【原 著】

健常者におけるシイタケ菌糸体抽出物配合顆粒の免疫機能に及ぼす影響

Evaluation of Immune Function of Healthy Volunteer Treated with Oral Lentinula Edodes Mycelia Extract

川西 貴^{1,2}, 松井保公^{2,*}, 永山在明^{1,3}
Takashi KAWANISHI^{1,2}, Yasunori MATSUI^{2,*}, Ariaki NAGAYAMA^{1,3}¹ 福岡天神南クリニック² 小林製薬中央研究所³ 福岡大学

【要 旨】

シイタケ菌糸体抽出物は癌患者における免疫機能および QOL を維持・改善することが報告されている。本研究では、健常者 10 名を対象に免疫機能に及ぼすシイタケ菌糸体抽出物の影響を検討した。福岡天神南クリニックにて 10 症例を対象にシイタケ菌糸体抽出物を 20 週間（平均 846 mg/day）連日経口摂取させ、摂取前後の免疫機能（IFN γ 産生量、IL-10 産生量、リンパ球サブセット）を評価した。シイタケ菌糸体抽出物摂取後の免疫機能は、IFN γ 産生量が上昇傾向、IL-10 が低下傾向を示し、IFN γ /IL-10 産生比は有意に改善した。制御性 T 細胞などのリンパ球サブセットは摂取前後で有意な変化は観察されなかった。摂取期間中の有害事象は観察されなかった。シイタケ菌糸体抽出物の経口摂取は健常成人の免疫機能を改善する作用を持つことが示唆された。

【キーワード】

免疫機能, サイトカイン, 制御性 T 細胞,
シイタケ菌糸体抽出物

はじめに

シイタケは東アジアで長く食用として利用される一方、古くからその有用性が知られている。なかでもシイタケの子実体から抽出されたレンチナンは抗腫瘍活性及び免疫調節作用を有することが報告され¹⁾、抗腫瘍医薬品として 1985 年に本邦において承認されている。シイタケの菌糸体抽出物は、シイタケの菌糸を固形培地で培養後、熱水抽出し粉末化した茶褐色のエキスパウダーである。その成分は単一ではなく、抗酸化作用と肝臓保護作用を持つシリンガ酸・パニリン酸や免疫調節作用のある α グルカンやアラビノキシランなどが含まれている^{2, 3)}。安全性については、変異原性試験、染色体異常試験、ラット反復投与試験、ヒト投与安全性試験が報告されており⁴⁻⁶⁾、経口製剤としての高い安全性が確認されている。シイタケ菌糸体抽出物は in vivo では、免疫機能低下モデルマウスにおいて、制御性 T 細胞の増加を中心とする免疫抑制状態を改善すること、IL-6 などの炎症を抑えること、腸管免疫を制御することが報告されている⁷⁻⁹⁾。

臨床研究においては、術後補助化学療法を施行しているがん患者など免疫機能が低下している状態での摂取で、免疫機能や QOL の低下を抑制することが複数報告されている¹⁰⁻¹⁵⁾。加えて、肝機能値の改善効果も報告されている¹⁶⁾。

しかしながら、健常者を対象とした免疫機能に及ぼす影響についてはこれまで十分な報告がなかった。本試験では、一般成人を対象として、シイタケ菌糸体抽出物の免疫機能に及ぼす影響を検証することを目的とした。

受理日：2018 年 2 月 2 日

* 〒567-0057 大阪府茨木市豊川 1-30-3 小林製薬中央研究所 Tel: 080-3452-9761 E-mail: y.matsui@kobayashi.co.jp

材料・方法

1. シイタケ菌糸体抽出物

シイタケ菌糸体抽出物は既報に基づいて製造されたものを使用した（小林製薬株式会社製造）。すなわち、バガスと米ぬかの固形培地にシイタケ菌糸体を接種後5ヶ月培養したものを、熱水抽出して得られたエキスを粉末を用いた。品質管理項目として、有用成分として報告されているアラビノキシランを2.2 % 以上（アラビノースとキシロースの総量として）、シリング酸 0.45 mg/g、バニリン酸 0.37 mg/g を設定し、この基準を満たしたエキスを試験に用いた。

