

*Lentinula edodes* mycelia 抽出物が  
乳癌術後補助化学療法での QOL と免疫  
能改善におよぼす影響—無作為化試  
験の結果

氏名 長島 由紀子

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用分子生命科学専攻

平成 29 年 11 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景・目的	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	7
6. 結語	9
7. 参考文献	9
8. 図表	14

## 1.要旨

目的：乳癌に対するアンスラサイクリン系化学療法は患者の QOL と免疫機能を損なうことが知られている。そのため、アンスラサイクリン系化学療法が施行される患者に対し QOL と免疫機能低下を抑制するアジュバントが求められている。本試験でわれわれは、経口の生物反応調節剤である *Lentinula edodes mycelia* 抽出物 (LEM) が QOL および免疫機能低下を抑制する効果について、無作為化二重盲検試験にて評価した。

方法：アンスラサイクリン系化学療法として FEC therapy (5-FU + cyclophosphamide + epirubicin)、FAC therapy (5-FU + cyclophosphamide + doxorubicin / pirarubicin)、AC therapy (cyclophosphamide + epirubicin)、EC therapy (cyclophosphamide + epirubicin) を術後に施行する 47 例の乳癌患者が本試験に登録された。被験者は無作為に 2 群に分けられ、各群において LEM 配合錠剤あるいはプラセボ錠剤が化学療法開始から 2 コースの間、連日経口投与された。

結果：プラセボ群では QOL トータルスコアは初期値に比べ 2 コース目の day 8 で有意に低下したのに対し、LEM 群では低下は観察されなかった。QOL の身体スコアは化学療法 1 コース、2 コース目の day 8 に、プラセボ群では初期値に比べて低下したのに対し、LEM 群では低下しなかった。さらに、免疫機能のうち末梢血 CD4 陽性細胞における制御性 T 細胞の割合は、プラセボ群に対し LEM 群で上昇が抑制される傾向にあった。

結論：アンスラサイクリン系化学療法に LEM の経口摂取を併用することは、宿主の QOL と免疫機能を維持するのに役立つことが示唆され、LEM は、アンスラサイクリン系化学療法の有用な経口アジュバントになるものと思われた。

## 2.背景・目的

早期乳癌患者において、術後補助化学療法としてタキサンを用いた化学療法が施行される割合が増えているが、アンスラサイクリン系化学療法は現在も主要な術後補助化学療法として効果的であり、広く施行されている (1-3)。一方で、アンスラサイクリン系化学療法は血液毒性、悪心、嘔吐や脱毛 (4,5) などの副作用が発現することが良く知られている。悪心、嘔吐については、遅発性悪心・嘔吐に対して 5HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤の利用により、ある程度症状をコントロールできるようになってきた (6-8)。しかしながら、アンスラサイクリン系化学療法では疲労や活動性など日常生活の QOL の低下が発生し、これらをコントロールすることは、引き続き課題として残っている (9-11)。加えて、化学療法を施行される乳癌患者の宿主免疫機能は再発率に影響を与え (12)、アンスラサイクリン系化学療法は免疫機能に悪影響を与えることが報告されている (13)。したがって、アンスラサイクリン系化学療法を施行される乳癌患者の QOL と免疫機能を維持・改善できる対処方法があれば、非常に有用であろうと考えられる。

*Lentinula edodes mycelia* 抽出物(LEM) はシイタケの菌糸体固形培養物を熱水で抽出した

乾燥粉末である (14)。LEM の経口摂取は、*in vivo* で、抗腫瘍効果および宿主免疫機能の改善作用を有することが報告されている (14-19)。LEM の経口摂取は、化学療法施行消化器癌患者において、悪心などの有害事象発生頻度の抑制作用、NK 細胞活性などの免疫機能や患者の QOL を改善する作用を持つことが報告されている (20,21)。さらに、乳癌患者では術後ホルモン療法施行患者の QOL や免疫機能の改善作用が報告されている (22)。

われわれは以前、術後補助化学療法として FEC75 療法 (5-FU, 500 mg/m<sup>2</sup>; cyclophosphamide, 500 mg/m<sup>2</sup>; epirubicin, 75 mg/m<sup>2</sup>) を 3 週毎に投与される乳癌患者に、化学療法の 2 コース目に LEM の経口摂取を併用する試験を実施し、患者の免疫機能および QOL の変化を化学療法 1 コースを比較した結果を報告した (23)。この試験では、LEM を併用した 2 コース目は併用しなかった 1 コース目に比べ、FEC75 療法による QOL (QOL Questionnaire for Cancer Patients Treated with Anticancer Drugs (QOL-ACD)) (24) の低下と NK 細胞活性の低下が抑制され、LEM の有用性が示唆された。しかしながら、この試験は単群のオープン試験で、LEM の投与期間が 2 コース目の 3 週間に限定していたことから、2 コース目の改善効果は、化学療法 2 コース目の慣れによる影響が否定できないものと考えられた。加えてこの試験当時は悪心、嘔吐に対する 5HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤の利用が一般的でなく、この試験でも使用されていなかったことから、LEM の QOL 改善効果が現在汎用されている 5HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤の利用下でも発揮されるのか不明であるという課題があった。そこで、早期乳癌で術後補助化学療法としてアンスラサイクリン系化学療法を施行され、支持療法として 5HT<sub>3</sub> 受容体拮抗剤を投与される患者を対象に、プラセボ対照無作為化比較試験にて、LEM のアンスラサイクリン系化学療法に起因する有害事象、患者 QOL 及び免疫機能に及ぼす影響を検討した。

