases)    | 0                  | 1                   |
| Cold symptoms (sore throat, fever, cough)   | (cases)    | 0                  | 1                   |
| Eosinophilia                                | (cases)    | 1                  | 0                   |
| Increased AST, ALT, and $\gamma$ GTP levels | (cases)    | 1                  | 0                   |

**Table 2-10 List of Adverse Events**

| <b>Group &amp; Subject ID No.</b> | <b>Sex, Age, Symptom &amp; Date of onset</b>  | <b>Outcome, Relationship with test food</b>     | <b>Physician's comments, treatment details</b>  |
|-----------------------------------|---|---|---|
| L•803                             | Male,45,<br>Increased AST,<br>ALT,<br>and $\gamma$ GTP levels,<br>10/8-                                 | Unchanged,<br>Unlikely related                  | As it was observed during the examination at 12th week (October 8), reexamination was performed 4 weeks later on November 5. The results showed almost no improvement, but no change was observed 4 weeks after completion of intake. The event was thus evaluated to be unlikely related to the test food.   |
| L•804                             | Male,52,<br>Itching in the back<br>of the knees<br>(both legs),7/21                                     | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated        | The condition was only observed for a short time on the 6th day of intake, and as it did not reappear afterward, the event was evaluated to be unrelated to the test food.  |
| L•836                             | Female,37,<br>Runny nose,<br>7/26-7/28  | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated        | The subject reported changes in weather condition as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.  |
| L•840                             | Female,40,<br>Abdominal pain,<br>abdominal discomfort<br>(feeling of heaviness<br>of stomach) ,8/20-9/5 | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unlikely related | As the condition appeared from the 36th day of intake, it was deemed unlikely related to the test food. The subject requested to withdraw from the study on August 29, and was hence treated as a dropout. It was confirmed on September 5 that the symptoms had disappeared. Abdominal pain: August 20, 23 (menstrual pain); Abdominal discomfort: August 21, 22, 24-31, September 1-5. Oral intake of 1 tablet of Buscopan A on August 20, 28; oral intake of 4 tablets of Eve A on August 23 |
| L•840                             | Female,40,<br>Eosinophilia,<br>8/29-9/17  | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unlikely related | During the examination at 6 <sup>th</sup> week (discontinuation), an increase in eosinophil count (19%) was observed. A decrease of this count was noted during reexamination 20 days later (4%; 2% during pre-intake examination). This event was evaluated to be unlikely related to the test food.   |



|       |   |   |  |
|-------|---|---|--|
| H•808 | Female,44,<br>Feeling of heaviness<br>of stomach,<br>8/2-8/10     | Recovery/<br>Disappearance,<br>Probably related | The symptom appeared from the 18th day of intake. The subject stopped taking the test food from August 2. Intake was restarted on August 4, but again stopped because symptom of diarrhea. The from August 5 disappeared on August 10. This event was evaluated to be probably related to the test food.   |
| H•808 | Female,44,<br>Diarrhea,<br>8/4                                    | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unlikely related | Intake had been stopped since August 2 because of the feeling of heaviness of the stomach. One hour after resuming intake on August 4, the subject experienced diarrhea, although it lasted for only a short time. No similar symptoms were observed after intake was resumed. This event was evaluated to be unlikely related to the test food.   |
| H•808 | Female,44,<br>Feeling of<br>heaviness of<br>stomach,<br>8/20-8/26 | Recovery/<br>Disappearance,<br>Probably related | Intake was resumed on August 12. The subject took 2 tablets on August 12-14, and 5 tablets on August 15 and there after, as there was no change in the physical condition. Feeling of heaviness of the stomach reappeared 9 days after the resumption (August 20). Intake was interrupted on August 22, and the symptom disappeared on August 26. This event was evaluated to be probably related to the test food. The subject requested to withdraw from the study on August 27 and was hence treated as a dropout. Oral intake of Tateyama Digestive Medicine A → 1 package on August 22, 23; 3 packages on August 23 |
| H•826 | Female,56,<br>Stomachache,<br>7/23-7/24                           | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated        | The subject reported having eaten cold food in excess as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.   |
| H•826 | Female,56,<br>Malaise,8/15  | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated        | The subject reported tiredness as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.  |

|       |   |  |  |
|-------|---|--|--|
| H・826 | Female,56,<br>Abdominal pain,<br>8/22                                       | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The subject reported having eaten cold food as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.   |
| H・826 | Female,56,<br>Abdominal pain ,<br>9/25                                      | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The subject reported changes in weather condition as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.   |
| H・841 | Male,55,<br>Diarrhea,<br>abdominal pain ,7/22                               | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The condition was observed only on the 7th day of intake, and was thus deemed unrelated to the test food.  |
| H・849 | Female,39,<br>Loose stool ,<br>7/23   | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The subject reported suffering from cold as the cause. The event was deemed unrelated to the test food.  |
| H・849 | Female,39,<br>Diarrhea ,<br>8/8-8/12  | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The subject reported catching gastroenteritis from her child.The condition was only observed from 25 to 29th day of intake, and not afterward.Thus, the event was evaluated to be unrelated to the test food. August 9: oral intake of 1 package of BIO-THREE  |
| H・849 | Female,39,<br>Cold symptoms<br>(sore throat,<br>fever, cough),<br>9/30-10/7 | Recovery/<br>Disappearance,<br>Unrelated | The symptoms were due to a cold and the event was thus deemed unrelated to the test food. Sore throat, September 30 - October 5; Fever, October 1-2; Cough, October 6. Oral drugs: Kakkonto, September 30 (1 package); New S-TAC granules, October 1 (2 packages); Colgen Kowa B, October 2 (6 tablets); October 3 (9 tablets), October 4 (6 tablets), October 5 (3 tablets); Rakunaru GX, October 2 (2 bottles), October 3 (1 bottle) |

## 第二章 考察

唾液 sIgA 分泌速度が低めの成人男女 24 名を対象に、*A. brasiliensis* を含有する食品の QOL 改善効果ならびに安全性を評価することを目的として、12 週間連続摂取するオープン試験を行った。

その結果、唾液中 sIgA 分泌速度に有意な変化は認められなかったが、使用感アンケートでは、抜け毛の量、白髪の数、疲労感・倦怠感、目の疲れ、肩こり、手足の冷え、日

中覚醒困難、目覚めの良さのスコアが、それぞれの摂取前に比べて有意に改善していた。これらの結果から *A. brasiliensis* の摂取は、抜け毛、白髪、疲労感・倦怠感、目の疲れ、肩こり、手足の冷え、日中覚醒困難、目覚めの主観的な評価を改善する可能性が示唆された。また、これらの有効性は、アガリクスの主要な有効性成分である  $\beta$ -グルカンだけでなく *A. brasiliensis* に含まれる特徴的な成分の関与も考えられ、更なる研究が必要である。

また、QOL アンケート結果ならびに種々の検査値から安全性に問題がないことが強く示唆された。本研究で用いた *A. brasiliensis* は、菌株を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託し、その菌株を使いブラジルで露地栽培されている。現在まで東京薬科大学免疫学教室、順天堂大学医学部、近畿大学医学部、麻布大学獣医学部、東京大学・食の安全研究センターなどでヒト臨床試験を含む安全性・有用性試験を行っており、その研究成果を各種科学誌に論文掲載してきた。近年の研究により、*A. brasiliensis* は、免疫賦活作用が示唆される  $\beta$ -グルカンをハウス栽培アガリクスに比べ 1.5 倍多く含むだけでなく、ビタミン D を多量に含むことが確認されている (図 5)。これまでの臨床研究から、*A. brasiliensis* の摂取により、ヒトの免疫機能を賦活する結果 (NK 細胞の活性化) などが得られている<sup>17)</sup>。これらの知見に本研究結果を加えることによって、*A. brasiliensis* の安全性の高さと食品としての機能性は、さらに強く示唆されたものと考えることができる。

