

加熱殺菌した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株 の摂取が健常な日本人成人の腸内環境に及ぼす 影響と安全性の検討 —ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験—

Efficacy and Safety of Heat-killed *Enterococcus faecalis* Strain KH2 in Healthy Japanese Adult

—A Randomized, Placebo Controlled, Double-blind Paralleled Study—

渡邊 卓巳^{1,5)} 菅 辰彦¹⁾ 大脇 眞²⁾
山下慎一郎³⁾ 山本 和雄³⁾ 高良 毅⁴⁾
河原 敏男⁵⁾

ABSTRACT

Objective We assessed heat treatment *Enterococcus faecalis* strain KH2 in terms of safety and efficacy for increasing amount of defecation in a randomized placebo controlled double-blind paralleled study.

Methods This study included a total of 30 healthy Japanese adult volunteers 30–59 aged years who were selected by defecation frequency two to five times a week.

Subjects were randomly assigned to two groups (KH2 group or placebo group). Subjects consumed powder preparation containing of 100 mg KH2 and 900 mg dextrin mixture or 1000 mg dextrin daily for 1 week. Intestinal microflora was assessed using terminal restriction fragment length polymorphism analysis (T-RFLP) at baseline and one week after the start of administration KH2 or placebo.

Results A total of 25 subjects (KH2 group, $n=10$; placebo group, $n=15$) completed the study. At one week after the start of the test-food consumption, the primary endpoint, amount of defecation which was evaluated by using Japanese version of constipation assessment scale (CAS-MT), was significantly high in KH2 group ($P=0.01$). The secondary endpoint, the change amount of occupying rate of *Clostridium* cluster IV in intestinal microflora was also significantly high in KH2 group ($P=0.003$). Safety parameters and incidence of adverse events did not differ significantly between two groups.

¹⁾有限会社バイオ研 ²⁾NPO 法人日本サプリメント臨床研究会 ³⁾株式会社オルトメディコ ⁴⁾医療法人社団盛心会タカラクリニク ⁵⁾中部大学

Takumi Watanabe: Bio-Lab Co., Ltd. and Chubu University; Tatsuhiko Kan: Bio-Lab Co., Ltd.; Makoto Ohwaki: Non-Profit Organization, The Japanese Association of Clinical Research on Supplements; Shin-ichiro Yamashita and Kazuo Yamamoto: ORTHOMEDICO Inc.; Tsuyoshi Takara: Medical Corporation Seishinkai, Takara Medical Clinic; Toshio Kawahara: Chubu University

Conclusion These results indicate that promoting defecation by ingestion of KH2 and improving the intestinal environment.

(Jpn Pharmacol Ther 2020 ; 48 : 611-24)

KEY WORDS *Enterococcus faecalis* strain KH2, *Clostridium* cluster IV, Intestinal microflora, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), Japanese version of the constipation assessment scale (CAS)

はじめに

近年、腸内細菌叢の測定に分子生物学的手法が用いられるようになり、腸内に存在する腸内細菌の種類や占有率が従来の培養法での知見と大きく異なることが明らかになってきた。この手法によれば、ヒトの腸内細菌は *Firmicutes* 門と *Bacteroides* 門、*Actinobacteria* 門および *Proteobacteria* 門でほぼ100%を占めている¹⁾。かつて、腸内の主要菌の一つと考えられていた *Bifidobacterium* は2%程度しか占有率のない *Actinobacteria* 門に属している。食品成分による腸内環境への効果を検討する際は、*Bifidobacterium* よりむしろ、60%以上の占有率を占める *Firmicutes* 門に属する *Clostridium* や *Lactobacillus* に対する影響を考慮する必要がある。また、培養法が全盛期であった時代は生きてビフィズス菌や乳酸菌摂取による整腸作用が重要であると考えられていたが^{2,3)}、摂取した乳酸菌が腸管内で増殖するという報告例はなく、現在では乳酸菌による整腸作用やその他効果は他の要因で発揮されているのではないかと考えられるようになってきた。その考えを裏づけるように殺菌された乳酸菌を配合した野菜飲料摂取による排便促進⁴⁾や抗ウイルス効果⁵⁾など殺菌された乳酸菌摂取による効果の報告が増加している。

そこで、本研究では近年、食生活の変化、運動不足、不規則な生活や恒常的なストレスなどにより増加する便秘症状⁶⁾を加熱処理した乳酸菌 *Enterococcus faecalis* KH2 株 (以下, KH2) 摂取により解決できないか、T-RFLP 法を用いた腸内細菌の占有率および便形スケール⁷⁾、日本語版便秘評価尺度 (以下, CAS-MT)^{8~10)}を指標にプラセボ摂取群と比較を行った。また、身体測定、理学検査、末梢血液検査、血液学検査、血液生化学検査等を行い安全性につい

て検証した。

I 方 法

1 研究デザイン

本研究は、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験法にて実施した。研究計画書は医療法人社団盛心会タカラクリニック (東京都品川区) の倫理委員会にて承認を得た (承認番号: 1506-1505-NN01-01-TC)。試験参加者に対しては、試験内容を十分に説明し試験参加への同意を書面にて取得する。また、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言に則り、医学倫理に十分配慮し実施した。試験に先立ち、本試験への参加を望む者に対しインフォームドコンセントを実施し、試験の方法・医学的意義および危険性について十分に理解したうえで自ら試験に参加を望む者を試験参加者とした。介入は、2014年4月7日から2014年4月18日のあいだであった。

2 試験参加者

本試験は、排便が週2~5回の健常な日本人成人 (30~59歳) を対象とした。試験の参加にあたり、次の条件を除外基準とした。

①悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療の既往歴がある者、②心房細動、不整脈、肝障害、腎障害、脳血管障害、リウマチ、糖尿病、脂質異常症、高血圧、消化器系疾患 (潰瘍性大腸炎、胃潰瘍、大腸憩室症 (diverticular disease of the colon) を含む)、その他の慢性疾患で治療中の者、③医薬品 (漢方薬を含む) を常用している者、④整腸作用に関与すると思われるヨーグルト、オリゴ糖、乳酸菌を日頃から摂取している者、⑤アレルギー (被験品関連製品、医薬品) がある者、⑥過去3年間に、花粉症の薬を使用した