### 3.方法

#### 【患者】

本試験では、以下の基準に合った被験者を登録した。女性、20 歳以上、乳癌と診断され術後補助化学療法としてアンスラサイクリン系補助化学療法が予定されている。主要臓器機能が維持され、PS0 または 1。3 ヶ月以上の生存が期待できる。また、妊娠中、妊娠の可能性のある者、母乳育児中または過去 4 週間以内に別の治療を受けた者は除外した。すべてに被験者は書面による同意を得て本試験へ参加した。

#### 【薬剤】

LEM は小林製薬が製造したものをを用いた。製法は既報のとおりとした (14)。すなわち、シイタケ菌糸 (製品評価技術基盤機構に登録された NITE SD 0043 株) をバガスと米ぬかで形成された固形培地へ移植し、菌糸が十分成長するまで培養した。培養物を熱水で抽出し、乾燥粉末とした。この乾燥粉末を LEM として本試験に用いた。LEM 群の被験者は、一粒 230mg でそのうち LEM を 150mg 含む試験錠剤を朝晩 2 回、1 回 6 粒ずつ摂取した。プラセ

ボ群の被験者は、一粒 230mg で LEM をカラメル色素、デキストリンとマルチトールで置き換えたプラセボ錠を朝晩 2 回、1 回 6 粒ずつ摂取した。

#### 【試験デザイン】

この試験は、術後補助化学療法として実施されるアンスラサイクリン系化学療法の最初の 2 コースの期間を評価期間として、プラセボ対照無作為化二重盲検試験として実施した (UMIN000004614)。試験計画は山口大学、下関医療センターおよび近畿大学の各倫理委員会で承認後、ヘルシンキ条約に則って実施した。被験者は中央登録ブロックランダム化法で、LEM 群、プラセボ群に割り付けられた。アンスラサイクリン系化学療法は、FEC100 therapy (5-FU, 500 mg/m<sup>2</sup>; cyclophosphamide, 500 mg/m<sup>2</sup>; epirubicin, 100 mg/m<sup>2</sup>)、EC therapy (cyclophosphamide, 600 mg/m<sup>2</sup>; epirubicin, 90 mg/m<sup>2</sup>)、FAC therapy (5-FU, 500 mg/m<sup>2</sup>; cyclophosphamide, 500 mg/m<sup>2</sup>; doxorubicin / pirarubicin, 50mg/m<sup>2</sup>), AC therapy (cyclophosphamide, 600mg/m<sup>2</sup>; doxorubicin / pirarubicin, 60 mg/m<sup>2</sup>) のいずれかとし、5-FU 投与の有無を割付調整因子とした。上記いずれのレジメも 3 週間を 1 コースとして初日に化学療法を施行し、LEM 錠剤 (LEM1 日量として 1800mg/day) またはプラセボ錠剤は 2 コースの間、合計 6 週間連日経口投与した。

#### 【測定】

すべての試験において、5 回、すなわち、1 コースにおける 1 日目 (化学療法の投与前)、8 日目 (化学療法の投与 1 週間後) および 22 日目 (化学療法の投与 3 週間後および 2 コース目化学療法の投与前) 及び 2 コースの 8 日目 (化学療法の投与 1 週間後) と第 22 日 (化学療法の投与 3 週間後) に QOL と免疫能の測定を実施した。

QOL 調査は、FACT-BRM\_ver.4 (FACIT.org) (25) を用いて、FACIT.org が提供するアンケートのスコアリング方法に基づいて測定した。有害事象は (CTCAE) ver.4-JCOG によって評価した。

免疫パラメータの中で、末梢血リンパ球における CD4 陽性リンパ球のうち、インターロイキン (IL) -4 陽性細胞とインターフェロン (IFN) - $\gamma$  陽性細胞の割合をフローサイトメトリー分析し、Th1 / Th2 バランスを測定した。抗 CD4 PC-5 標識抗体 (BD Japan, Tokyo, Japan) を用いて細胞表面 CD4 を検出した。細胞内 IL-4 および IFN- $\gamma$  は、抗 IL-4PE 標識および抗 IFN- $\gamma$  FITC 標識抗体 (BD Japan) でそれぞれ検出した。末梢血リンパ球における CD4 陽性リンパ球の中で FoxP3 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで分析し、制御性 T 細胞 (Treg) を測定した。細胞表面 CD4 および CD25 は、抗 CD4 FITC 標識および抗 CD25 PE-Cy5.5 標識 (BD Japan) 抗体を用いてそれぞれ検出した。さらに、抗 FoxP3 PE 標識抗体 (BD Japan) を用いて細胞内 FoxP3 を検出した。

ナチュラルキラー (NK) 細胞活性は 51Cr 放出アッセイを用いて測定した。末梢血単核細胞 (PBMC) を Ficoll 溶液を用いて単離した。単離した PBMC を、10%FBS を含む RPMI1640 培地で洗浄し、 $1 \times 10^6$  細胞/mL に調整し、エフェクター細胞として使用した。標的細胞の濃度を調整するために、ヒト不死化骨髄性白血病細胞株である K562 細胞 (DS

Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。100  $\mu$  Ci の  $^{51}\text{Cr}$  を K562 細胞に添加し、次いで細胞を 37°C で 1 時間培養した。PBS で 2 回リンスした後、10%FBS 含有 RPMI1640 培地で細胞数を  $1 \times 10^6$  細胞/mL に調整し、これらの細胞を標的細胞とした。エフェクター細胞と標的細胞との混合培養を、エフェクター/標的 (E/T) 比 20 で 3.5 時間行い、次いで死滅標的細胞から放出された  $^{51}\text{Cr}$  を  $\gamma$ シンチレーションカウンターを用いて測定した。最大解離コントロールでは、エフェクター細胞の代わりに 1N-HCl を添加し、 $\gamma$ シンチレーションカウンターで死滅した標的細胞から放出された  $^{51}\text{Cr}$  を測定した。自然解離コントロールでは、エフェクター細胞の代わりに 10%FBS を含む RPMI1640 培地を添加した。NK 細胞の活性は、(エフェクター細胞の時点で放出された  $^{51}\text{Cr}$  の量から自発的解離制御の放出量を差し引いた量) に対する (最大解離制御における放出された  $^{51}\text{Cr}$  の量から自発的解離制御の放出量を差し引いた量) で表した。

#### 【統計解析】

測定値は平均  $\pm$  標準誤差として示した。各グループ内の変動は QOL スコアでは Steel test による Kruskal-Wallis 検定で、免疫パラメータは Bonferroni 補正による一元配置 ANOVA 分析によって検定した。

## 4.結果

### 【患者】

2011 年から 2014 年にかけて、山口大学、下関医療センターおよび近畿大学において乳癌術後補助化学療法としてアンスラサイクリン系化学療法の施行予定で performance status が 0 または 1 の 47 例の女性を登録した。被験者背景は表 1 に示す。LEM 群の年齢は、31 歳から 85 歳 (中央値 62 歳) で、いずれも遠隔転移はなく、リンパ節転移陽性が 12 例であった。プラセボ群の年齢は、42 歳から 77 歳 (中央値 57.5 歳) でいずれも遠隔転移はなく、リンパ節転移陽性が 8 例であった。

### 【QOL】

完遂症例のうち、QOL スコアの測定が 2 ポイント以上欠損のあるデータを除外し、LEM 群は 22 例、プラセボ群は 21 例を対象として解析を行った。QOL スコアの変化を表 2 及び図 1 に示した。FACT-BRM total score と G score は、プラセボ群で 2 コース目の day 8 に、初期値と比べて有意に低下したが、LEM 群では低下は観察されなかった。FACT-BRM trial Outcome Index は、プラセボ群で 1、2 コースとも day 8 に初期値と比べて有意に低下したが、LEM 群では 2 コース目のみ低下を観察した。サブスケールでは、Physical Well Being (PWB) score は、両群とも、化学療法 1 コース目の day 8、化学療法 2 コース目の day 8 で初期値に比べ有意に低下した。化学療法 1 コース目の day 8 の PWB score の低下は LEM 群では day 22 に回復したが、プラセボ群では回復しなかった。身体 (FWB) score は、プラセボ群で化学療法 2 コース目の day 8 で有意に低下した。LEM 群では、化学療法 1 コース、2 コースとも低下は観察されなかった。BRM physical subscale (BRMP) score は、プラセボ

群で2コース目の day 8 に有意に低下したが、LEM 群では1コース目の day 8 の低下は観察されなかった。その他のサブスケールでは変動は観察されなかった。

#### 【有害事象】

試験期間中、LEM に起因する有害事象の発生はなかった。アンストラサイクリン系化学療法に起因する有害事象のうち、Grade3 (CTCAE ver.4) 以上のものを表3に示した。LEM 群で、食欲不振 1 例、悪心 1 例、発熱性好中球減少症 1 例、好中球/リンパ球減少 5 例、プラセボ群で、発熱性好中球減少症 2 例、好中球/リンパ球減少 4 例、手足症候群 1 例、紅皮症 1 例で、両群間で顕著な違いは観察されなかった。しかし、プラセボ群では、発熱性好中球減少症により 2 例が 2 コースを完了できず、試験から脱落となった。LEM 群では、脱落症例はなかった。

#### 【免疫機能】

完遂症例のうち、免疫機能の測定が2ポイント以上欠損のあるデータを除外し、LEM 群は 23 例、プラセボ群は 19 例を対象として解析を行った。免疫機能の変化を表4に示した。NK 細胞活性は、両群とも、化学療法 1 コース目の day 8、化学療法 2 コース目の day 8 で初期値に比べ有意に低下した。LEM 群では、化学療法 2 コース目の day 22 も初期値に比べ低値を示した。末梢血 CD4 陽性細胞中の制御性 T 細胞 (Treg) の割合は (FoxP3+ CD25+ / CD4+) は、LEM 群では、1 コース目の day 8 に有意に低下した。プラセボ群では、1 コース目の day 22 及び 2 コース目の day 22 ともに、初期値に比べ有意な上昇が観察された。LEM 群でも、2 コース目の day 22 に初期値に比べて有意な上昇が観察されたが、プラセボ群に比べて、上昇の程度が抑制される傾向にあった (図 2)。Th1/Th2 バランスは両群とも有意な変動は観察されなかった。