### 第三章 ヒト抗 $\beta$ -グルカン抗体価における露地栽培アガリクス服用の効果とがん患者における抗 $\beta$ -グルカン抗体の研究

#### 序論

$\beta$ -グルカンは真菌細胞壁主要構成多糖であり、真菌、細菌、植物、藻類など広く自然界に分布している。また、 $\beta$ -グルカンは免疫賦活作用を示すことが動物ならびにヒト臨床試験によって明らかにされている<sup>26-28)</sup>。さらに、我国では *Lentinus edodes* 由来 Lentinan や *Schizophyllum commune* 由来 Sonifilan (SPG) が抗悪性腫瘍薬として用いられている<sup>29,30)</sup>。今世紀に入り受容体研究も盛んになり、その過程で  $\beta$ -グルカン特異的受容体、Dectin-1<sup>31)</sup>、CR3<sup>32)</sup>、lactosylceramide<sup>33)</sup>などが同定され、それら受容体が phagocytosis や他の生物活性に関わっていることが報告されている。一方、抗体は獲得免疫における認識生体分子であり、phagocytosis を促進することによって、抗原提示、co-stimulatory molecule の発現を上昇させること、もしくは、Fc receptor の crosslinking、サイトカイン産生の修飾によって病原体に対する生体防御を増強させるなど重要な働きを担っていることが知られている<sup>34-36)</sup>。 $\beta$ -グルカンは受容体を介して自然免疫を活性化することは解析が進んできたが、多糖は一般的に抗原性が弱いこと<sup>37)</sup>から  $\beta$ -グルカンを抗原として扱った研究は、申請者の共同研究者らが行ってきた研究以外にはほとんどない。共同研究者の石橋らは、CSBG を標準抗原として用いた固相化 ELISA 法により、ヒト血清中に、抗  $\beta$ -グルカン (CSBG) 抗体が広範に存在すること、また、抗体価は著しい個人差を示すことを見出した<sup>38)</sup>。また、DBA 系統のマウスやウシなどの血清中にも抗  $\beta$ -グルカン抗体が存在していることを明らかとした<sup>39,40)</sup>。さらに、本抗体は生体内で抗原-抗体複合体を形成し、 $\beta$ -グルカンの免疫修飾作用に関与していることが示唆された<sup>41)</sup>。さらに臨床検体を用いた研究により、真菌症、自己免疫疾患の患者においては抗  $\beta$ -グルカン抗体価が変動することが示され<sup>42)</sup>、抗  $\beta$ -グルカン抗体は  $\beta$ -グルカン反応、応答の指標の一つとしての可能性がある。そこで本章では、*A. brasiliensis* 由来の  $\beta$ -グルカンに対して特異的な抗体の存在を確認し、その特異性と個人差を明確にし、また、*A. brasiliensis* を摂取することによって、抗体力価に影響を与えるのかについて検討した。

#### 第三章 実験の部

##### 1. 実験材料

*Aspergillus* spp ならびに *Candida albicans* の菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) (千葉, 日本) から購入し、3 カ月ごとにサブロー寒天培地 (Difco, MI, USA) を用い、25 °Cにて継代維持した。次亜塩素酸ナトリウム液、水酸化ナトリウ

ムは、和光純薬(大阪, 日本)から購入した。真菌細胞壁 $\beta$ グルカン (CSBG, ASBG) は既報に従い、*Candida albicans* ならびに *Aspergillus niger* より、次亜塩素酸酸化法により調整した<sup>43,44</sup>。Grifolan (GRN) は、*Grifola frondosa* の培養菌糸体より調整した<sup>45</sup>。アガリクスから由来多糖体画分 (AgHWE, AgCA-1, AgCA-2, AgHA) は、既報に従い調整した<sup>19</sup>。Sonifilan (SPG)は科研製薬(東京, 日本) から購入した。Dextran は生化学(東京, 日本)から入手した。Laminaran (LAM)と酵母由来 Mannan はナカライテスク(京都, 日本) から入手した。

## 2. ボランティアと研究計画

健常人血清を用いた研究は1964年のヘルシンキ宣言(2000年エジンバラで修正)に準拠して行われた。また、研究プロトコルは、フィルファインクリニックの倫理委員会の承認を得て、全てのボランティアがこの研究にあたりインフォームドコンセントを受け、書面にて承諾後、健康なボランティアが、初回24名、2回目52名、3回目25名が参加した。

## 3. がん患者の血清と研究計画

がん患者血清を用いた研究はヘルシンキ宣言に準拠し、東京衛生病院の倫理委員会の承認を受け、2004年1月16日から同年4月25日に東京衛生病院に通院中のがん患者26名(平均年齢 $49.0 \pm 6.6$ 歳、男性11名、女性15名)の採決した血清を得て行った。同病院の水上治医師の協力のもと、がん患者26名の血清を採取し、反応性を健常人と比較した。統計評価は5%水準で $t$ 検定を実施した。

## 4. 抗BG抗体のELISA法

96 well Nunc プレート (Nunc 442404, F96 Maxisorp) を0.1 M carbonate buffer (pH 9.6)に溶解したグルカン製剤によりコーティングした。0.05 %Tween20(和光純薬)を含むPBSで洗浄し、1%ウシ血清アルブミン (Sigma・St.Louis・MO・USA) を含有したPBST (BPBST) にてブロッキングを行った後、プレートに各血清を加え、37°Cにて60分間インキュベートした。BPSTで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG+M+A 抗体 (Sigma) を添加し、洗浄後、TMB substrate system (KPL, M, USA) を用いて発色させ、1 M リン酸で反応停止後に450 nmにおける吸光度を測定した。

## 5. ボランティアの臨床研究方法

### 5.1. 初回参加者数24名

5.1.1. 2004年5月31日にフィルファインクリニックにおいて、健康な24名のボランティア(平均年齢 $43.7 \pm 11.9$ 歳、男性13名、女性11名)の採血した血清を得て、反応性をがん患者と比較した。統計評価は5%水準で $t$ 検定を実施した。

## 5.2. 2回目参加者数 52名

5.2.1. グループ1：健康な52名のボランティアをランダムに2つのグループに分け、投与グループ（27名：平均年齢43±11歳、男性13名、女性14名）は、*A. brasiliensis* 子実体100%の錠剤1日3g、6カ月分を与えた。プラセボグループ（25名：平均年齢45±9歳、男性12名、女性13名）は、プラセボを6カ月分与えた（2004年5月31日～2004年11月26日）。0、3、6カ月ごとに、それぞれのボランティアから採血した。

## 5.3. 3回目参加者数 25名

5.3.1. グループ2：健康な25名のボランティアをランダムに2つのグループに分け、投与グループ（14名：平均年齢49±9歳、男性9名、女性5名）は、*A. brasiliensis* の錠剤1日3g、3カ月分を与えた。プラセボグループ（11名：平均年齢46±11歳、男性6名、女性5名）は、プラセボを3カ月分与えた（2005年4月12日～2005年7月8日）。採血は投与前後で行った。

## 5.4. 採血方法

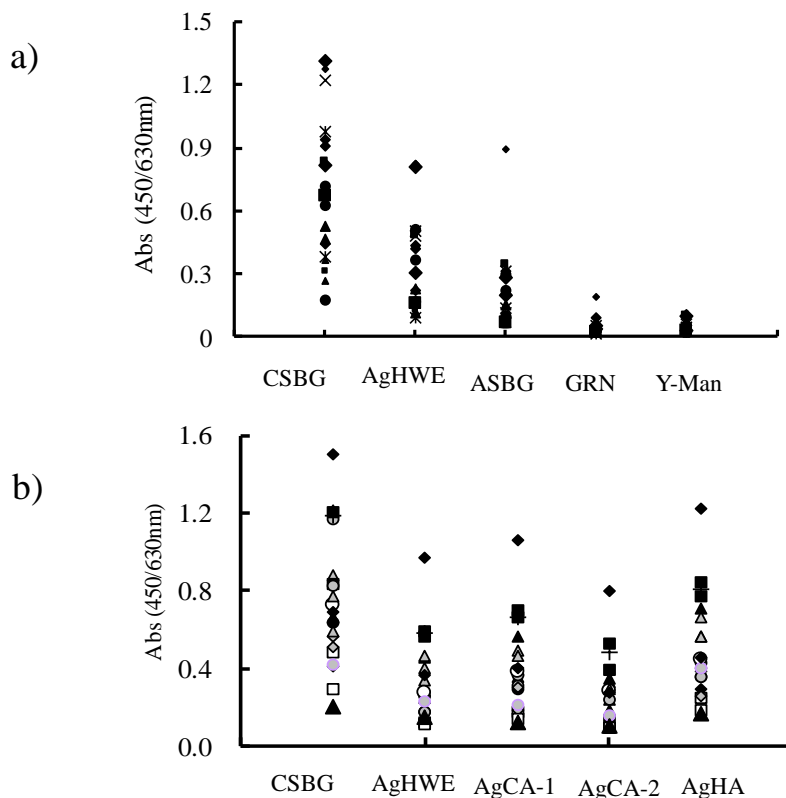
試験開始前後に、各々のボランティアより採血し、遠心分離を行い血液サンプルとした。この検体は抗BG抗体のELISAを行うまで-20℃の状態での保存した。