2. 試験食品

本試験で用いた試験食品は1包あたり800 mgのシイタケ菌糸体抽出物を配合した顆粒状食品（3 g/包）を用いた。その他、賦形剤としてデンプン、グラニュー糖、トレハロースを合計2200 mg 配合した（小林製薬株式会社製造）。

3. 試験デザイン

試験は、単群オープン試験として実施した。九州補完療法研究会倫理審査委員会承認後、2008年5月～2009年9月に福岡天神南クリニックにおいて、ヘルシンキ宣言（1964年採択、2000年修正）の趣旨に従い、被験者に試験内容、方法等について十分に説明を行い、書面にて同意取得が得られた平均年齢60.4歳 $\pm$ 15.7歳（42～86歳）の被験者を対象に実施した。被験者の選択基準・除外基準を表1に示した。被験者は試験食品を原則1包（1包あたりLEM 800 mg 配合）を20週間連日摂取した。摂取量については試験管理医師の判断により1/2～2倍量の増減を認めた。試験デザインは図1に示した。

4. 検査項目

主要評価項目は、免疫機能とした。被験者より、摂取前および20週間の摂取後の2回末梢血を採血した。末梢血リンパ球中のFoxP3, CD4, CD25 陽性細胞をフローサイトメーターで測定した。また末梢血サイトカイン産生量として、ヘリオットらの方法¹⁷⁾を改変し、末梢血をRPMI1640培地で4倍に希釈し、LPS(終濃度20 pg/ml)を添加後、37℃、5 % CO₂ 条件で24時間培養した後の上清中のIFN γ 、IL-10 量をELISAで測定した。

5. 統計解析

全ての検査値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。摂取前値に対する摂取20週後の免疫パラメータ変化は対応のあるt検定で実施した。統計学的有意水準は両側検定で5 % 未満とした。

表1 選択基準及び除外基準

選択基準

① 過去5年以内に重篤な病気の罹患歴及び治療歴のない成人男女

除外基準

- ① 重篤な肝障害、腎障害、心筋梗塞の既往歴のある者
- ② 妊娠中、または妊娠する可能性のある者、及び授乳中の者
- ③ 他の臨床研究に参加している者
- ④ キノコアレルギーを持つ者
- ⑤ その他、試験責任医師が試験参加不適当と判断した者

図1 試験デザイン

単オープン試験とし、被験者はシイタケ菌糸体抽出物を試験期間中連日経口摂取した。評価は、摂取前と摂取20週後の2回実施した。

結果

1. 被験者

12名の被験者が登録し、2名は試験食品摂取前に自己都合により脱落し、10名が試験食品の摂取を開始した。10名は試験を完遂し、解析に供した。10名の平均年齢は、60.4歳 $\pm$ 15.7歳（42～86歳）であり、男女比は男性6名、女性4名であった。

2. 摂取コンプライアンス、安全性

シイタケ菌糸体抽出物の平均摂取量は843 mg/day（500-1500 mg/day）であった。本試験において、試験食品摂取率は90 % 以上であり、摂取コンプライアンスは良好であった。また、有害事象はなく、安全性問題となる所見は観察されなかった。

3. 免疫機能

末梢血サイトカインの産生量は、IFN γ が摂取前値に比べ摂取20週後で上昇する傾向が観察された（ $p<0.1$ ）。IL-10 産生量は摂取前値に比べ摂取20週後値で低下する傾向を観察した（ $p<0.1$ ）。IFN γ 産生量とIL-10 産生量の比は、摂取前値に比べ摂取20週後で有意な上昇が観察された（ $p<0.05$ ）（表2、図2）。

リンパ球中の制御性T細胞割合（CD4+CD25++Foxp3+/リンパ球）並びにヘルパーT細胞中の割合（CD4+CD25++Foxp3+/CD4（+））は、シイタケ菌糸体抽出物の摂取前後で有意な変化は観察されなかった。また、リンパ球中のヘルパーT細胞（CD4陽性）の割合も有意な変化は観察されなかった（表2）。

表2 免疫機能の変化(末梢血)

		摂取前		摂取20週後		p値
		平均値	標準誤差	平均値	標準誤差	
IFN γ	(pg/ml)	127	± 41	210	± 67	<0.1
IL-10	(pg/ml)	98	± 21	73	± 22	<0.1
IFN γ /IL-10	(ratio)	4	± 2	28	± 19	<0.05
CD4(+) ^d リンノバ球	(%)	44.2	± 1.6	43.0	± 1.9	N.S.
CD4(+)/CD25 ^{High} /CD4(+)	(%)	8.6	± 0.8	9.0	± 0.9	N.S.
CD4(+)/CD25(++)/Foxp3(+)/CD4(+)	(%)	6.6	± 0.5	6.5	± 0.3	N.S.
CD4(+)/CD25(++)/Foxp3(+) ^d リンノバ球	(%)	2.8	± 0.2	2.8	± 0.2	N.S.