## 5. 考察

アンストラサイクリンベースの化学療法は有効であり、早期乳癌の患者のための主な術後補助化学療法として広く使用されている (1-3)。しかし、これらの治療には吐き気や嘔吐 (4,5) の発生率が高く、患者の QOL を損なうことがある。近年、5HT3 受容体拮抗薬の使用が一般的になっており、これらの症状を一定のレベルで制御することが可能となっている。しかし、術後補助化学療法を受けている乳癌患者では、倦怠感や QOL の低下が依然として課題であり、緩和する方法が必要である (9)。われわれは以前 FEC75 レジメを投与される乳癌患者に LEM を併用した単群オープン試験を実施し、QOL-ACD (24) を使用して、患者の QOL に対する LEM の効果を評価した。この報告では、LEM の併用が FEC75 レジメに応答して患者の身体的スケールを改善するのに有効であることが示唆された。LEM は生物反応調節剤 (BRM) であるため、本試験では、BRM が癌患者の QOL に及ぼす影響を評価するために開発された FACT-BRM (25) を用いて QOL を評価した。

FACT-BRM 総スコアは、化学療法の 2 コースの 8 日目にプラセボ群の初期値から有意に低下したが、LEM 群ではこのスコアは低下しなかった。プラセボ群では、初期値と比較し

て1および2コースの8日目にPWB、BRM身体サブスケール(BRMP)およびFWBサブスケールについて有意に低下したスコアを示し、PWBは両コースとも22日目で回復しなかった。PWBの質問には、吐き気や嘔吐に関する質問が含まれている。今回の試験では、1人の患者のみがG3以上の重度の悪心および嘔吐を経験し、5HT3受容体拮抗薬の使用によって悪心および嘔吐がある程度制御されたと考えられる。しかし、PWBスコアはプラセボ群において両コースとも22日目においても回復しなかったことから、HT3受容体拮抗薬使用時においても、患者の身体的QOLを改善するための対策が必要であることが示唆された。LEM群では、両方の化学療法コースの8日目でPWBスコアが初期値と比較して、プラセボ群と同様に低下したが、1コースの22日目に回復した。さらに、プラセボ群とは異なり、疲労に関する質問を含むBRMPスコアは、LEM群の1コースの化学療法の8日目に低下しなかった。さらに、FWBスコアはLEM群で試験期間を通じて減少が観察されなかった。これらの結果は、LEMをアンストラサイクリン系化学療法と併用することが、特に患者の身体的状態および機能的活動に関して、QOLの低下を緩和する活性を持つことを示唆する。

乳癌患者の薬物療法による疲労改善とQOLの低下への対処として運動療法など報告されているが(26)、現在まで信頼性の高い措置は確立されていない。LEMは術後ホルモン療法を受けている乳癌患者であってもQOLを改善すると報告されている(22)が、今回の研究結果と合わせて、LEMが、広範な薬物治療を受けている術後乳癌患者のQOLをより良好に維持するための有用な方法であることが示唆された。

乳癌患者の宿主免疫機能は、癌化学療法を受けている乳癌患者の予後に影響することが報告されている(27)。今回の研究において、アンストラサイクリン系化学療法がNK細胞活性、TregおよびTh1/Th2バランスにどのように影響するかを調べ、これらの免疫パラメータに対するLEM併用の有効性を評価した(表4)。

FEC75療法を投与された術後乳癌患者の単群オープン試験において、NK細胞活性は化学療法の1週間後に低下したが、LEMの併用はその低下を抑制したことをわれわれは報告している。しかし、本研究では、NK細胞活性は、プラセボとLEM群の1および2コースとも8日目に有意に低下し、LEMの併用がその低下抑制効果を示せなかった。そのため、NK細胞活性に対するLEMの併用効果については、今後さらなる研究が必要である。本試験では、いずれのグループでもTh1/Th2のバランスに大きな変化は見られなかったが、これはわれわれの既報告と一致する。Th1/Th2バランスは、CD4+リンパ球におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞とIL-4産生細胞の割合を評価するT細胞サブセット解析で行う。近年、CD4+リンパ球におけるTreg(FoxP3+CD25+細胞)の割合が、Th1/Th2バランスよりも腫瘍免疫状態の重要な指標となることが広く認識され、担癌状態におけるTregの増加は、腫瘍免疫機能の低下をもたらすことが知られている(28-30)。本試験においても、Tregの割合は、1および2コースの22日目にプラセボ群で初期値より有意に増加したが、リンパ球数は両コースの8日目に減少することが観察された。従って、アンストラサイクリン系化学療法によ