## 第三章 結果

### 第一節 ヒト血清における抗β-グルカン抗体価、抗体反応性の検討

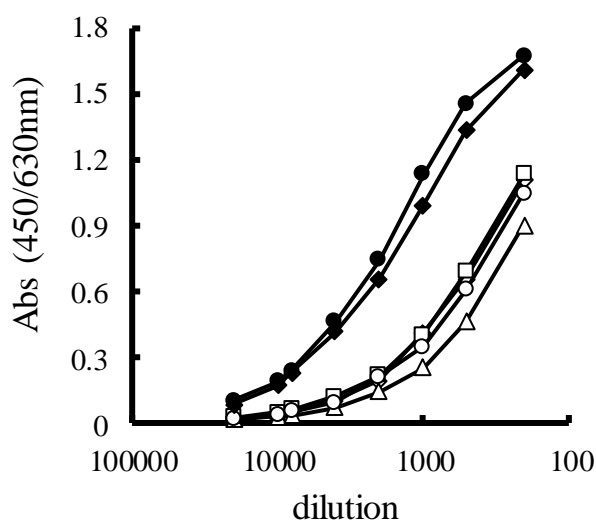
これまでの検討により、抗β-グルカン（CSBG）抗体価には個人差がかなり存在することが報告されている<sup>38)</sup>。まず、健康人血清における抗β-グルカン抗体力価の個人差を検討するとともに、抗β-グルカン抗体反応性並びに各種β-グルカンに対する抗体力価を検討した。*A. brasiliensis*由来のβ-グルカンは既報に従い、子実体の熱水（AgHWE）、冷アルカリ（AgCA1, AgCA2）ならびに熱アルカリ（AgHA）抽出を行うことで調製した<sup>19)</sup>。標準品としては *Candida albicans* 由来のCSBGを用いた<sup>43)</sup>。標準品ならびに *A. brasiliensis* 由来のβ-グルカンを抗原として健康人ボランティアの抗β-グルカン抗体力価を測定した。その結果、力価には顕著な個人差が見出された（Figure 3-1）。さらに、各種β-グルカンに対する力価を比較したところ、CSBG, AgHWE, ASBG<sup>44)</sup>, GRN<sup>45)</sup>, Y-Manの順であった。また、*A. brasiliensis*各抽出画分に対する反応性を比較したところ、AgHWEのみならず、AgCAならびにAgHAのいずれの画分に対しても反応性を示し（Figure 3-1b）、さらに個人差も認められた（Figure 3-2）。各個人ごとの特性について検討したところCSBG, AgHWE, ASBGに同等な力価を示す者、CSBG, AgHWEに高い力価を示す者など、各種β-グルカンに対する力価にも個人差が認められた。また、高力価者と低力価者では、約5倍の力価差を示した（Figure 3-2）。次に、CSBGと*A. brasiliensis*各抽出画分の交差反応性を比較したところ、各抽出画分を固相抗原とし

て用いた系において、各抽出画ならびに CSBG 間で顕著な競合反応を示した (Figure 3-3)。これらのことから、両グルカンは免疫学的に交差反応性を示すことが示唆された。



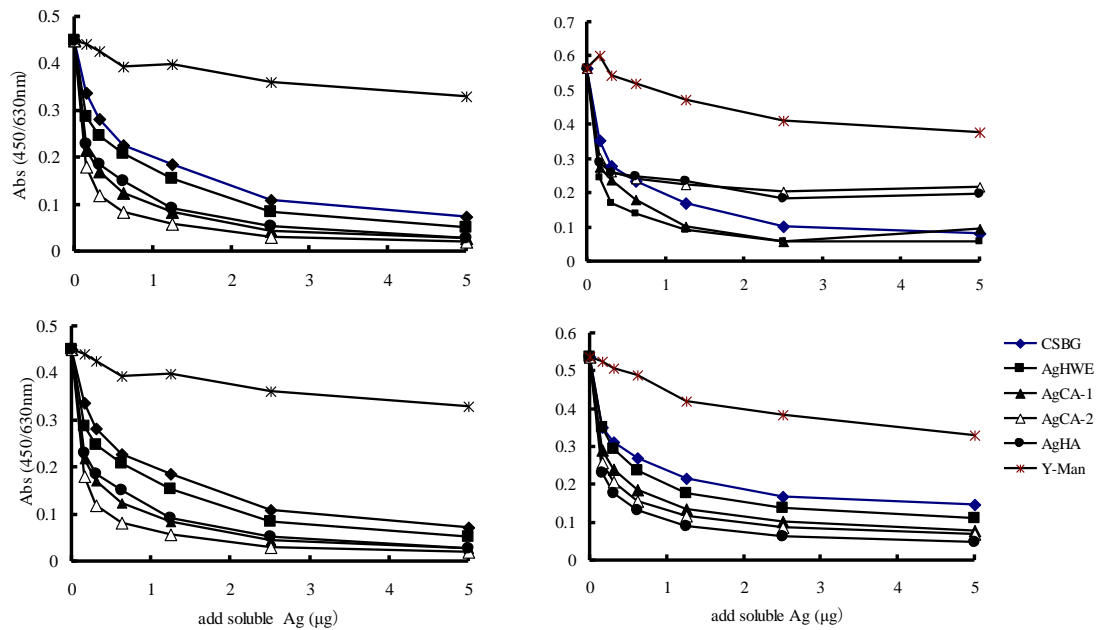
**Figure 3-1** Comparison of the reactivity of human sera to various polysaccharide-coated plates.

An ELISA plate was coated with a) each polysaccharide and b) *A. brasiliensis* extract (AgHWE, AgCA-1, AgCA-2, AgHA) (25 $\mu$ g/mL in carbonate buffer) and blocked by BSA before use. Sera were diluted and the amount of plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG+M+A antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate. Data from twenty healthy volunteers are shown.



**Figure 3-2** Comparison of the anti-BG antibody titer of individuals with high and low titers.

An ELISA plate was coated with CSBG (25 $\mu$ g/mL in carbonate buffer) and blocked by BSA before use. Sera were diluted ( $\times 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 10000, 20000$ ) and the amount of plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG+M+A antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate. Data from the sera of the individuals with low (n=4; open symbol) and high (n=2; close symbol) titers in Figure 3-1a are shown.



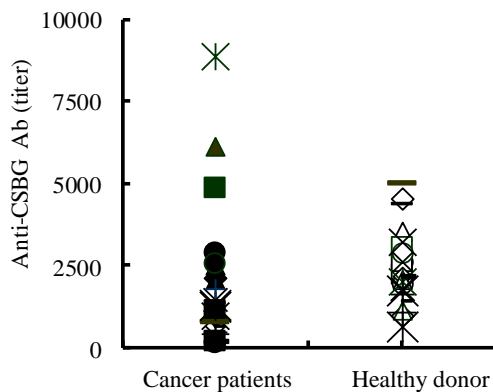
**Figure 3-3** Cross-reactivity of human sera to *A. brasiliensis* extracts

An ELISA plate was coated with *A. brasiliensis* extracts (a)AgHWE, b)AgCA-1, c)AgCA-2, d)AgHA, 25µg/mL in carbonate buffer). Sera were mixed with polysaccharides (CSBG or *A. brasiliensis* extracts (AgHWE, AgCA-1, AgCA-2, AgHA), Y-Man, 25µg/mL) and then applied to the ELISA plate. The amount of plate-bound Ab was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG+M+A antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate.