測定値は、平均値±標準誤差で表した。摂取前と摂取20週後の変化について対応のあるt検定(両側検定)を実施してp値を表した。

図2 免疫機能

A: 摂取前と摂取20週後の末梢血IFN γ 産生量を表した(誤差は標準誤差)。B: 摂取前と摂取20週後の末梢血IL-10産生量を表した(誤差は標準誤差)。C: 摂取前と摂取20週後の末梢血IFN γ とIL-10産生比を表した(誤差は標準誤差)。統計処理は、摂取前値と摂取20週後を対応のあるt検定で行った。

考 察

本試験は、シイタケ菌糸体抽出物を20週間摂取した時の免疫機能へ及ぼす影響を検証することを目的とし、一般成人10名を被験者として、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守のもと、実施された。

主要評価項目である、免疫機能については、シイタケ菌糸体抽出物摂取前後の末梢血液免疫パラメータ変化を評価した。免疫パラメータのうち、末梢血サイトカイン産生能で変化が観察された。すなわち、IFN γ は摂取後に上昇する傾向、IL-10は低下傾向が観察された。IFN γ /IL10比は有意な上昇が観察された。シイタケ菌糸体抽出物は、免疫機能低下モデルマウスにおいて、Th1系のサイトカインであるIFN γ およびIL-12の産生亢進とTh2系サイトカインであるIL-4およびIL-10の産生抑制作用が報告¹⁸⁾されている。また、臨床研究においては、がん患者など、免疫機能が低下した状態で摂取することで、IFN γ /IL10比を改善し免疫機能低下を抑制する作用が報告^{14,15)}されている。本試験においても、IFN γ /IL10比が改善したことから、シイタケ菌糸体抽出物は健常状態においても、Th1系の細胞性免疫機能を維持・改善する作用を持つことが示唆される。

本試験では、末梢血リンパ球サブセットとして、CD4,CD25,FoxP3陽性細胞の割合の変化を評価した。

FoxP3陽性/CD25陽性/CD4陽性細胞は、制御性T細胞として知られ、正常な免疫状態においては過剰な免疫反応を抑制していることが知られている。また、担がん状態では、制御性T細胞の割合が上昇し、抗腫瘍免疫機能を抑制することで、腫瘍細胞の免疫逃避機構の主因となっている。シイタケ菌糸体抽出物は、腫瘍モデルマウスにおいて、担がんにおける制御性T細胞の上昇を抑え、抗腫瘍免疫機能の低下を抑制することが報告⁷⁻⁹⁾されている。本試験では、健常者を対象にシイタケ菌糸体抽出物を摂取させ、制御性T細胞の変化を評価したが、FoxP3陽性/CD25陽性細胞いずれも変化は観察されなかった。モデルマウス試験においても、シイタケ菌糸体抽出物は、正常水準以下には制御性T細胞を抑制しないことが確認されており^{7,8)}、本試験において正常レベルであった制御性T細胞については亢進・抑制いずれにも働かず、その正常状態を維持したことが推察された。