りリンパ球数が一時的に減少し、その後の回復過程において、免疫抑制性 Treg が CD4 + 細胞の複数のサブセットの中でも、相対的に早期に回復することが推測される。一方、LEM 群では、1 コース 8 日目の Treg の割合が初期値と比較して有意に低下し、この減少は 1 コースの 22 日目まで維持された。また、2 コース 22 日目に、LEM 群では、プラセボ群同様 Treg 比が初期値に比べて増加したが、その増加程度はプラセボ群と比較して低い傾向があった。*In vivo* で、LEM は、Treg を介した免疫抑制を緩和し、担癌宿主の抗腫瘍免疫能を誘導することが報告されている (18,19)。さらに、癌免疫細胞療法を受けている患者の研究では、癌進行に伴う Treg の増加が改善されることも報告されている (31)。一部の化学療法は Treg を減少させることが知られており (32)、アンストラサイクリン系化学療法で併用されるシクロホスファミドは低用量で Treg を選択的に減少させることがよく知られている (33,34)。しかし、本試験では、シクロホスファミドの用量は既報 (33,34) と比べ低用量でなかったことから、本試験のレジメでは、Treg が選択的に減少する作用はなく、両群で総リンパ球数を非選択的に減少させたことが考えられる。一方で、LEM 群における Treg の推移からは、LEM 投与により、化学療法によるリンパ球減少期の 1 コース 8 日目には、Treg の減少を選択的に促し、リンパ球数の回復段階では Treg の増加を選択的に抑制したことが示唆された。

腫瘍浸潤性リンパ球 (TIL) 集団における Treg と乳癌患者の予後との関係については多くの報告で検証されているが、未だ結論は出ていない。おそらく腫瘍の微小環境の複雑性に起因すると思われる。(33,35,36)。また、乳癌術後補助療法を施行した患者の末梢血中の CD4 + 細胞の Treg の割合については、担癌状態から解放され手術後に一時的に低下したものが化学療法後に上昇することが報告されており (37)、この化学療法による免疫機能の抑制は担癌状態で起こるのと同様な機序で起こるものと推測される。本研究の結果に基づいて、LEM の併用は、補助化学療法後に起こる免疫機能の抑制を改善する可能性が示唆され、この点についてのより詳細な研究が今後行われることが期待される。

## 6. 結語

アンストラサイクリン系化学療法を受けた術後乳癌患者は、QOL および免疫機能が低下するが、LEM の併用は、QOL および免疫機能の低下を改善することが期待できる。従って LEM の経口投与は、このような術後乳癌患者のための有用な支持療法になり得ると考えられた。

## 7. 参考文献

1. Group (EBCTCG) et al: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687-1717, 2005.
2. French Adjuvant Study Group.: Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant

- chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 19:602-611, 2001.
3. Turner N, Biganzoli L and Di Leo A: Continued value of adjuvant anthracyclines as treatment for early breast cancer. *Lancet Oncol* 16:e362-e369, 2015.
  4. Riccardi A, Brugnattelli S, Giordano M, Danova M, Pugliese P, Tinelli C, Klersy C, Richetti A and Fava S et al: Myeloprotective effect of early primary granulocyte-colony stimulating factor during six courses of intensified 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (120FEC) chemotherapy for advanced breast cancer. Cooperative Group of Study and Treatment of Breast Cancer. *Tumori* 84:540-546, 1998.
  5. Baltali E, Gunel N, Onat DA, Atahan IL, Akcali Z, Buyukunal E and Firat D: Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer: a preliminary report. Turkish Oncology Study Group. *Tumori* 85:483-487, 1999.
  6. Takeuchi HI, Saeki T, Aiba K, Tamura K, Aogi K, Eguchi K, Okita K, Kagami Y and Tanaka R et al: Japanese Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines 2010 for antiemesis in oncology: executive summary. *Int J Clin Oncol*. 2015 Jun :17, 2015.
  7. Ohzawa H, Miki A, Hozumi Y, Miyazaki C, Sagara Y, Tanaka Y, Shiba S, Joutoku H and Sakuragi M et al: Comparison between the antiemetic effects of palonosetron and granisetron in breast cancer patients treated with anthracycline-based regimens. *Oncol Lett* 9:119-124, 2015.
  8. Rapoport BL, Jordan K, Boice JA, Taylor A, Brown C, Hardwick JS, Carides A, Webb T and Schmoll HJ: Aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting associated with a broad range of moderately emetogenic chemotherapies and tumor types: a randomized, double-blind study. *Support Care Cancer* 18:423-431, 2010.
  9. Berger AM, Lockhart K and Agrawal S: Variability of patterns of fatigue and quality of life over time based on different breast cancer adjuvant chemotherapy regimens. *Oncol Nurs Forum* 36:563-570, 2009.
  10. Kornblith AB, Lan L, Archer L, Partridge A, Kimmick G, Hudis C, Winer E, Casey R and Bennett S et al: Quality of life of older patients with early-stage breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: a companion study to cancer and leukemia group B 49907. *J Clin Oncol* 29:1022-1028, 2011.
  11. Martin M, Lluch A, Segui MA, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, Rodriguez-Lescure A, Grosse R and Calvo L et al: Toxicity and health-related quality of life in breast cancer patients receiving adjuvant docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide (TAC) or 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (FAC): impact of adding primary prophylactic granulocyte-colony stimulating factor to the TAC regimen. *Ann Oncol* 17:1205-1212, 2006.
  12. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC and