者, ⑦喫煙者, ⑧サプリメントや栄養素強化食品を習慣的に摂取している者, ⑨妊娠中, 授乳中, あるいは試験期間中に妊娠する意思のある者, ⑩同意書取得日以前の3ヵ月間において他の臨床試験に参加していた者, ⑪その他, 試験責任医師が本試験の対象として不適切と判断した者。

試験参加者の募集は, (株)オルトメディコ (東京都文京区)が運営する募集サイト Go トーロク (<https://www.gol06.jp/>) で行い, 試験参加を希望する者には (株)オルトメディコのオフィスにて試験内容を十分に説明し, 書面にて同意を得た。試験参加者に, 本試験の主宰者および資金提供者企業に所属している者は含まれなかった。検査は医療法人社団盛心会タカラクリニック (東京都品川区)にて行われた。なお, 参加者の募集は2014年2月14日から3月14日のあいだに行った。

3 試験参加者の管理

指定された分包品を定められた用法・用量のとおり摂取する。暴飲暴食を避け, それまでの食生活および生活習慣を変えない。検査前日は飲酒と過度の運動を行わない。採血を行う6時間前から飲食を禁止する。ただし, 水 (機能水は不可)のみ摂取可能とする。試験期間中に体調の変化が生じた場合は, ただちに試験機関に連絡し, 以後の対応の指示を仰ぐ。試験期間中は試験食以外の整腸作用に関与すると思われる牛乳・乳製品, ヨーグルト, オリゴ糖, 乳酸菌等の製品をなるべく摂取しないよう指導する。試験参加者には試験食品の摂取の有無, 生活状況について試験運営機関指定の日誌に毎日記録を求め, さらに試験食摂取検査前1週間および摂取期間中の便通日誌 (日付, 便通の有無, 排便量, 形状, 臭い, 爽快感, 特記事項)の記載を求めた。

4 試験食品および摂取方法

本研究に用いた試験食品は以下の工程で作製した。まず, 酵母エキスを主成分とする培地で *E. faecalis* KH2 株を培養し, 遠心分離機で菌体を洗浄した後, 菌体懸濁液の分散化処理を行い, スプレードライヤーによって粉体化した粉末を用いた (特許公報 第4621218号)。供試粉体は水に懸濁させたとき, 菌体がバラバラに分散する特徴を有していた。KH2 株含有配合比は1包あたり KH2 株粉末 100 mg (乳酸菌体として 1.0×10^{12} 個), デキストリン 900

mg とし, プラセボは KH2 株粉末の代わりとしてデキストリンを用いた。試験食品の形状はいずれも粉末であり, 試験開始前の倫理審査時に, 被験食品とプラセボ食品は色, 匂い, 風味によって判別できないことが確認された。なお, 摂取は1日1包 (1000 mg)を夕食後に水またはぬるま湯とともに摂取し, 摂取期間は1週間とした。

5 評価項目および評価方法

主要評価項目として腸内環境を測定した。測定方法は, 試験参加者の糞便を terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法^{9,10}を用いて分析し, *Bifidobacterium*, *Lactobacillales* 目, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium* cluster IV, *Clostridium* subcluster XVa, *Clostridium* cluster IX, *Clostridium* cluster XI, *Clostridium* cluster VIII, others の占有率を評価した。糞便の採取は, 採便キット (株)テクノスルガラボ)を用いた。検体は, (株)テクノスルガラボに委託した。

6 自覚症状

CAS-MT, 便形スケールを用い排便に対する自覚症状を評価した。なお, CAS-MT による検査項目は, 「お腹が張った感じ (膨れた感じ)」「排ガス量が少ない」「便の回数が少ない」「直腸に便が充満している感じ」「排便時の肛門の痛みがある」「便の量が少ない」「便が固くて出にくい」「にじみ出る水様便がある」で, 数値が低いほど自覚症状が良好であることを意味する。一方の便形スケールを用いた便の形状評価は, 便形状を以下8通りに分類し, 該当するものを選択させた。分類は「水様の下痢, 排出速度が速い」「かゆ状で, 表面が平坦, 排出速度がやや速い」「かゆ状で, 表面に起伏がある」「形がくずれかけている」「筒状でなめらかな表面」「筒状で, 表面に裂け目がある」「筒状で, 深い裂け目がある」「破片状, または兔糞様 (鹿やウサギの糞のような)」であった。

7 炎症マーカー

高感度 CRP (LA ラテックス凝集比濁法)を用い血中の CRP を測定した。測定は, (株)LSI メディエンスに委託した。

8 安全性評価

KH2 株摂取による安全性を把握するため, 身体測定, 理学検査, 尿検査, 末梢血液検査を実施した。

身体測定, 理学検査, 尿検査, 採血は医療法人社団 盛心会タカラクリニックにて行い, 末梢血液検査は (株) LSI メディエンスへ委託した。

身体測定は, 身長, 体重, body mass index (BMI), 体脂肪率を評価項目とし, 身長は身長計で測定し, 体重と BMI, 体脂肪率は ZEUS9.9 (株) 神戸メディケア) を使用して測定した。理学検査は, 収縮期血圧, 拡張期血圧, 脈拍数を電子血圧計 ES-P730 (テルモ (株)) を用い測定した。尿検査は, 試験参加者より尿を 25 mL 採取し, Aution Mini Am-4290 (アークレイ (株)) でタンパク (正常値 -, 正常値外 ±, 1+, 2+, 3+, 4+), ブドウ糖 (正常値 -, 正常値外 ±, 1+, 2+, 3+, 4+), ウロビリノーゲン (正常値 正常, 正常値外 1+, 2+, 3+, 4+), ビリルビン (正常値 -, 正常値外 1+, 2+, 3+, 4+), ケトン体 (正常値 -, 正常値外 ±, 1+, 2+, 3+, 4+), 亜硝酸塩 (正常値 -, 正常値外 1+, 2+), pH (正常値 5.0-7.5, 正常値外 4.5 以下, 8.0 以上), 潜血 (正常値 - 正常値外 ±, 1+, 2+, 3+) を分析した。末梢血液検査は, 試験参加者の静脈血を 13 mL 採血し, AST (GOT), ALT (GPT), γ -GTP, ALP, LD (LDH), LAP, 総タンパク, 尿素窒素, クレアチニン, 尿酸, CK, 血清アミラーゼ, 総コレステロール, HDL-コレステロール, LDL-コレステロール, トリグリセリド (TG=中性脂肪), 遊離脂肪酸, グルコース, ヘモグロビン A1c (HbA1c=NGSP), グリコアルブミン, 白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット値, 血小板数, MCV (平均赤血球容積), MCH (平均赤血球色素量), MCHC (平均赤血球色素濃度), 白血球像を分析した。