結 論

以上の結果から、シイタケ菌糸体抽出物の摂取は、健常者において、免疫機能の維持・改善に寄与する作用を持つことが示唆された。今後症例数を増やした検討が期待される。

助成元

なし

参考文献

- 1) Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinula edodes* (Berk.) sing. *Nature*. 1969; 222: 687-688.
- 2) Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32: 1215-1219.
- 3) Kojima H, Akaki J, Nakajima S, et al. Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *J Nat Med*. 2010; 64: 16-23.
- 4) Yoshioka Y, Matsui Y, Kobayashi M, et al. Safety evaluation of extract from cultured *lentinula edodes* mycelia; Study of acute toxicity, genotoxicity and inhibiting effect of drug-metabolizing enzyme, cytochrome P-450 3A4. *Jpn J Compl and Alt medicine*. 2010; 7: 51-57.
- 5) Yoshioka Y, Tamesada M, Tomi H. A repeated dose 28-day oral toxicity study of extract from cultured *Lentinula edodes* mycelia in Wistar rats. *J Toxicol Sci*. 2010; 35: 785-791.
- 6) Yoshioka Y, Tamesada M, Nagayama A. The safety of excessive intake of the food containing extract of cultured *Lentinula edodes* mycelia(L.E.M.) in healthy adult volunteers. *Jpn J Compl and Alt medicine*. 2009; 6: 9-15.
- 7) Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, et al. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cancer Sci*. 2011; 102: 516-521.
- 8) Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, et al. Combining a peptide vaccine with oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract enhances anti-tumor activity in B16 melanoma-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 16: 2143-2152.
- 9) Tanaka K, Matsui Y, Ishikawa S. et al. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract can restore the antitumor T cell response of mice inoculated with colon-26 cells into the subserosal space of the cecum. *Oncol Rep*. 2012; 27: 325-332.
- 10) Nagashima Y, Sanpei N, Yamamoto S, et al. Evaluation of host immunity and side effects in breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy (FEC therapy). *Gan To Kagaku Ryoho*. 2005; 32: 1550-1552.
- 11) Yamaguchi Y, Miyahara E, Hihara J. Efficacy and safety of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Am J Chin Med*. 2011; 39: 451-459.
- 12) Okuno K, Uno K. Efficacy of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for advanced gastrointestinal cancer patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12: 1671-1674.
- 13) Nagashima Y, Maeda N, Yamamoto S, et al. Evaluation of host quality of life and immune function in breast cancer patients treated with combination of adjuvant chemotherapy and oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract. *Onco Targets Ther*. 2013; 6: 853-859.
- 14) Suzuki N, Takimoto Y, Suzuki R, et al. Efficacy of oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract for breast cancer patients undergoing postoperative hormone therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 3469-3472.
- 15) Tanigawa K, Ito Y, Sakai M, et al. Evaluation of quality of life and immune function in cancer patients receiving combined immunotherapy and oral administration of *lentinula edodes* mycelia extract. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012; 39: 1779-1781.
- 16) 梶本修身, 山口康代, 竹内豊実ら. シイタケ菌糸体抽出物における境界域および軽度肝機能障害に対する臨床的検討. *日本臨床栄養学会雑誌*. 2000; 22: 22-31.
- 17) Heriot AG. Reduction in cytokine production in colorectal cancer patients: association with stage and reversal by resection. *Br J Cancer*. 2008; 82: 1009-1012.
- 18) Yamasaki H, Kawanishi T, Matsui Y, et al. Experimental study on the antitumor effect of *lentinus edodes* mycelia using murine pulmonary metastasis model(B16F10). *Biotherapy*. 2018; 17: 467-472.

ABSTRACT

Evaluation of Immune Function of Healthy Volunteer Treated with Oral Lentinula Edodes Mycelia Extract

Takashi KAWANISHI^{1,2}, Yasunori MATSUI², Ariaki NAGAYAMA^{1,3}

¹*Fukuoka Tenjin Southern Clinic.*

²*Kobayashi Pharmaceutical Co. Ltd., R&D.*

³*Fukuoka University*

Lentinula edodes mycelia extract has been reported to maintain and improve immune function and QOL in cancer patients. In this study, the effects of Lentinula edodes mycelia extract on immune function were investigated in 10 healthy volunteers. Ten subjects were administrated Lentinula edodes mycelia extract orally for 20 weeks on average (846 mg / day), and the immunological function (IFN γ production amount, IL-10 production amount, lymphocyte subset) was evaluated before and after ingestion at Fukuoka Tenjin Southern Clinic. Immune function following ingestion of Lentinula edodes mycelia extract showed a tendency of IFN γ production to increase, IL - 10 to decrease, and IFN γ / IL - 10 production ratio to be improved remarkably. No significant change was observed in lymphocyte subsets such as regulatory T cells before and after ingestion. Adverse events during the intake period were not observed. It was suggested that oral intake of Lentinula edodes mycelia extract has an action to improve the immune function of healthy adults.

Key words: Immune function, cytokine, regulatory T cell, Lentinula edodes mycelium extract