- Ullrich E et al: Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059, 2007.
13. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, Granstam-Bjorneklett H, Helander I, Lekander M, Mikaelsson E, Nilsson B and Ojutkangas ML et al: NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy. *Br J Cancer* 97:105-111, 2007.
  14. Kawanishi T, Ikeda-Dantsuji Y and Nagayama A: Effects of two basidiomycete species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines. *Immunobiology* 215:516-520, 2010.
  15. Sugano N, Hibino Y, Choji Y and Maeda H: Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett* 17:109-114, 1982.
  16. Sugano N, Choji Y, Hibino Y, Yasumura S and Maeda H: Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett* 27:1-6, 1985.
  17. Liu M, Li J, Kong F, Lin J and Gao Y: Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 40:187-198, 1998.
  18. Tanaka K, Matsui Y, Ishikawa S, Kawanishi T and Harada M: 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* 27:325-332, 2012.
  19. Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Tamesada M, Harashima N and Harada M: Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cancer Sci* 102:516-521, 2011.
  20. Yamaguchi Y, Miyahara E and Hihara J: Efficacy and safety of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Am J Chin Med* 39:451-459, 2011.
  21. Okuno K and 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* 12:1671-1674, 2011.
  22. Suzuki N, Takimoto Y, Suzuki R, Arai T, Uebaba K, Nakai M, Strong JM and Tokuda H: Efficacy of oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract for breast cancer patients undergoing postoperative hormone therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:3469-3472, 2013.
  23. Nagashima Y, Maeda N, Yamamoto S, Yoshino S and Oka M: 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*

- 6:853-859, 2013.
24. Kurihara M, Shimizu H, Tsuboi K, Kobayashi K, Murakami M, Eguchi K and Shimosuma K: Development of quality of life questionnaire in Japan: quality of life assessment of cancer patients receiving chemotherapy. *Psychooncology* 8:355-363, 1999.
  25. Bacik J, Mazumdar M, Murphy BA, Fairclough DL, Eremenco S, Mariani T, Motzer RJ and Cella D: The functional assessment of cancer therapy-BRM (FACT-BRM): a new tool for the assessment of quality of life in patients treated with biologic response modifiers. *Qual Life Res* 13:137-154, 2004.
  26. Schmidt ME, Wiskemann J, Armbrust P, Schneeweiss A, Ulrich CM and Steindorf K: Effects of resistance exercise on fatigue and quality of life in breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy: A randomized controlled trial. *Int J Cancer* 137:471-480, 2015.
  27. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, Granstam-Bjorneklett H, Lekander M, Nilsson B, Ojutkangas ML, Osterborg A and Bergkvist L et al: Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study. *Cancer Immunol Immunother* 58:111-120, 2009.
  28. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D and Gnjjatic S et al: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538-18543, 2005.
  29. Yamaguchi T and Sakaguchi S: Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 16:115-123, 2006.
  30. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR and Zhang L et al: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949, 2004.
  31. Tanigawa K, Ito Y, Sakai M and Kobayashi Y: [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* 39:1779-1781, 2012.
  32. Maeda K, Hazama S, Tokuno K, Kan S, Maeda Y, Watanabe Y, Kamei R, Shindo Y and Maeda N et al: Impact of chemotherapy for colorectal cancer on regulatory T-cells and tumor immunity. *Anticancer Res* 31:4569-4574, 2011.
  33. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL and Banham AH: Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24:5373-5380, 2006.
  34. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, Bieler JG, Emens LA and Reilly RT et al: Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 201:1591-1602, 2005.

35. Liu S, Foulkes WD, Leung S, Gao D, Lau S, Kos Z and Nielsen TO.: Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.*16:432, 2014.
36. Aruga T, Suzuki E, Saji S, Horiguchi S, Horiguchi K, Sekine S, Kitagawa D, Funata N and Toi M et al: A low number of tumor-infiltrating FOXP3-positive cells during primary systemic chemotherapy correlates with favorable anti-tumor response in patients with breast cancer. *Oncol Rep* 22:273-278, 2009.
37. Rech AJ, Mick R, Kaplan DE, Chang KM, Domchek SM and Vonderheide RH: Homeostasis of peripheral FoxP3(+) CD4 (+) regulatory T cells in patients with early and late stage breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59:599-607, 2010.

## 8. 図表

Table I. Patient characteristics.

	LEM, n	Placebo, n
Entry	23	24
Age, years		
Mean (range)	62.0 (31-85)	57.5 (42-77)
Tumor stage		
0	0	0
1	6	9
2	14	12
3	3	3
4	0	0
T stage		
Tis	0	0
T0	2	0
T1	10	10
T2	10	12
T3	1	0
T4	0	0
Unknown	0	2
N stage		
N0	11	16
N1	10	5
N2	2	2
N3	0	1
Treatments		
FEC/FAC therapy	10	12
AC/EC therapy	13	12

LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract; FEC, 5-FU + cyclophosphamide + epirubicin; FAC, 5-FU + cyclophosphamide + doxorubicin/pirarubicin; AC, cyclophosphamide + doxorubicin/pirarubicin; EC, cyclophosphamide + epirubicin; 5-FU, 5-fluorouracil.

