

氏名（本籍）	<small>もとい</small> 元井 <small>ますろう</small> 益郎（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 347 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	露地栽培アガリクスの機能性に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 大野 尚仁 教授 杉浦 宗敏 教授 野口 雅久 教授 新槇 幸彦

論文内容の要旨

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。『日本の将来推計人口』によれば、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。また、高齢化に伴い国民医療費の増加は必至であり、増加を防ぐ手立ては、喫緊の課題である。その中で注目されてきたのが病気になる前のいわゆる未病段階での対策である。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し、健康寿命を延伸し、結果的に医療費、介護費などの抑制に繋がる。日本人の食生活は動物性高脂肪食などの欧米型に移行しているので、バランスの良い食生活のためには、それらを整え補う「機能性食品」の素材の開発と研究が重要である。

アガリクス、学名 *Agaricus brasiliensis* はブラジル原産の担子菌であり、日本ではヒメマツタケやカワリハラタケなどとして健康食品素材として用いられてきた。申請者は 1995 年から 20 年間にわたり本菌について多面的に開発研究に携わってきた。本研究では、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）された、*Agaricus brasiliensis* KA21 株（以下、*A. brasiliensis* と略）を用い、露地栽培アガリクスの機能性について検討した。

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」で構成されている。

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

アガリクスは古くから健康食品素材として我国で汎用されてきたが、2006年には輸入された本菌由来の食品による健康被害の報告がなされ、安全性についてさらに詳細に検証する必要性に迫られ

た。申請者は、本研究に着手するにあたり、まず本菌株の安全性について検討することとした。そこで、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「マウス小核試験」、ならびに「マウスリンフォーマ TK 試験」を実施した。復帰突然変異試験では、検体を粉末として注射用水に懸濁し、50 から 5000 μ g/plate の濃度範囲で評価した。また、代謝的活性化を評価するために S9mix 存在下および非存在下で検討した。その結果、変異コロニー数は、被験物質中のアミノ酸含量相当しか認められず、変異原性は否定された。マウス小核試験では、シクロホスファミドを陽性対象として検定した。その結果、小核の出現頻度ならびに赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれも陰性対照群と検体投与群との間で有意差を認めなかったことから、小核の増加作用を示さないことが分かった (Table)。また、マウスリンフォーマ TK に対しても細胞毒性を示さなかった。さらに、共同研究者とともに、健常人に 6 か月にわたり *A. brasiliensis* を摂取させたところ、特別な有害事象は認められなかった (eCAM Vol. 5 (2) 205-219. 2008)。これらのことから、本研究で使用している *A. brasiliensis* は細菌、細胞、マウス、ヒトのいずれにおいても安全が高いことを明らかとした。

第二章 露地栽培アガリクスの機能性臨床研究

近年の研究により、*A. brasiliensis* は、 β -グルカンやビタミン D を多量に含むことが報告されている。また、製品化の過程を工夫することで、ペルオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ラッカーゼなどの抗酸化酵素を有していることを確認している。また、これまでの臨床研究において、*A. brasiliensis* の摂取により、免疫機能を賦活する結果 (NK 細胞の活性化) が得られている。しかしながら、*A. brasiliensis* の Quality of Life (QOL) の改善を中心とした機能性については知見が得られていない。そこで今回、*A. brasiliensis* を含有する食品の QOL 改善効果を調査

Table Results of mouse micronucleus test at 24h after administration (5 mice each)

Group		Cell Counts		Percent PCE	MPCE per 2000 PCE	P Value for MPCE**
		PCE	NCE			
Control	Mean	76.2	123.8	0.381	5	
	SD	9.12	9.12		2.24	
Test (1000mg/kg)	Mean	87.8	112.2	0.439	1	
	SD	9.73	9.73		0.71	
Positive control*	Mean	73	127	0.365	30.2	0.00
	SD	13.55	13.55		19.28	

*Oral administration of 100 mg/kg cyclophosphamide.

**P<0.05 was considered statistically significant.

PCE: polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes;

MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes.