## 第二節 がん患者の抗β-グルカン抗体

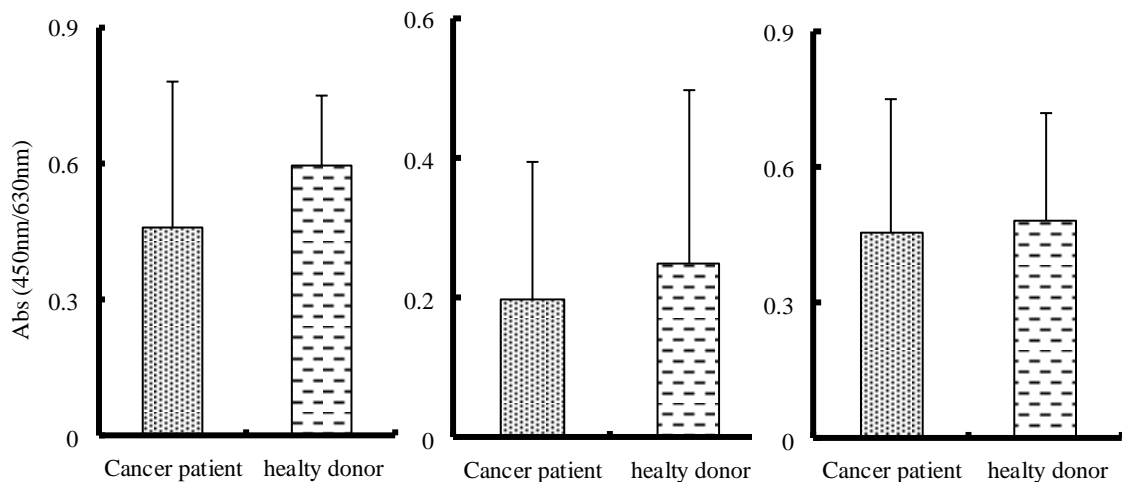
β-グルカンは免疫機能を修飾する物質であり、抗悪性腫瘍薬としても用いられていることから、この機能発現を抗β-グルカン抗体が修飾している可能性がある。そこで、東京衛生病院（当時）の水上市医師の協力のもと、癌患者の血清を入手し、抗β-グルカン抗体価を健常人と比較した。その結果、健常人と比べて、力価の個人差が著しく広がっていることがわかった。また、平均値のレベルでは癌患者が低力価を示した

(Figure 3-4)。クラス (isotype) ごとの差の比較も行ったが、顕著な差は見いだされなかった (Figure 3-5)。



**Figure3-4** Anti-CSBG antibody titer of cancer patients. ELISA plate was coated with CSBG (25µg/mL was used to coat plate). The sera of cancer patients (N=26) or healthy donor (N=24) was added to the plate, and the plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti Human IgG+IgM. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate.





**Figure3-5** Isotype reactivity of Anti-CSBG antibody titer of cancer patients.

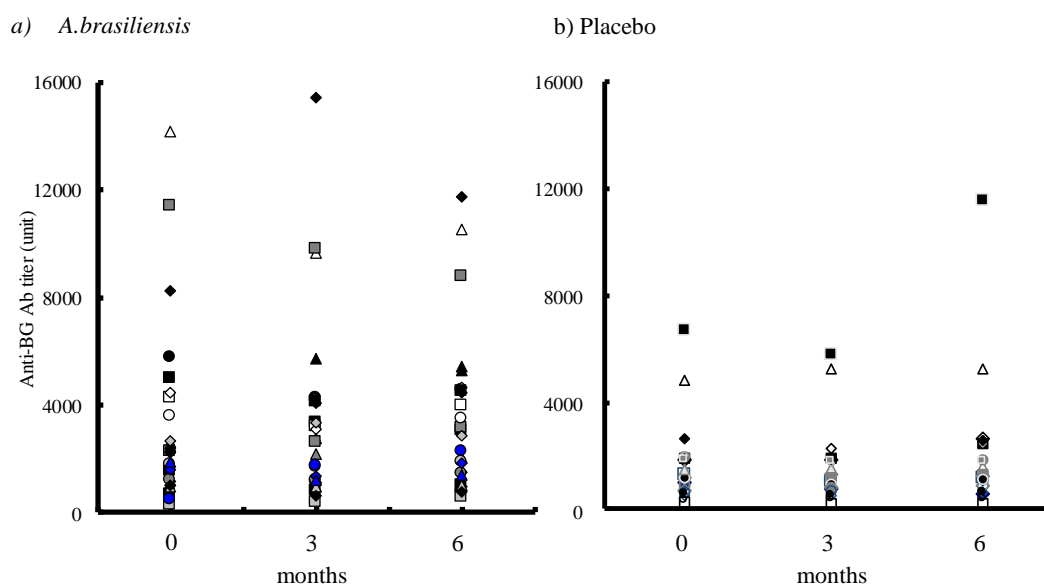
ELISA plate was coated with CSBG (25 $\mu$ g/mL was used to coat plate). The sera of cancer patients (N=26) or healthy donor (N=7) was added to the plate, and the plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti Human a)IgG, b)IgA or c)IgM. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate.

### 第三節 露地栽培アガリクス服用者における抗体価変化

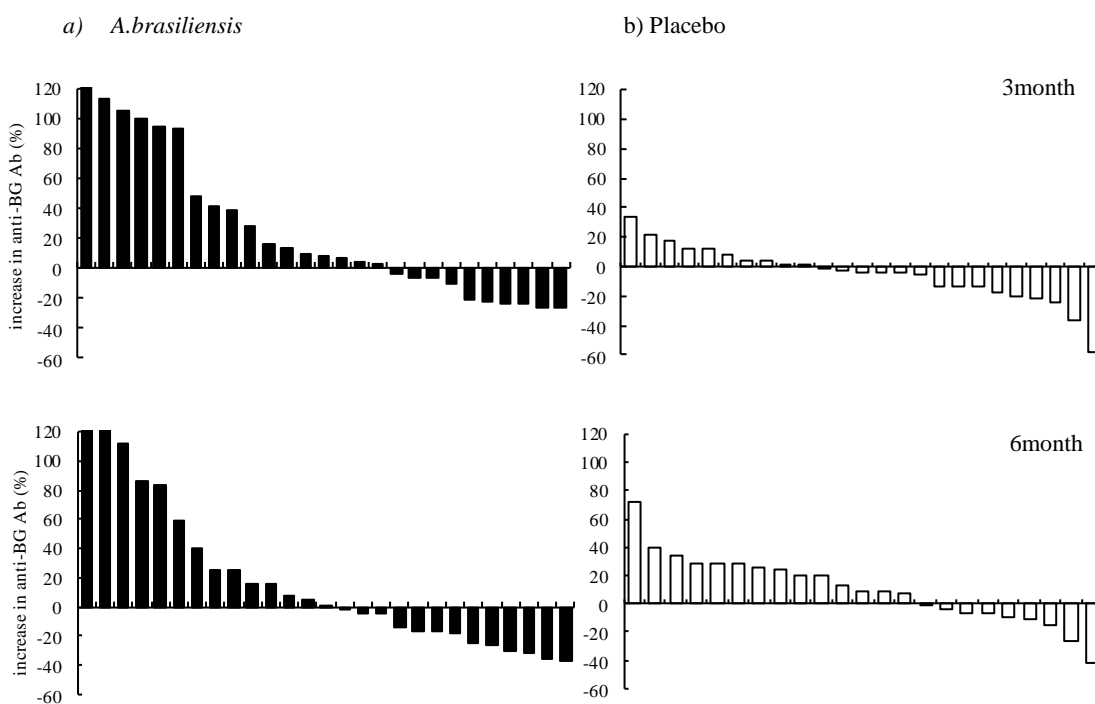
$\beta$ -グルカンは菌類子実体の主要構成多糖成分である。そこで次に、健康人（27例、年齢平均：43 $\pm$ 11、性別 男：13 女：14）に、6カ月間 *A. brasiliensis* を服用させ抗  $\beta$ -グルカン抗体力価の変化を検討した。服用前の平均力価が、3198 unitであったのに対し、3カ月服用では、3378 unit、6カ月服用では 3481 unit に上昇した (Figure 3-6)。