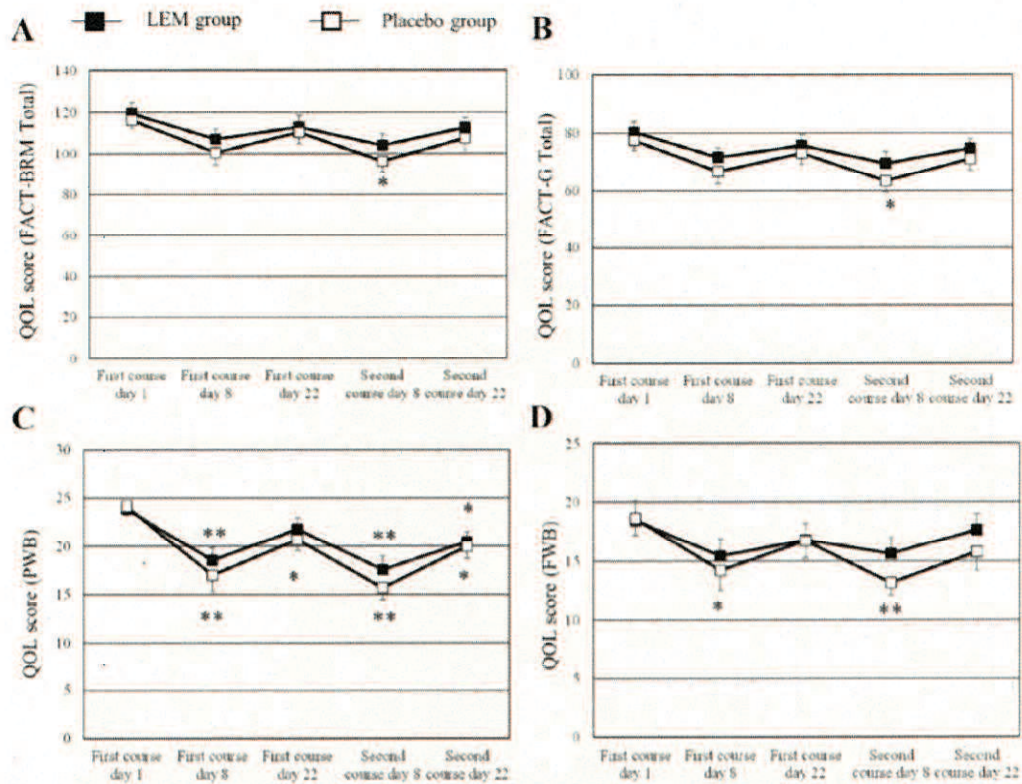


Figure 1. QOL scores over the course of the study. QOL was measured by the Functional Assessment of Cancer Therapy for patients receiving Biological Response Modifiers (FACT-BRM) version 4, and was evaluated from scores on the questionnaire. The measurement values shown are means  $\pm$  standard error. Variation within each group was assayed by the Kruskal-Wallis test with the Steel test vs. day 1 of the first course. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . (A) Total scores, (B) FACT-G total scores, (C) PWB scores, (D) FWB scores. QOL, quality of life; LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract; PWB, physical well-being; FWB, functional well being; FACT-G, Functional Assessment of Cancer Therapy general scale.

Table II. Effect of LEM vs. placebo on QOL scores during the study course.

Scores	Groups	Subject no.	First course			Second course	
			Day 1	Day 8	Day 22	Day 8	Day 22
FACT-BRM total score	LEM	21	119.5±5.1	107.0±4.9	112.9±5.5	103.9±5.7	112.6±4.6
	Placebo	21	116.2±4.1	100.5±5.9	110.4±5.6	96.2±5.4 <sup>a</sup>	107.4±5.9
FACT G total score	LEM	21	80.4±3.6	71.6±3.4	75.6±3.8	69.4±4.1	74.7±3.2
	Placebo	21	77.4±3.5	66.6±4.2	73.0±4.0	63.2±3.7 <sup>a</sup>	71.1±4.2
FACT-BRM TOI	LEM	21	81.4±3.7	69.4±3.9	75.9±4.0	67.7±4.1 <sup>a</sup>	76.0±3.5
	Placebo	21	81.6±2.4	65.1±4.3 <sup>b</sup>	74.8±3.8	61.8±3.8 <sup>b</sup>	72.1±4.3
PWB	LEM	22	23.9±0.8	18.6±1.3 <sup>b</sup>	21.8±1.1	17.6±1.4 <sup>b</sup>	20.5±1.0 <sup>a</sup>
	Placebo	21	24.1±0.9	17.0±1.7 <sup>b</sup>	20.7±1.2 <sup>a</sup>	15.7±1.3 <sup>b</sup>	20.0±1.3 <sup>a</sup>
SWB	LEM	21	20.8±1.1	20.6±1.3	20.5±1.3	20.1±1.3	19.6±1.3
	Placebo	21	19.4±1.6	20.2±1.5	19.0±1.7	19.6±1.5	19.0±1.6
EWB	LEM	22	17.3±1.0	17.0±1.1	16.5±1.2	16.1±1.4	16.9±1.1
	Placebo	21	15.3±1.1	15.2±1.2	16.6±0.9	14.8±1.1	16.3±1.0
FWB	LEM	22	18.5±1.7	15.4±1.5	16.8±1.4	15.6±1.4	17.7±1.4
	Placebo	21	18.6±1.4	14.2±1.7 <sup>a</sup>	16.7±1.4	13.1±1.1 <sup>b</sup>	15.8±1.6
BRMP	LEM	21	22.5±1.0	20.4±0.7	20.8±0.9	18.7±1.1 <sup>a</sup>	20.8±0.8
	Placebo	21	22.1±1.0	19.3±1.0 <sup>a</sup>	21.5±0.8	18.8±1.0 <sup>a</sup>	20.9±1.1
BRMCE	LEM	21	16.6±1.1	15.0±1.2	16.5±1.3	15.8±1.0	17.1±1.0
	Placebo	21	16.7±1.0	14.6±1.2	15.9±1.2	14.2±1.3	15.4±1.2