することを目的として、*A. brasiliensis* 含有食品を 12 週間連続摂取するオープン試験を行った。登録被験者数は 24 名とし、被検食品を 12 週間摂取させ、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 のアンケート調査を行った。被験者に摂取開始から 6 週後（43 日目）および 12 週後（85 日目）に、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アンケート記入を実施した。また、12 週目には上記検査に追加して、一般臨床検査（血液）も行った。その結果、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が、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。また、抜け毛の量、白髪の量、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た。また、水虫症状についても改善傾向を示した。このように *A. brasiliensis* は多彩な生理機能増強効果を示したことから、この効果は主要成分である β -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 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

担子菌子実体の多糖類に関する体系的な研究によって、*A. brasiliensis* の子実体は、10%以上の β -グルカンを含み、免疫調節作用を示す β -グルカンの主な構造は、 β -(1,3)-D-グルカンに高分岐は、マウス

における抗腫瘍効果、腎臓の保護作用、肝臓の保護作用、ラットにおける心臓の保護作用、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など、多様な生物学的活性が報告されている。本章では、*A. brasiliensis* の含有する β -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、 β -グルカンを固相とした ELISA 法によって検討した。

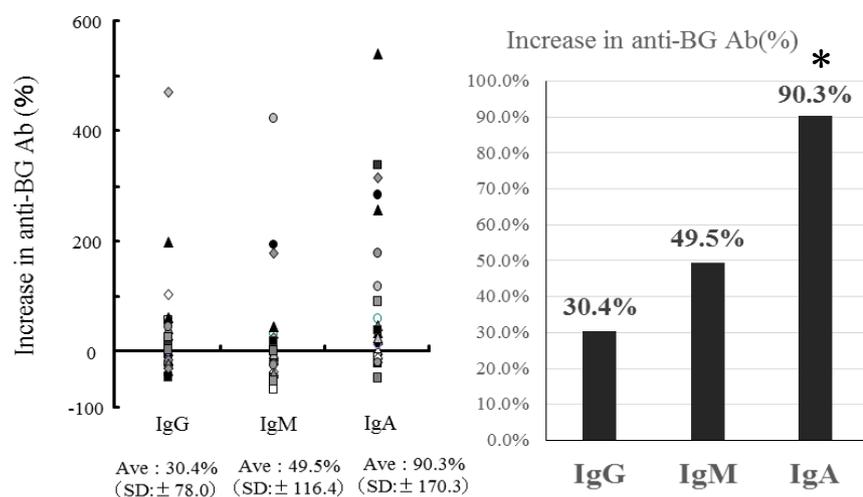


Figure Comparison of the increase in the anti-BG IgG, IgM, or IgA antibody titer in *A. brasiliensis* group. The anti-BG IgG, IgM, or IgA antibody titer was measured by ELISA using CSBG-coated plates. The rate of increase in the titer was calculated. * : Anti-BG IgA antibody was significantly increased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

その結果、1) 健常人は *A. brasiliensis* の β -グルカンに対する抗体を有していた。また、2) ヒト抗体は病原性真菌 *Candida albicans* 由来の β -グルカンである CSBG と交差反応性を示した。これらのことから、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。さらに、3) ボランティア個々の力価を比較すると、個人差が顕著であることから、 β -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、4) 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 β -グルカン抗体の力価が最も高く、IgM および IgA クラスの抗体も検出された。また、5) *A. brasiliensis* 服用が各クラスの抗 β -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 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)。また、6) がん患者血清を用いて抗 β -グルカン抗体価を測定したところ、力価は患者ごとにさらに著しく異なったが、抗体価が消失することは無かった。 β -グルカンは免疫機能の強化のために汎用されており、抗 β -グルカン抗体がどのように関与しているのか興味深い。

β -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が無い。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 β -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。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。