さらに、力価の個人差を除外するため相対的な増加率を算出したところ (Figure 3-7)、抗体価の増加率も上昇した。ただし、一部には抵抗性を示す者もあり、増加率にも個人差があった。一方、汎用抗原である卵白アルブミン (OVA) に対する抗体価は有意な変化は認められなかった。(Table 3-1)。Figure 3-8 には、4名の服用群における抗  $\beta$ -グルカン抗体ならびに抗 OVA 抗体の力価の経時的変化を示した。個々に特徴的な変化を示しているものの、全てで抗 BG 抗体が上昇した。一方、OVA に対する抗体価は、経時的な差は認められなかった (Figure 3-8)。これらの事から、*A. brasiliensis* の含有する  $\beta$ -グルカンによる抗原刺激によって抗体価が上昇したものと考えられる。

抗体はクラスごとに構造的ならびに機能的な特徴を有しているため、クラス (IgG、IgM、IgA) ごとの抗体価を調べたところ、IgG クラスの抗  $\beta$ -グルカン抗体の力価が最も高かった。IgM および IgA クラスの抗体も検出された (Figure 3-9)。さらに、*A. brasiliensis* 服用が各クラスの抗  $\beta$ -グルカン抗体価にどのような変化があるのか検討したところ、増加率に個人差があるものの IgG は平均増加率が 30.4%、IgM は 49.5%、IgA クラスは、服用後有意に増加し、最も高い平均増加率 90.3%を示した (Figure 3-10)。



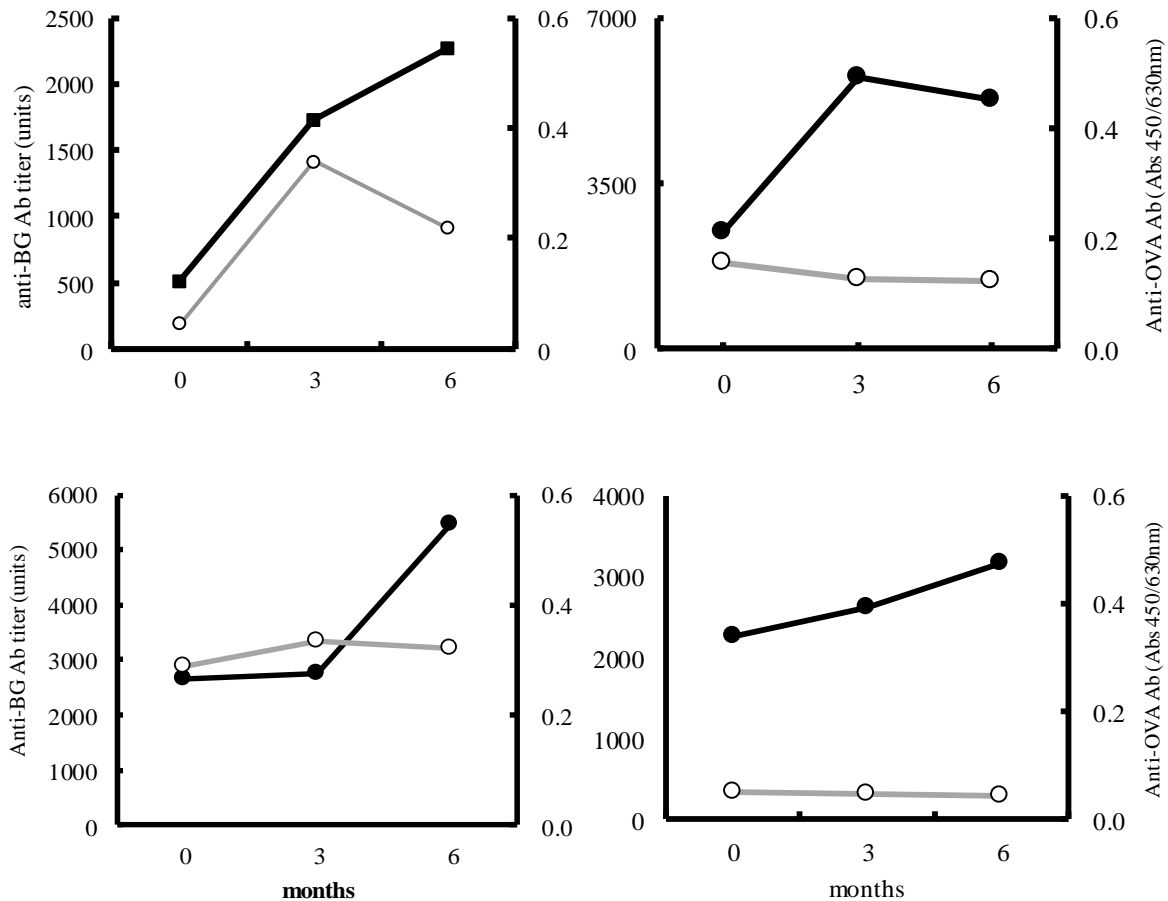
**Figure 3-6** Effect of the oral administration of the *A. brasiliensis* preparation on the anti-BG antibody titer  
 An ELISA plate was coated with CSBG (25µg/mL in carbonate buffer) and blocked by BSA before use. Sera were diluted and the amount of plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG+M+A antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate.



**Figure 3-7** Rate of increase in the anti-BG antibody titer in the *A. brasiliensis* or placebo group  
 The anti-BG antibody titer was measured by ELISA using CSBG-coated plates. The rate of increase in the titer was calculated with the following formula: Increase in anti-BG antibody titer (%) = (anti-BG antibody units after taking – anti-BG antibody units before taking the preparation) / anti-BG antibody units before taking the preparation.

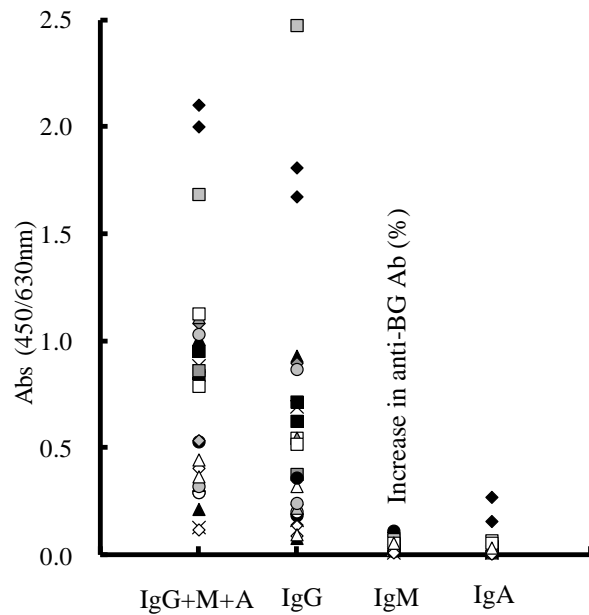
**Table 3-1** Increase in titers of anti-β-glucan and anti-OVA antibody in the *A. brasiliensis* group.

|          |               | average increase titer (%) |
|----------|---------------|----------------------------|
| 3 months | anti-β-glucan | 21.8 ±63.6                 |
|          | anti-OVA      | 13.8 ±50.5                 |
| 6 months | anti-β-glucan | 33.8 ±77.0                 |
|          | anti-OVA      | 7.17 ±42.2                 |

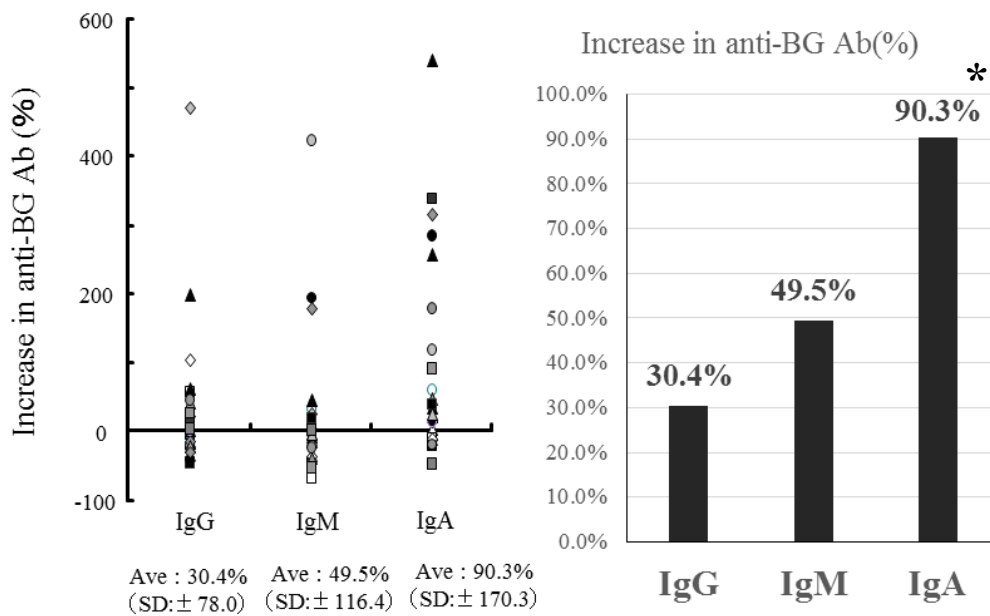


**Figure 3-8** Kinetics of anti-BG and anti-OVA antibody titers in volunteers taking the *Agaricus brasiliensis* preparation.