Measurement values are shown as mean ± standard error. Variation within each group was assayed by the Kruskal-Wallis test with the Steel test vs. day 1 of the first course. <sup>a</sup>P<0.05; <sup>b</sup>P<0.01. LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract; QOL, quality of life; FACT, Functional Assessment of Cancer Therapy; G, general scale; TOI, Trial Outcome Index; PWB, physical well-being; SWB, social/family well-being; EWB, emotional well-being; FWB, functional well-being; BRMP, BRM physical subscale; BRMCE, BRM cognitive/emotional subscale; BRM, biological response modifier.

Table III. Adverse events with LEM vs. placebo treatment.

Adverse events, n	LEM	Placebo
Anorexia	1	0
Nausea	1	0
Febrile neutropenia	1	2
Neutrophil/lymphocyte decrease	5	4
Hand-foot skin reaction	0	1
Erythroderma	0	1

LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract.



Table IV. Effect of LEM vs. placebo on immunological parameters during the study course.

Parameters	Groups	Subject no.	First course			Second course	
			Day 1	Day 8	Day 22	Day 8	Day 22
NK cell activity (%)	LEM	23	32.5±3.7	19.1±2.9 <sup>b</sup>	23.4±2.4 <sup>b</sup>	13.6±1.7 <sup>b</sup>	25.2±2.7 <sup>a</sup>
	Placebo	19	27.4±3.1	16.2±1.9 <sup>b</sup>	20.4±1.8	10.8±2.2 <sup>b</sup>	23.2±2.9
Treg (Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> cells) (%)	LEM	23	6.2±0.3	5.2±0.3 <sup>a</sup>	6.6±0.4	5.5±0.2	7.3±0.4 <sup>b</sup>
	Placebo	19	5.8±0.3	5.1±0.3	6.6±0.4 <sup>a</sup>	5.6±0.4	7.6±0.4 <sup>b</sup>
Th1/Th2 balance (IFN- $\gamma$ /IL-4 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> cells)	LEM	23	10.1±1.5	8.7±1.3	9.2±1.1	7.7±0.9	8.1±1.0
	Placebo	19	10.3±1.4	9.5±1.2	10.1±1.1	8.7±1.1	10.5±1.3

Measurement values are shown as means  $\pm$  standard error. Variation within each group was assayed by repeated one-way analysis of variance with Bonferroni's correction vs. day 1 of the first course. <sup>a</sup>P<0.05; <sup>b</sup>P<0.01. LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract; NK, natural killer; Treg, regulatory T cells; IFN, interferon; IL, interleukin.

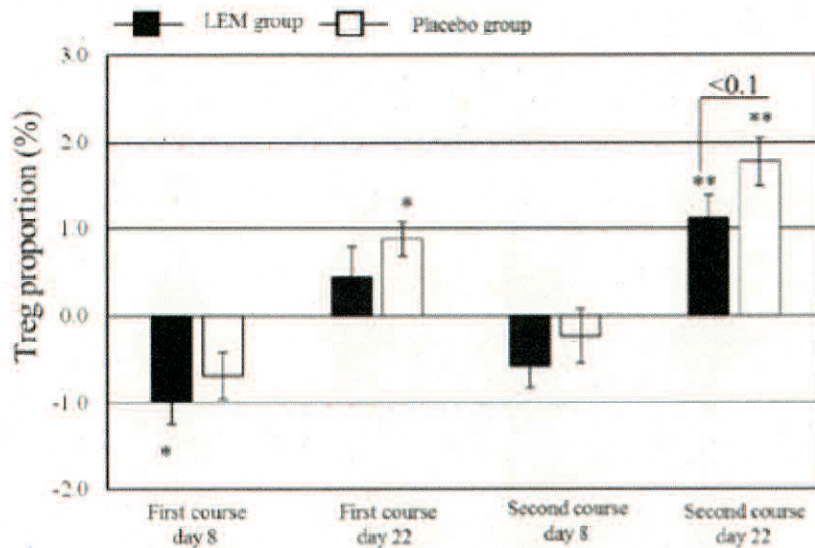


Figure 2. Regulatory T cells (Tregs) in CD4-positive cells in peripheral blood over the course of the study. The proportion of CD25-positive FoxP3-positive cells in CD4-positive cells was measured using flow cytometry. The figure shows the change in the value from the baseline (first course, day 1, prior to drug administration). The measurement values are shown as means  $\pm$  standard error. Black bars, LEM group; white bars, placebo group. Variation within each group was assayed by repeated one-way analysis of variance with Bonferroni's correction vs. day 1 of the first course. <sup>\*</sup>P<0.05; <sup>\*\*</sup>P<0.01. Variation between the two groups was assayed by an unpaired t-test. LEM, *Lentinula edodes* mycelia extract; FoxP3, forkhead box p3.