9 選抜, ランダム化と盲検化

試験参加に同意した者は 42 名で, そのうち試験責任医師の問診や選抜基準により 12 名を除外した。選抜基準は, スクリーニング検査における腸内フローラ検査で *Bifidobacterium* の占有率が少ない者であった。よって, 30 名を本試験に組み入れ, KH2 株含有顆粒分包品摂取群 (KH2 群) 15 名と KH2 株をデキストリンに置き換えたプラセボ群 (15 名) ずつに, ランダムに割り付けた。割り付け責任者は, StatLight #11 Ver. 2.10 (ユックムス (株), 神奈川県川崎市) を用いて割り付けた。作成された割り付け表は,

受託臨床試験機関の試験食品発送担当者によりのみ提供され, 試験食品発送担当者は割り付け表に従い試験に組み入れられた試験参加者へ試験食品を郵送にて送付した。試験食品発送後, 割り付け表は症例および統計解析手法が固定されるまで厳重に保管された。盲検化の対象は, 主宰者, 試験責任医師, 試験分担医師, 試験食品発送担当者を含むすべての試験実施医療機関のスタッフ (試験担当責任者, 実施運営責任者, モニタリング担当者, 統計解析担当者・責任者など), 試験実施機関のスタッフ, 倫理委員会の構成メンバー, 臨床検査委託機関であり, 割り付け表は解析対象者および統計解析手法が固定されるまで, 割り付け責任者が封緘し, 保管した。

10 統計解析

本研究の解析データセットは, サブグループセットとした。本研究における full analysis set (FAS) の定義は, 全登録症例より「割り付けられた介入の提供を受けた症例」「対象集団の条件を満たさない症例 (確定診断により対象外疾患と判定されている症例や, 明確に定義された客観的に判定可能な重要な選択・除外基準に抵触する症例)」「ランダム化後介入を一度も受けていない症例」「ランダム化後のデータがまったくない症例」を除外したものとしており, サブグループセットは FAS より「ベースライン時の排便日数が 6 日以上の症例」を除外したものとした。

群間比較は, 試験食品群とプラセボ群を比較することとし, 平均値と標準偏差で示した。摂取前 (ベースライン) と変化量の比較は Student の *t* 検定, 摂取 1 週間後の測定値の比較はベースラインを共変量, 群を固定因子とした共分散分析 (ANCOVA) を用いた。

尿検査の pH と比重は, 平均値と標準偏差で示し, Student の *t* 検定を用いて群間比較した。ブドウ糖, タンパク質, ビリルビン, ウロビリノーゲン, 潜血, ケトン体, 亜硝酸塩, 白血球は, 正常または偽陽性・陽性に該当する各群の *n* 数を示し, χ^2 検定を用いて群間比較した。

すべての統計解析は, SPSS ver. 23.0 (日本アイ・ビー・エム (株)) を使用し, 有意水準 5% 未満の両側検定とし, $P < 0.05$ を有意差, 0.1 を傾向差有りとした。なお, 多仮説により発生する多重性は考慮しないものとした。