総括

アガリクスは、ブラジル原産で、日本では「ヒメマツタケ」や「カワリハラタケ」として知られており、機能性食品の原料やサプリメントとして広く使用されてきた。担子菌の子実体（茸）は、菌株、栽培条件及び産地によって安全性・機能性成分が著しく異なる可能性があるため、菌株ごと、栽培条件ごとに評価することが必要である。本研究では原産国で露地栽培された *A. brasiliensis* を使用した。本研究では、*A. brasiliensis* について、*in vitro* 及び *in vivo* からその安全性を明らかにし、ヒト臨床試験を行い QOL 改善効果を示すことを明らかにした。又、*A. brasiliensis* の摂取で抗 β -グルカン抗体の力価が上昇することを見出した。更に、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示唆された。

申請者らの研究グループでは、長年にわたり機能性食品の開発研究を行ってきた。20 世紀後半には、末期がん患者の QOL 改善効果が強く意識されたが、エビデンスレベルが低く、科学的には低迷した。近年になって自然免疫研究が進展すると共に担子菌の菌体成分に対する特異的受容体が発見され、機能発現が分子レベルで解析されるよ

うになってきた。また、超高齢社会の到来によって未病への期待が強くなったことから機能性食品への期待がさらに高まってきた。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つた適度な運動が、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。

【研究結果の掲載誌】

Int. J. Med. Mushrooms, 6, 41-48 (2004); *Int. J. Med. Mushrooms*, 11, 117-131 (2009);
Int. J. Med. Mushrooms, 14, 135-148 (2012); *Int. J. Med. Mushrooms*, **9**, 799-817 (2015)

論文審査の結果の要旨

日本は高齢化が著しく進みつつあり、国民医療費の増加をもたらしている。これを防ぐ手立ての実施は、喫緊の課題であり、「機能性食品」素材を開発することは予防医学的視点から重要である。アガリクス、学名 *Agaricus brasiliensis* はブラジル原産の担子菌であり、申請者は長年にわたり多面的に開発研究に携わってきた。本研究では、露地栽培アガリクス (*A. brasiliensis*) の機能性について検討した。

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」では、*A. brasiliensis* の安全性について検討するため、1) 細菌を用いる復帰突然変異試験、2) マウス小核試験、ならびに 3) マウスリンフォーマ試験を実施した。1) では、検体を粉末とし S9mix 存在下および非存在下に検定した。その結果、変異コロニー数は、被験物質中のアミノ酸含量相当しか認められず、変異原性は否定された。2) では、シクロホスファミドを陽性対象として検定した。その結果、小核の出現頻度ならびに赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれも陰性対照群と検体投与群との間で有意差を認めなかった。3) ではリンフォーマに対して細胞毒性を示さなかった。これらのことから、本菌株は十分な安全性を示すことを明らかとした。

第二章「露地栽培アガリクスの機能性臨床研究」では、*A. brasiliensis* の Quality of Life (QOL) の改善効果を調査することを目的として、被験食品を 12 週間連続摂取するオープン試験を行った。登録被験者数は 24 名とし、摂取開始から 6 週間および 12 週後に、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アンケート記入を実施した。また、12 週目には一般臨床検査（血液）も行った。その結果、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た。これらのことから、当該食品は QOL 改善効果を有することを明らかにした。

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」では、当該食品の摂取による抗 β -グルカン抗体力価への影響について、ELISA 法によって検討した。その結果、1) 健常人は *A. brasiliensis* の β -グルカンに対する抗体を有していること、2) がん患者血清も抗 β -グルカン抗体を有するが、力価の変動幅が激しいこと、3) この抗体は病原性真菌 *Candida albicans* 由来の細胞壁 β -グルカンと交差反応性を示したことから、抗真菌感染免疫に寄与している可能性のあること、4) 当該食品を摂取すると抗 β -グルカン抗体力価が上昇することから真菌に対する感染防御能が上昇する可能性があることを明らかにした。

以上、本論文は *A. brasiliensis* の機能性食品としての安全性と機能性について基礎的ならびに臨床的視点から明らかにし、国民の健康寿命の延伸や高齢化対策として有用な機能性食品素材を開発した。したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文として相応しい価値あるものと判断する。