An ELISA plate was coated with CSBG (25µg/mL in carbonate buffer) and blocked by BSA before use. The Sera of human volunteers at 0, 3, and 6 months were added to the plate, and the amount of plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG+M+A antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate.



**Figure 3-9.** Comparison of anti-BG IgG, IgM, and IgA antibody titers in human sera. An ELISA plate was coated with CSBG (25µg/mL in carbonate buffer) and blocked by BSA before use. Sera were diluted and the amount of plate-bound Ig was determined with peroxidase-conjugated anti-human IgG, IgM, or IgA antibody. Enzyme activity was measured by the addition of TMB substrate. Data from twenty healthy volunteers are shown.



**Figure 3-10.** Comparison of the increase in the anti-BG IgG, IgM, or IgA antibody titer in *A. brasiliensis* group. The anti-BG IgG, IgM, or IgA antibody titer was measured by ELISA using CSBG-coated plates. The rate of increase in the titer was calculated. \* : Anti-BG IgA antibody was significantly increased after taking compared with before taking (p<0.01, paired t-test).

### 第三章 考察

本章では、*A. brasiliensis* の含有する  $\beta$ -グルカンに対してヒトは特異抗体を有しているかを検討するために、健常人ならびにがん患者血清を用いて、ELISA 法によって検討した。その結果、健常人は *A. brasiliensis* の  $\beta$ -グルカンに対する抗体を有していることが明らかとなった。また、ヒト抗体は病原性真菌 *Candida albicans* 由来の  $\beta$ -グルカンである CSBG と交差反応性を示したことから、この抗体は抗真菌感染免疫に寄与している可能性のあることがわかった。ボランティア個々の力価を比較すると、個人差が激しいことから、 $\beta$ -グルカン感受性には個人差があることが示唆された。また、がん患者血清を用いて抗  $\beta$ -グルカン抗体価を測定したところ、力価のばらつきは患者ごとに著しく激しくなったものの、抗体価が消失することは無かった。 $\beta$ -グルカンは免疫機能の強化のために汎用されており、抗  $\beta$ -グルカン抗体がどのように関与しているのか興味深い。

$\beta$ -グルカンに対する抗体が生じる理由については明確な答えは得られていない。病原真菌 *C. albicans* と交差反応性を示したことから、常在真菌ならびに環境中に存在する病原真菌による感染によって特異抗体が上昇した可能性がある。共同研究者は小児では抗  $\beta$ -グルカン抗体価が低いこと、ウシ胎児血清でも著しく抗体価が低いことを報告している<sup>40)</sup>。これらのことは、環境真菌の暴露によって抗体価が上昇した可能性のあることを強く示唆している。

一方、本研究では *A. brasiliensis* の摂取が抗  $\beta$ -グルカン抗体価にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、高頻度で力価が上昇することを見出した。このことは、環境真菌のみならず、食物として摂取している  $\beta$ -グルカンによっても抗  $\beta$ -グルカン抗体が上昇していることを強く示唆した。食品としては、海藻や発酵食品で  $\beta$ -グルカンを摂取するほか、アルコール飲料でも  $\beta$ -グルカンは摂取される。経口摂取された物質による抗体産生の誘導は、経口免疫寛容のために低レベルでしかないものと思われるが、本研究結果は、食品によって抗  $\beta$ -グルカン抗体が確実に誘導されることを示したものであり、今後、分子メカニズム等をさらに詳細に検討する必要性のあることを強く示唆している。

共同研究者である東京理科大学の岩倉らの研究グループでは、 $\beta$ -グルカンをマウスに経口投与することで、腸内菌叢の変化を誘導し、難治性の消化管疾患の改善効果を示すことを報告している。また、 $\beta$ -グルカン受容体欠損マウスではその効果が認められないことから受容体特異的な反応であるとしている。経口摂取された  $\beta$ -グルカンがどのように免疫系を強化するか、分子メカニズムはまだ十分に解明されていないが、消化管の  $\beta$ -グルカン受容体を介して機能改善が認められた可能性が高い<sup>46)</sup>。本研究では、アガリクスの摂取で抗  $\beta$ -グルカン抗体の力価が上昇することを見出した。さらに、IgA

クラスで最も顕著な増加が認められたことから、経口摂取することによって、皮膚や粘膜面の感染防御機能を強化している可能性のあることがさらに強く示唆された。

## 総括

アガリクスは、菌株、栽培条件及び産地によって安全性・機能性成分が異なるため、*A. brasiliensis* について、*in vitro* 及び *in vivo* からその安全性、ヒトにおける主観的評価、更に、ヒト抗 $\beta$ -グルカン抗体価におけるアガリクス服用者の効果とがん患者における抗 $\beta$ -グルカン抗体の比較検討を行い以下の知見を得た。

第一章では、*A. brasiliensis* について、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「マウス小核試験」、「マウスリンフォーマ TK 試験」を行い、いずれの試験でも変異原性ならびに遺伝毒性は陰性であったことから、本研究で用いた *A. brasiliensis* が機能性食品として安全であることを明らかとした。

第二章では、*A. brasiliensis* 摂取による生活の質 (QOL) の改善について健常人を対象とした臨床研究を行い、主観的・生理的評価項目の検証から、*A. brasiliensis* は、抜け毛、白髪、疲労感・倦怠感、目の疲れ、肩こり、手足の冷え、日中覚醒困難、目覚めの主観的な評価を改善する可能性があることを明らかとした。これらの有効性は、アガリクスの主要な有効性成分である $\beta$ -グルカンだけでなく *A. brasiliensis* に含まれる特徴的な成分、例えば、味覚、臭覚を正常化し食欲を増す亜鉛、疲労感を和らげるビタミンB群、ビタミンDなどの関与も考えられる。

第三章では、*A. brasiliensis* 子実体の主要構成成分である $\beta$ -グルカンの免疫化学的機能について検討した。既に共同研究者らは $\beta$ -グルカンの主な構造が、 $\beta$ -(1,3)-D-グルカンに高分岐した $\beta$ -(1,6)-D-グルカンであると報告している<sup>19,46,48)</sup>。また、機能性として、マウスにおける抗腫瘍効果<sup>19)</sup>、腎臓の保護作用<sup>15)</sup>、肝臓の保護作用<sup>14)</sup>、ラットにおける心臓の保護作用<sup>18)</sup>、ヒト臨床におけるNK細胞活性化作用、糖尿病や肥満の徴候を軽減する作用<sup>17)</sup>など、多様な生物学的活性を報告している。本章では、*A. brasiliensis* 由来の $\beta$ -グルカンの免疫化学的特徴付けをした。まず、ヒトが血中に抗 $\beta$ -グルカン抗体を有し、力価に個人差が著しいことを明らかにした。また、 $\beta$ -1,3-特異的ならびに $\beta$ -1,6-特異的なものの双方を含んでいた。さらに *A. brasiliensis* の経口摂取によって抗 $\beta$ -グルカン抗体が上昇することを見出した。さらに、IgA クラスの上昇が最も顕著であったことから、粘膜面の感染防御能の強化に有用であることが強く示唆された。