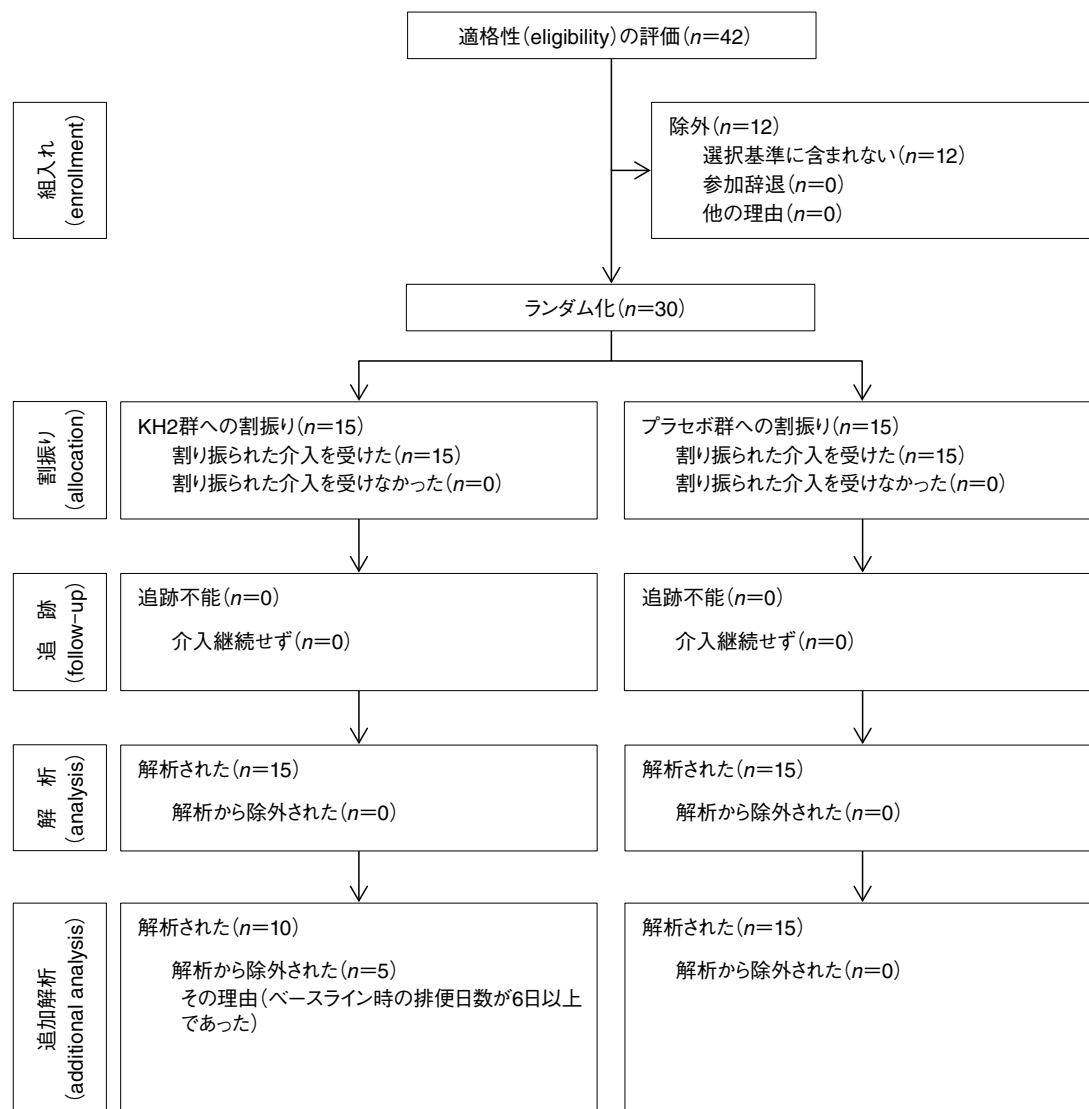


図 1 試験参加者の追跡フローチャート

表 1 サブグループ (排便日数が 6 日未満) の試験参加者背景 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| | プラセボ群 (n=15) | | KH2 群 (n=10) | | 有意確率 |
|---------|------------------------|----------------|------------------------|---------------|------|
| 性別 | 男性: 3 (20.0%) | 女性: 12 (80.0%) | 男性: 2 (20.0%) | 女性: 8 (80.0%) | 1.00 |
| -30代 | 男性: 1 (6.7%) | 女性: 4 (26.7%) | 男性: 1 (10.0%) | 女性: 3 (30.0%) | — |
| -40代 | 男性: 2 (13.3%) | 女性: 6 (40.0%) | 男性: 1 (10.0%) | 女性: 4 (40.0%) | — |
| -50代 | 男性: 0 (0.0%) | 女性: 2 (13.3%) | 男性: 0 (0.0%) | 女性: 1 (10.0%) | — |
| 年齢 (歳) | Mean ± SD: 42.9 ± 6.2 | | Mean ± SD: 39.7 ± 6.6 | | 0.23 |
| 身長 (cm) | Mean ± SD: 160.5 ± 8.1 | | Mean ± SD: 160.3 ± 8.0 | | 0.95 |

表 2 腸内環境 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 単位 | 摂取前 | | | | | | 摂取 1 週間後 | | | | | |
|-----------------------------------|----|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| <i>Bifidobacterium</i> | % | 8.9 | 5.9 | 12.0 | 10.2 | 6.0 | 14.5 | 12.8 | 7.9 | 17.8 | 10.4 | 3.6 | 17.1 |
| Lactobacillales 目 | % | 4.5 | 2.8 | 6.2 | 3.5 | 0.4 | 6.6 | 4.0 | 2.4 | 5.6 | 1.8 | 1.2 | 2.4 |
| <i>Bacteroides</i> | % | 33.5 | 28.0 | 39.0 | 44.3 | 39.3 | 49.4 | 37.7 | 31.8 | 43.6 | 43.9 | 38.5 | 49.4 |
| <i>Prevotella</i> | % | 4.6 | 0.5 | 8.7 | 0.7 | -0.6 | 2.0 | 7.5 | -0.1 | 15.1 | 2.6 | -1.7 | 7.0 |
| <i>Clostridium</i> clusterIV | % | 11.6 | 7.2 | 16.1 | 5.8 | 2.5 | 9.1 | 7.3 | 4.2 | 10.5 | 7.4 | 4.5 | 10.3 |
| <i>Clostridium</i> subclusterXIVa | % | 22.0 | 18.3 | 25.7 | 22.0 | 18.2 | 25.8 | 17.2 | 14.7 | 19.7 | 20.8 | 17.3 | 24.3 |
| <i>Clostridium</i> clusterIX | % | 2.9 | 1.9 | 3.9 | 1.4 | 0.0 | 2.8 | 4.2 | 2.7 | 5.6 | 4.0 | 0.6 | 7.4 |
| <i>Clostridium</i> clusterXI | % | 0.8 | 0.3 | 1.3 | 0.9 | 0.3 | 1.4 | 1.3 | 0.5 | 2.2 | 0.7 | 0.2 | 1.2 |
| <i>Clostridium</i> clusterVIII | % | 1.5 | 0.9 | 2.1 | 2.3 | 1.1 | 3.4 | 1.5 | 0.8 | 2.2 | 1.6 | 1.0 | 2.1 |
| Others | % | 9.6 | 5.6 | 13.5 | 8.8 | 6.3 | 11.4 | 6.5 | 5.1 | 7.9 | 6.7 | 5.7 | 7.8 |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

表 3 便通状態 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 単位 | 摂取前 | | | | | | 摂取 1 週間後 | | | | | |
|--------|-----|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| CAS 得点 | 点 | 4.3 | 2.7 | 6.0 | 5.6 | 3.3 | 7.9 | 2.2 | 1.3 | 3.1 | 2.6 | 1.3 | 3.9 |
| 排便日数 | 日/週 | 3.5 | 2.9 | 4.1 | 3.4 | 2.5 | 4.3 | 5.1 | 4.5 | 5.6 | 4.8 | 3.9 | 5.7 |
| 排便回数 | 回/週 | 3.6 | 3.0 | 4.2 | 3.7 | 2.8 | 4.6 | 5.3 | 4.8 | 5.8 | 5.2 | 4.2 | 6.2 |
| 排便量 | 個/日 | 2.8 | 2.2 | 3.4 | 2.4 | 1.8 | 3.1 | 2.8 | 2.3 | 3.3 | 3.6 | 2.8 | 4.3 |

** $P < 0.01$, 平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

表 4 炎症マーカー (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 単位 | 摂取前 | | | | | | 摂取 1 週間後 | | | | | |
|------|-------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| CRP | mg/dL | 0.039 | 0.017 | 0.062 | 0.082 | 0.010 | 0.154 | 0.047 | 0.026 | 0.069 | 0.040 | 0.028 | 0.051 |

平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

表 5 身体測定, 理学検査 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 単位 | 摂取前 | | | | | | 摂取 1 週間後 | | | | | |
|-------|-------------------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| 身長 | cm | 160.5 | 156.4 | 164.6 | 160.3 | 155.3 | 165.2 | — | — | — | — | — | — |
| 体重 | kg | 55.1 | 50.1 | 60.2 | 53.6 | 47.3 | 59.9 | 55.5 | 50.1 | 60.9 | 53.5 | 47.1 | 60.0 |
| BMI | kg/m ² | 21.3 | 19.9 | 22.7 | 20.8 | 18.8 | 22.7 | 21.2 | 19.9 | 22.6 | 20.7 | 18.8 | 22.7 |
| 体脂肪 | % | 22.1 | 19.9 | 24.4 | 22.0 | 19.1 | 24.9 | 22.3 | 19.7 | 25.0 | 21.7 | 18.8 | 24.6 |
| 収縮期血圧 | mmHg | 112.1 | 106.2 | 118.0 | 116.2 | 112.7 | 119.7 | 114.1 | 108.8 | 119.5 | 118.4 | 111.5 | 125.2 |
| 拡張期血圧 | mmHg | 73.2 | 68.7 | 77.6 | 77.1 | 73.8 | 80.4 | 73.7 | 68.8 | 78.6 | 76.3 | 71.3 | 81.3 |
| 心拍数 | bpm | 72.1 | 67.9 | 76.3 | 78.2 | 74.3 | 82.1 | 72.3 | 67.3 | 77.3 | 76.1 | 72.8 | 79.4 |

平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

| 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|-------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| 3.9 | -2.4 | 10.2 | 0.1 | -4.8 | 5.0 | 0.61 | 0.50 | 0.40 |
| -0.5 | -1.9 | 0.9 | -1.7 | -4.8 | 1.4 | 0.56 | 0.06 | 0.45 |
| 4.3 | -0.5 | 9.0 | -0.4 | -4.5 | 3.8 | 0.01* | 0.70 | 0.19 |
| 2.9 | -2.8 | 8.5 | 1.9 | -2.5 | 6.3 | 0.15 | 0.98 | 0.81 |
| -4.3 | -6.9 | -1.7 | 1.6 | -0.1 | 3.3 | 0.08 | 0.02* | 0.003** |
| -4.8 | -8.6 | -1.0 | -1.2 | -6.2 | 3.9 | 1.00 | 0.11 | 0.27 |
| 1.2 | -0.6 | 3.1 | 2.6 | -0.4 | 5.6 | 0.09 | 0.79 | 0.43 |
| 0.5 | -0.2 | 1.1 | -0.1 | -1.1 | 0.8 | 0.94 | 0.29 | 0.29 |
| 0.0 | -1.0 | 0.9 | -0.7 | -1.8 | 0.4 | 0.20 | 0.96 | 0.35 |
| -3.1 | -6.5 | 0.3 | -2.1 | -4.2 | 0.0 | 0.78 | 0.61 | 0.66 |

| 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| -2.1 | -3.8 | -0.4 | -3.0 | -5.1 | -0.9 | 0.38 | 0.83 | 0.53 |
| 1.6 | 0.7 | 2.5 | 1.4 | 0.4 | 2.4 | 0.90 | 0.62 | 0.77 |
| 1.7 | 1.0 | 2.4 | 1.5 | 0.4 | 2.6 | 0.85 | 0.77 | 0.72 |
| 0.0 | -0.5 | 0.4 | 1.2 | 0.4 | 1.9 | 0.40 | 0.01** | 0.01** |

| 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| 0.008 | -0.013 | 0.028 | -0.043 | -0.116 | 0.030 | 0.21 | 0.43 | 0.14 |

| 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| - | - | - | - | - | - | 0.95 | - | - |
| 0.4 | -0.3 | 1.0 | 0.0 | -1.3 | 1.2 | 0.71 | 0.60 | 0.54 |
| -0.1 | -0.5 | 0.4 | 0.0 | -0.5 | 0.5 | 0.66 | 0.98 | 0.90 |
| 0.2 | -1.3 | 1.7 | -0.3 | -1.5 | 0.8 | 0.96 | 0.61 | 0.61 |
| 2.0 | -1.6 | 5.6 | 2.2 | -3.4 | 7.7 | 0.32 | 0.75 | 0.96 |
| 0.5 | -2.7 | 3.8 | -0.8 | -5.3 | 3.7 | 0.22 | 0.84 | 0.64 |
| 0.2 | -3.3 | 3.7 | -2.1 | -8.7 | 4.5 | 0.06 | 0.80 | 0.51 |

表 6 尿検査 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 摂取前 | | | | 摂取 1 週間後 | | | | |
|----------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------|
| | プラセボ群 (n=15) | | KH2 群 (n=10) | | プラセボ群 (n=15) | | KH2 群 (n=10) | | |
| | 正常 | 偽陽性・陽性 | 正常 | 偽陽性・陽性 | 正常 | 偽陽性・陽性 | 正常 | 偽陽性・陽性 | |
| ブドウ糖 | 15.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 15.0 | 0.0 | 9.0 | 1.0 | |
| タンパク質 | 12.0 | 3.0 | 7.0 | 3.0 | 13.0 | 2.0 | 7.0 | 3.0 | |
| ビリルビン | 14.0 | 1.0 | 10.0 | 0.0 | 15.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | |
| ウロビリノーゲン | 15.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 14.0 | 1.0 | 10.0 | 0.0 | |
| 潜血 | 13.0 | 2.0 | 9.0 | 1.0 | 9.0 | 6.0 | 8.0 | 2.0 | |
| ケトン体 | 13.0 | 2.0 | 8.0 | 2.0 | 14.0 | 1.0 | 9.0 | 1.0 | |
| 亜硝酸塩 | 15.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 15.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | |
| 白血球 | 12.0 | 3.0 | 7.0 | 3.0 | 12.0 | 3.0 | 9.0 | 1.0 | |
| | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| pH | 5.9 | 5.6 | 6.3 | 5.7 | 5.3 | 6.0 | 5.8 | 5.4 | 6.2 |
| 比重 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