本研究では、特に第 2 章ならびに第 3 章において、食品として摂取した *A. brasiliensis* の機能性について臨床試験を用い、QOL の向上ならびに免疫機能を強化することを明らかにした。食品と免疫の関連性については多くの検討が進められている。例えば、病院食としては、“イムノニュートリエント”が開発され、免疫機能の強化に用いられている。代表的な成分としては、アルギニンが上げられる<sup>49)</sup>。また、飢餓状態では免疫能が低下し感染症が起きやすい状況となることが良く知られており、良質の食事を摂ること自身も免疫能の増強に重要である。この点については、WHO が世界中の難民キャンプに向けてキャンペーンを実施している。また、食品メーカーを中心に多数の食品について免疫機能の強化を指標として解析が進められているが、まだ、明確な方向性が提示されていない状況にある。これらを解決するためには、食品を中心とした消化管免疫機構の詳細な解明が待たれる。近年になって、難治性の消化管疾患に対して健常人の常在微生物叢が治療効果を示すことが報告され<sup>50)</sup>、免疫と常在微生物叢、さらには常在微生物叢と食品の関連性の解析が注目されている。消化管には多くの自然免疫受容体が発現しており<sup>51,52)</sup>、自然免疫研究と食品との関係を追及することの意義はますます高まりつつある。本研究で用いた *A. brasiliensis* の主要構成多糖である  $\beta$ -グルカンの自然免疫受容体は dectin-1 であることを共同研究者らと共に明らかにしてきた。Dectin-1 は消化管に高頻度に発現しており、海藻由来の  $\beta$ -グルカンの摂取によって難治性消化管障害が軽減されることが動物モデルで明らかにされた<sup>53)</sup>。本研究で見出された QOL の向上や抗  $\beta$ -グルカン抗体の上昇にも、本機構が関わっている可能性もあり、更なる研究が期待される。

*A. brasiliensis* は多数の有用成分を含有している。申請者が本研究を始めるきっかけはブラジルの家庭では、健康増進のために *A. brasiliensis* の冷水抽出エキスを食事とともに常用していたこととの出会いである。*A. brasiliensis* の冷水抽出物の解析によって、ポリフェノール酸化酵素、ラッカーゼ、チロシナーゼ等の抗酸化酵素の存在が見出された<sup>22)</sup>。また、これらの酵素によって重合した重合ポリフェノールは免疫機能を増進させる活性を有していることを *in vitro* や動物実験モデルで明らかにしてきた<sup>54-56)</sup>。消化管免疫の向上を考える上において、多糖を介した自然免疫の向上は重要であるが、それ以外の成分による機能の向上も重要であろう。これらについても基礎ならびに臨床研究を積み重ね、解明すべき課題である。

緒論に述べたとおり、我国は超高齢社会となり、医療費は 40 兆円を超え、国の財政を圧迫している。個々の国民の健康長寿を達成すること、また病に侵された患者に最高の医療を提供することは国の使命である。一方で、国の財政基盤となる税収が減じてくることは人口ピラミッドの構造からも明確であり、両方を達成することは難題である。これは、第二次大戦を経験した世界中のヒトが共通に抱える課題でもある。長寿社会で

医療費を削減するためには、先端技術の更なる開発とセルフメディケーションを通じた自らの健康意識の向上の双方を上手くかみ合わせて進める必要がある。

21 世紀における国民健康づくり運動:健康日本 21 は、21 世紀における国民健康づくり対策を、具体的数値目標を掲げ行ってきた。それは悪性新生物（がん）、高血圧、糖尿病、心疾患、脳血管疾患などの生活習慣病を予防するための行動を国民に促すことにより、壮年期での死亡を減らし、介護なしで生活できる健康寿命の延伸及び生活の質の向上を実現することを掲げての施策である。すなわち、生活習慣の悪化によって疾病が生じるのだから、生活習慣を向上させようとするものである。これは、一般薬を用いたセルフメディケーションの向上と生活習慣改善という二つの側面を持っている。前者は薬学が中心となって推進すべき課題である。後者を更に具体的に展開するために「未病」という用語も汎用されるようになった。未病については、日本未病研究学会、日本未病システム学会、未病医学研究センター、未病リサーチスクエア協会、未病産業研究会など多くの団体が積極的な対応を進めている。また、神奈川県は「未病を治すかながわ宣言」を定め、県民の健康増進を図っている。健康増進法第二条では国民の責務を掲げており、「国民は、健康な生活習慣の重要性に対する関心と理解を深め、生涯にわたって、自らの健康状態を自覚するとともに、健康の増進に努めなければならない。」とされている。上記の活動は、国民が健康に関する意識を高めるための生涯学習の一環と捉えることもできる。

消費者庁は食品の表示方法について様々な制度を設置しており、平成 27 年 4 月より「機能性表示食品」の制度 [http://www.caa.go.jp/foods/todoke\\_1-100.html](http://www.caa.go.jp/foods/todoke_1-100.html) が開始された。すでに多くの食品が HP 上に記載されており、国民がそれらの情報を十分に理解し、食生活を改善する方向に向かうことが期待される。

本研究は食品の機能性を通じて健康増進を図ろうとするものであり、国民の健康増進に貢献できるものと考えている。このような栄養価を豊富に含み、安全性、機能性のエビデンス（科学的裏付け）のある機能性食品の積極的な摂取とその人にあった適度な運動が、人々の免疫力増強・感染防御に繋がり、未病から健康に、そして、健康長寿に、更に医療費の低減化に繋がることが期待される。



## 謝辞

本研究並びに本論文の作成にあたり、終始薬学の観点や 21 世紀のあるべき医療の姿から懇切なるご教授、ご指導を賜りました東京薬科大学の大野尚仁教授に心より深く感謝申し上げます。

同じく温かくご指導、ご助言賜りました東京薬科大学薬学部免疫学教室の安達禎之准教授ならびに同教室の皆さまと同大学薬学部の三浦典子准教授に感謝申し上げます。また、免疫学教室の石橋健一講師、山中大輔助教には研究や論文作成の細部にわたってご指導頂きました。深く感謝致します。

本研究に際し、日米欧の医療の大きな違いなど、貴重なご意見と識見をご教授頂きました健康増進クリニック院長の水上治先生、ならびに、未病医学の重要性や世界最先端の情報をご教授頂いた未病医学研究センター所長、東京大学食の安全研究センター特任教授、ハーバード大学公衆衛生学主任研究員の天野暁（劉影）先生に感謝致します。同じく現在の日本の医療状況や将来の医療体制等のあるべき姿について、ご教授頂いた食の効能普及全国会議会長の中嶋茂会長に感謝いたします。

また、本研究に際し、数多くの試料提供など全面的なご協力を頂きましたブラジルのアガリクス農場のカルロス・ロドリゲス氏や農場の皆さま、そして、南米やヨーロッパなどの現地をご案内頂き、医療状況をご教授頂いた今井庸浩氏に感謝致します。

最後に私の研究活動に理解を示し、支援を頂いた会社の皆さま、友人、家族に深く感謝致します。

有難うございました。

## 研究結果の掲載誌

本博士学位申請論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

### 第一章

Safety Study of Culinary - Medicinal Royal Sun Agaricus, *Agaricus brasiliensis*  
S.Wasser et al. KA21 (Higher Basidiomycetes) Assessed by Prokaryotic as well as  
Eukaryotic Systems

Masuro Motoi, Naohito Ohno

*International journal of Medicinal Mushrooms*,14(2):135-148(2012)

### 第二章

Open-Label Study on the Influence of Food Containing the Royal Sun  
Mushroom, *Agaricus brasiliensis* KA21 (Higher Basidiomycetes ), on the  
Quality of Life Healthy Human Volunteers

Masuro Motoi, Akitomo Motoi, Daisuke Yamanaka, Naohito Ohno

*International journal of Medicinal Mushrooms*, 17(9):799-817(2015)

### 第三章

Effect of Oral Administration of Dried Royal Sun Agaricus, *Agaricus brasiliensis*  
S. Wasser et al. (Agaricomycetidae), Fruit Bodies on Anti- $\beta$ -Glucan antibody  
Titers in Humans

Ken-ichi Ishibashi, Masuro Motoi, Ying Liu, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi,  
Naohito Ohno

*Internatinal journal of Medicinal Mushrooms*,11(2):117-131(2009)

Anti  $\beta$ -Glucan Antibody in Cancer Patients (Preliminary Report)

Masuro Motoi, Ken-ichi Ishibashi, Osamu Mizukami, Noriko N. Miura, Yoshiyuki  
Adachi, Naohito Ohno

*Internatinal jorrnal of Medicinal Mushrooms*,6(1):41-48(2004)

## 引用文献

- 1) R J Williams. Kanyaku : Izumitani K, Karada no Kinou wo Kaihatu suru Daiichisyo Chuokoron-Sha, (1985)
- 2) Kojima S. Tokaigakuin jositandai kiyou, **31**, 37-46 (1996)
- 3) Kagakugijututyou sigentyousakai 5tei syokuhin seibunhyo
- 4) Wang X,Qin X, Demirtas H,Li J,Mao G,Huo Y,Sun N,Liu L,Xu X. *Lancet*, **369**, 1876-1882 (2007)
- 5) Ntaios G,Savopoulos C,Karamitsos D,Economou I,Destanis E,Chryssogonidis I,Pidonia I,Zebekakis P,Polatides C,Sion M,Grekas D,Hatzitolios A. *Internat J Cardiol.*, **143**, 9-16 (2010)
- 6) Kagawa Y.*Rinsyo eiyou* ,**120** , 398-399 (2012)
- 7) Kagawa Y. *Nppon byotai eiyo gakkashi*, **12** ,311-335 (2009)
- 8) Simura K. et all. 39th.Nippon gangakkai sokai Dai28hou(1980)
- 9) Hyodo I,Amano N,Eguchi K,Narabayashi M,Imanishi J,HiraiM,NakanoT, Takashima S. *Journal of Clinical Oncology*, **23**,2645-2654 (2005)
- 10) Kouseirodosho iyaku shokuhin kyoku tsuti 0213001 (2006)
- 11) Mukai H,Watanabe T,Ando M,Katsumata N. *Jpn J Clin Oncol.*,**36**, 808-810 (2006)
- 12) Kouseirodosho iyaku shokuhin kyoku tsuti hodo shiryō 20 Mar (2006)
- 13) Kouseirodosho iyaku shokuhin kyoku tsuti 0703 (2009)
- 14) Yamanaka D, Motoi M, Motoi A, Ohno N. *BMC complement Altern Med.*, **14**, 454- (2014)
- 15) Furukawa M,Miura NN,Adachi Y,Motoi M,Ohno N. *Int J Med Mushrooms* , **8**,115-128 (2006)
- 16) Niwa A, Tajiri T, Higashino H. *J. Clin Biochem Nutr.*, **48**, 194-202 (2011)
- 17) Liu Y, Fukuwatari Y, Okumura K,Takeda K, Ishibashi K, Furukawa M, Ohno N, Mori K, Ming G, Motoi M. *e-CAM.*, **5**, 205-219 (2008)
- 18) Tsubone T, Makimura Y, Hanafusa M,Yamamoto Y, Tsuru Y,Motoi M, Amano S. *J Med Food*, **17** 295-301 (2014)
- 19) Ohno N,Furukawa M,Miura NN,Adachi Y,Motoi M,Yadomae T. *Biol Pharm Bull.*,**24**,820-828 (2001)
- 20) Kouseirodosho iyaku shokuhin kyoku tsuti 0920(2012)
- 21) Busch DB,Bryan GT. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **10**,397-410(1987)

- 22) Hashimoto S, Akanuma AM, Motoi M, Imai N, Rodrigues CA, Nameda S, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Int J Med Mushrooms*, **8**, 329-341(2006)
- 23) Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. *Psychiatry Res.*, **28**, 193-213 (1989)
- 24) Carpenter JS, Andrykowski MA. *J Psychosom Res.*, **45**,5-13 (1998)
- 25) Doi Y, Minowa M,Uchiyama M,Okawa M,Kim K,Shibui K,Kamei Y. *Psychiatry Res.*, **97**,165-72 (2000)
- 26) Rios-Hernandez M, Dos-Santos NJ, Silvia-Cardoso,Bello-Garciga JL, Pedroso M. *Arch Med Res.*, **25**, 179-80 (1994)
- 27) Stone BB, Clarke AE. Chemistry and biology of (1→3)-β-glucans Australia *La Trobe University Press*,1992
- 28) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. *Curr opin immunol*, **9**,684-93 (1997)
- 29) Taguchi T. *Lentinan Gan To Kagaku RYoho*, **13**,3294-304 (1986)
- 30) Fujimoto S, Furui H, Kimura T, Kondo T, Orita K, Taguchi T, Yoshida K, Ogawa N. *Eur J Cancer*, **27**, 1114-8 (1991)
- 31) Brown GD, Gordon S. *Nature*, **413**,36-7 (2001)
- 32) Ross GD, Cain JA, Myones BL,Newman Sl, Lachmann PJ. *Complement*, **4**, 61-74 (1987)
- 33) Zimmerman JW, Linderemuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. *J Bioi Chem.*, **273**, 22014-20(1998)
- 34) Schroeder H.W. Jr., Cavacini L. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, 41-52 (2010)
- 35) Underhill DM, Goodridge HS. *Nat Rev Immunol.*,**12**, 492-502 (2012)
- 36) Aderem A, Underhill DM. *Annu Rev Immunol.*, **17**, 593-623 (1999)
- 37) Uchiyama M, Ohno N, Miura NN, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Yadomae T. *Bio Pharm Bull.*, **23**, 672-6 (2000)
- 38) Masuzawa S,Yoshida M, Ishibashi K, Saito N, Akazhi M, Yshikawa N, Suzuki T, Nameda S, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Drug Dev Res.*, **58** 179-89 (2003)
- 39) Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. *Biol Pharm Bull.*, **26**, 1225-8(2003)
- 40) Ishibashi K, Dogasaki C, Iriki T, Motoi M, Kurone Y, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Int J Med Mushrooms*, **7**, 533-45 (2005)
- 41) Ishibashi K, Yoshida M, Nakabayashi I, Shinohara H, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **44**, 99-109 (2005)
- 42) Yoshida M, Ishibashi K, Hida S, Yoshikawa N, Nakabayashi I, Akashi M, Watanabe T, Tomiyasu T, Ohno N. *Clin. Rheumatol.*, **28**, 565-571 (2009)

- 43) Ohno N, Uchiyama M, Tsuzuki A, Tokunaka K, Miura NN, Adachi Y, Aizawa MW, Tamura H, Tanaka S, Yadomai T. *Carbohydr Res.*, **316**, 161-172 (1999)
- 44) Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **42**, 155-66 (2004)
- 45) Ohno N, Suzuki I, Oikawa S, Miyazaki T, Yadomae T. *Chem Pharm Bull.*, **32**, 1142-51 (1984)
- 46) Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y. *Cell Host Microbe.*, **2**, 183-97(2015)
- 47) Ohno N, Akanuma Am, Miura NN, Adachi Y, Motoi M. *Pharm Pharmacol Lett.*, **2**, 87-90 (2001)
- 48) Yamanaka D, Tada R, Adachi Y, Ishibashi K, Motoi M, Iwakura Y, Ohno N. *Internatinal Immunopharmacology*, **14**, 311-319 (2012)
- 49) Kang K., Shu X.L., Zhong J.X., Yu T.T. *Asia Pac J Clin Nutr.*, **23**, 351-359 (2014)
- 50) Rossen NG, MacDonald JK, Vries EM, D'Haens GR, Vos WM, Zoetendal EG, Ponsioen CY. *World J Gastroenterol*, **21**, 5359-5371 (2015)
- 51) Chu H, Mazmanian SK. *Nat Immunol.*, **14**, 668-675 (2013)
- 52) Fukata M, Arditi M. *Mucosal Immunol.*, **6**, 451-463 (2013)
- 53) Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y. *Cell Host Microbe*, **18**, 183-197 (2015)
- 54) Yamanaka D, Tamiya Y, Motoi M, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *PLoS ONE*, **7**, e36025 (2012)
- 55) Yamanaka D, Motoi M, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Food Chemistry*, **141** 4073-4080 (2013)
- 56) Yamanaka D, Tajima K, Adachi Y, Ishibasi K, Miura NN, Motoi M, Ohno N. *Journal of Functional Foods*, **6**, 513-522 (2014)