NA=not available, 平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

表 7 末梢血液検査 (群間比較/プラセボ群, KH2 群)

| 検査項目 | 基準値 | 単位 | 摂取前 | | | | | |
|---------|--------------------------------|-------------------------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| 白血球数 | 3300~9000 | / μ L | 5126.7 | 4545.7 | 5707.6 | 5100.0 | 4698.3 | 5501.7 |
| 赤血球数 | 男性: 430~570 女性: 380~500 | $\times 10^4$ / μ L | 446.2 | 423.5 | 468.9 | 432.1 | 402.2 | 462.0 |
| ヘモグロビン | 男性: 13.5~17.5 女性: 11.5~15.0 | g/dL | 13.2 | 12.4 | 14.0 | 13.2 | 12.5 | 14.0 |
| ヘマトクリット | 男性: 39.7~52.4 女性: 34.8~45.0 | % | 41.3 | 39.3 | 43.3 | 40.9 | 38.8 | 43.1 |
| 血小板数 | 14.0~34.0 | $\times 10^4$ / μ L | 25.5 | 23.5 | 27.6 | 27.1 | 22.9 | 31.3 |
| MCV | 85~102 | fL | 92.7 | 90.9 | 94.4 | 95.1 | 93.1 | 97.1 |
| MCH | 28.0~34.0 | pg | 29.6 | 28.9 | 30.2 | 30.7 | 30.0 | 31.4 |
| MCHC | 30.2~35.1 | % | 31.9 | 31.4 | 32.4 | 32.3 | 31.7 | 32.9 |
| 好中球率 | 40.0~75.0 | % | 56.6 | 50.1 | 63.1 | 61.3 | 56.6 | 65.9 |
| リンパ球率 | 18.0~49.0 | % | 34.8 | 29.3 | 40.3 | 30.8 | 26.3 | 35.2 |
| 単球率 | 2.0~10.0 | % | 4.5 | 3.7 | 5.2 | 5.7 | 4.8 | 6.6 |
| 好酸球率 | 0.0~8.0 | % | 3.5 | 2.2 | 4.7 | 1.7 | 1.1 | 2.2 |
| 好塩基球率 | 0.0~2.0 | % | 0.6 | 0.5 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.9 |
| 好中球数 | — | / μ L | 2958.4 | 2425.1 | 3491.6 | 3139.2 | 2751.3 | 3527.2 |
| リンパ球数 | — | / μ L | 1735.5 | 1458.4 | 2012.6 | 1557.9 | 1313.0 | 1802.9 |
| 単球数 | — | / μ L | 223.9 | 182.8 | 265.0 | 289.3 | 246.0 | 332.7 |
| 好酸球数 | — | / μ L | 177.0 | 107.9 | 246.1 | 83.5 | 52.9 | 114.1 |
| 好塩基球数 | — | / μ L | 31.9 | 23.1 | 40.8 | 30.0 | 18.7 | 41.3 |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

| 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | SD | | Mean | SD | | | | |
| — | — | | — | — | | NA | 0.40 | — |
| — | — | | — | — | | 0.65 | 0.61 | — |
| — | — | | — | — | | 1.00 | NA | — |
| — | — | | — | — | | NA | 1.00 | — |
| — | — | | — | — | | 1.00 | 0.40 | — |
| — | — | | — | — | | 1.00 | 1.00 | — |
| — | — | | — | — | | NA | NA | — |
| — | — | | — | — | | 0.65 | 0.63 | — |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| -0.1 | -0.4 | 0.2 | 0.3 | -0.2 | 0.8 | 0.31 | 0.72 | 0.19 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.39 | 0.19 | 0.78 |

| 摂取1週間後 | | | 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | | | | |
|--------------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|-------|------------|-------------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取 1週間後 | 変化量 (摂取前- 摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| 5720.0 | 5040.5 | 6399.5 | 5000.0 | 4151.7 | 5848.3 | 593.3 | 55.6 | 1131.1 | -100.0 | -902.3 | 702.3 | 0.95 | 0.15 | 0.16 |
| 449.3 | 428.4 | 470.2 | 428.2 | 391.0 | 465.4 | 3.1 | -10.1 | 16.4 | -3.9 | -23.7 | 15.9 | 0.46 | 0.47 | 0.55 |
| 13.5 | 12.7 | 14.3 | 12.9 | 11.7 | 14.2 | 0.3 | -0.1 | 0.7 | -0.3 | -1.2 | 0.6 | 0.98 | 0.22 | 0.21 |
| 42.1 | 40.1 | 44.2 | 41.1 | 37.6 | 44.5 | 0.8 | -0.3 | 2.0 | 0.1 | -2.8 | 3.0 | 0.80 | 0.60 | 0.62 |
| 26.9 | 24.9 | 28.9 | 28.5 | 22.5 | 34.5 | 1.4 | 0.2 | 2.5 | 1.3 | -1.6 | 4.2 | 0.47 | 0.88 | 0.99 |
| 93.8 | 92.2 | 95.4 | 96.0 | 91.4 | 100.6 | 1.1 | -0.2 | 2.5 | 0.9 | -3.0 | 4.8 | 0.09 | 0.94 | 0.90 |
| 30.0 | 29.4 | 30.5 | 30.2 | 28.4 | 31.9 | 0.4 | 0.2 | 0.6 | -0.5 | -1.7 | 0.7 | 0.04* | 0.05* | 0.10 |
| 31.9 | 31.3 | 32.5 | 31.4 | 30.6 | 32.1 | 0.0 | -0.4 | 0.5 | -0.9 | -1.4 | -0.4 | 0.33 | 0.02* | 0.01* |
| 58.4 | 52.7 | 64.1 | 59.7 | 56.0 | 63.4 | 1.8 | -1.4 | 4.9 | -1.6 | -5.4 | 2.3 | 0.31 | 0.39 | 0.20 |
| 32.0 | 26.8 | 37.2 | 31.3 | 27.4 | 35.2 | -2.8 | -5.6 | 0.0 | 0.5 | -2.5 | 3.5 | 0.31 | 0.25 | 0.14 |
| 5.1 | 4.4 | 5.9 | 5.5 | 4.7 | 6.3 | 0.7 | 0.0 | 1.4 | -0.2 | -0.8 | 0.5 | 0.05 | 0.48 | 0.11 |
| 3.9 | 2.5 | 5.2 | 2.5 | 1.4 | 3.6 | 0.4 | -0.2 | 1.0 | 0.9 | -0.1 | 1.8 | 0.04* | 0.57 | 0.38 |
| 0.6 | 0.5 | 0.8 | 1.0 | 0.6 | 1.3 | 0.0 | -0.2 | 0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.6 | 0.81 | 0.00** | 0.00** |
| 3401.3 | 2798.3 | 4004.2 | 2996.9 | 2444.1 | 3549.7 | 442.9 | -23.4 | 909.2 | -142.3 | -774.8 | 490.1 | 0.63 | 0.18 | 0.15 |
| 1771.3 | 1485.6 | 2057.1 | 1564.5 | 1234.4 | 1894.6 | 35.8 | -127.5 | 199.2 | 6.5 | -178.6 | 191.7 | 0.39 | 0.75 | 0.82 |
| 283.5 | 246.3 | 320.6 | 265.9 | 229.3 | 302.5 | 59.6 | 22.6 | 96.6 | -23.4 | -74.9 | 28.0 | 0.05* | 0.14 | 0.01* |
| 229.0 | 143.1 | 314.8 | 127.0 | 61.5 | 192.5 | 51.9 | 20.7 | 83.2 | 43.6 | -14.3 | 101.4 | 0.05 | 0.85 | 0.79 |
| 35.0 | 26.8 | 43.2 | 45.7 | 32.0 | 59.4 | 3.1 | -2.7 | 8.9 | 15.7 | 8.9 | 22.4 | 0.79 | 0.01* | 0.01* |

表 7 (つづき)

| 検査項目 | 基準値 | 単位 | 摂取前 | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|-------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------|
| | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2 群 (n=10) | | |
| | | | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ |
| AST (GOT) | 10~40 | U/L | 17.9 | 14.7 | 21.2 | 19.0 | 14.7 | 23.3 |
| ALT (GPT) | 5~45 | U/L | 14.3 | 9.1 | 19.5 | 15.1 | 11.4 | 18.8 |
| γ-GT (γ-GTP) | 男性: 80 以下 女性: 30 以下 | U/L | 17.3 | 13.9 | 20.6 | 22.7 | 18.4 | 27.0 |
| ALP | 100~325 | U/L | 155.2 | 136.3 | 174.1 | 173.2 | 141.2 | 205.2 |
| LD (LDH) | 120~240 | U/L | 172.1 | 157.7 | 186.5 | 173.2 | 160.7 | 185.7 |
| LAP | 男性: 45~81 女性: 37~61 | U/L | 46.3 | 43.9 | 48.8 | 46.3 | 41.4 | 51.2 |
| 総ビリルビン | 0.2~1.2 | mg/dL | 0.9 | 0.7 | 1.1 | 0.8 | 0.6 | 1.1 |
| 直接ビリルビン | 0.0~0.2 | mg/dL | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| 間接ビリルビン | 0.2~1.0 | mg/dL | 0.8 | 0.6 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.9 |
| コリンエステラーゼ (ChE) | 男性: 234~493 女性: 200~452 | U/L | 282.3 | 246.9 | 317.8 | 289.9 | 249.8 | 330.0 |
| ZTT | 2.0~12.0 | U | 8.0 | 6.8 | 9.1 | 6.1 | 4.7 | 7.4 |
| 総タンパク | 6.7~8.3 | g/dL | 7.2 | 7.0 | 7.4 | 7.1 | 6.7 | 7.4 |
| 尿素窒素 | 8.0~20.0 | mg/dL | 11.6 | 10.1 | 13.1 | 11.2 | 9.3 | 13.0 |
| クレアチニン | 男性: 0.61~1.04 女性: 0.47~0.79 | mg/dL | 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.7 |
| 尿酸 | 男性: 3.8~7.0 女性: 2.5~7.0 | mg/dL | 4.5 | 3.9 | 5.1 | 5.0 | 3.9 | 6.1 |
| CK | 男性: 60~270 女性: 40~150 | U/L | 128.7 | 51.9 | 205.5 | 107.8 | 66.8 | 148.8 |
| ナトリウム | 137~147 | mEq/L | 140.7 | 140.0 | 141.5 | 140.7 | 139.5 | 141.9 |
| カリウム | 3.5~5.0 | mEq/L | 4.0 | 3.8 | 4.1 | 3.9 | 3.7 | 4.1 |
| クロール | 98~108 | mEq/L | 102.1 | 101.2 | 102.9 | 102.5 | 101.2 | 103.8 |
| カルシウム | 8.4~10.4 | mg/dL | 9.4 | 9.2 | 9.6 | 9.4 | 9.2 | 9.6 |
| 無機リン | 2.5~4.5 | mg/dL | 4.0 | 3.7 | 4.3 | 3.6 | 3.1 | 4.1 |
| 血清鉄 | 男性: 50~200 女性: 40~180 | μg/dL | 105.9 | 89.1 | 122.7 | 92.9 | 65.2 | 120.6 |
| 血清アミラーゼ | 40~122 | U/L | 71.5 | 62.2 | 80.7 | 72.6 | 51.8 | 93.4 |
| 総コレステロール | 120~219 | mg/dL | 201.4 | 185.9 | 216.9 | 180.9 | 161.9 | 199.9 |
| HDL-コレステロール | 男性: 40~85 女性: 40~95 | mg/dL | 69.5 | 61.7 | 77.2 | 65.8 | 57.1 | 74.5 |
| LDL-コレステロール | 65~139 | mg/dL | 115.8 | 102.1 | 129.5 | 97.8 | 80.0 | 115.6 |
| TG (中性脂肪) | 30~149 | mg/dL | 70.9 | 51.6 | 90.3 | 70.6 | 51.3 | 89.9 |
| 遊離脂肪酸 | 0.10~0.90 | mEq/L | 0.6 | 0.4 | 0.7 | 0.5 | 0.4 | 0.7 |
| グルコース | 70~109 | mg/dL | 78.5 | 75.6 | 81.3 | 85.0 | 76.1 | 93.9 |
| HbA1c (NGSP) | 4.6~6.2 | % | 5.2 | 5.1 | 5.3 | 5.0 | 4.8 | 5.2 |
| グリコアルブミン | 12.3~16.5 | % | 14.5 | 13.9 | 15.2 | 14.0 | 13.3 | 14.8 |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 平均値 (Mean) と 95%信頼区間 (95%CI-, 95%CI+) で示した。

II 結 果

1 解析対象者

図 1 に試験参加者の追跡フローチャートを示した。摂取期間を通じた摂取率は、全員が 100% で

あった。よって、解析対象者は full analysis set であり、KH2 群では 15 名 (男性 3 名, 女性 12 名, 42.9 ± 6.2 歳), プラセボ群では 15 名 (男性 5 名, 女性 10 名, 42.3 ± 8.1 歳) であった。なお、本試験で定めた糞便回数 2~5 回の回数の範囲を超えた者が確

| 摂取1週間後 | | | | | | 変化量 (摂取前-摂取1週間後) | | | | | | 有意確率 | | |
|--------------|--------|--------|-------------|--------|--------|------------------|--------|--------|-------------|--------|--------|-------|--------|------------------|
| プラセボ群 (n=15) | | | KH2群 (n=10) | | | プラセボ群 (n=15) | | | KH2群 (n=10) | | | 摂取前 | 摂取1週間後 | 変化量 (摂取前-摂取1週間後) |
| Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | Mean | 95%CI- | 95%CI+ | | | |
| 21.1 | 15.5 | 26.6 | 20.8 | 14.3 | 27.3 | 3.1 | -2.1 | 8.4 | 1.8 | -3.3 | 6.9 | 0.70 | 0.78 | 0.74 |
| 18.3 | 10.3 | 26.4 | 16.9 | 12.3 | 21.5 | 4.1 | -4.6 | 12.7 | 1.8 | -3.3 | 6.9 | 0.82 | 0.76 | 0.70 |
| 20.7 | 15.4 | 26.0 | 25.6 | 18.9 | 32.3 | 3.4 | 0.5 | 6.3 | 2.9 | -1.2 | 7.0 | 0.06 | 0.37 | 0.84 |
| 162.7 | 143.4 | 182.1 | 173.9 | 138.0 | 209.8 | 7.5 | -1.1 | 16.1 | 0.7 | -19.1 | 20.5 | 0.32 | 0.59 | 0.49 |
| 179.9 | 164.2 | 195.7 | 171.0 | 151.4 | 190.6 | 7.8 | -1.2 | 16.8 | -2.2 | -13.1 | 8.7 | 0.92 | 0.19 | 0.18 |
| 48.5 | 44.7 | 52.3 | 47.2 | 42.1 | 52.3 | 2.1 | -0.4 | 4.6 | 0.9 | -1.6 | 3.4 | 0.99 | 0.53 | 0.52 |
| 0.8 | 0.7 | 1.0 | 0.8 | 0.5 | 1.0 | -0.1 | -0.3 | 0.1 | 0.0 | -0.3 | 0.2 | 0.66 | 0.94 | 0.84 |
| 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.87 | 0.63 | 0.77 |
| 0.7 | 0.6 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.9 | -0.1 | -0.2 | 0.1 | 0.0 | -0.2 | 0.2 | 0.61 | 0.88 | 0.86 |
| 291.9 | 260.7 | 323.2 | 295.6 | 240.2 | 351.0 | 9.6 | -2.0 | 21.2 | 5.7 | -24.0 | 35.4 | 0.79 | 0.81 | 0.79 |
| 7.7 | 6.6 | 8.8 | 5.8 | 4.5 | 7.2 | -0.2 | -0.6 | 0.2 | -0.2 | -0.9 | 0.4 | 0.04* | 0.66 | 0.99 |
| 7.3 | 7.2 | 7.4 | 7.0 | 6.7 | 7.3 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | -0.1 | -0.4 | 0.3 | 0.65 | 0.07 | 0.26 |
| 10.5 | 9.3 | 11.7 | 12.7 | 11.0 | 14.3 | -1.1 | -2.7 | 0.5 | 1.5 | -0.5 | 3.5 | 0.73 | 0.03* | 0.06 |
| 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | -0.1 | 0.1 | 0.93 | 0.65 | 0.63 |
| 4.7 | 4.1 | 5.3 | 4.8 | 4.0 | 5.6 | 0.1 | -0.2 | 0.5 | -0.3 | -1.2 | 0.6 | 0.42 | 0.60 | 0.36 |
| 147.7 | 20.2 | 275.1 | 88.1 | 56.4 | 119.8 | 19.0 | -34.9 | 72.9 | -19.7 | -61.7 | 22.3 | 0.69 | 0.35 | 0.32 |
| 140.1 | 139.3 | 141.0 | 140.8 | 139.7 | 141.9 | -0.6 | -1.5 | 0.3 | 0.1 | -1.0 | 1.2 | 0.96 | 0.30 | 0.35 |
| 3.9 | 3.7 | 4.1 | 4.1 | 3.8 | 4.3 | -0.1 | -0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.3 | 0.61 | 0.14 | 0.11 |
| 101.3 | 100.6 | 101.9 | 102.6 | 101.4 | 103.8 | -0.8 | -1.8 | 0.2 | 0.1 | -1.0 | 1.2 | 0.56 | 0.07 | 0.25 |
| 9.5 | 9.3 | 9.7 | 9.2 | 9.0 | 9.5 | 0.1 | 0.0 | 0.2 | -0.2 | -0.5 | 0.2 | 0.84 | 0.08 | 0.17 |
| 3.9 | 3.6 | 4.3 | 3.8 | 3.4 | 4.2 | 0.0 | -0.3 | 0.2 | 0.2 | -0.3 | 0.7 | 0.18 | 0.82 | 0.38 |
| 103.4 | 82.8 | 124.0 | 95.4 | 62.7 | 128.1 | -2.5 | -27.5 | 22.6 | 2.5 | -24.2 | 29.2 | 0.41 | 0.91 | 0.80 |
| 74.5 | 64.9 | 84.0 | 70.1 | 59.6 | 80.6 | 3.0 | -1.5 | 7.5 | -2.5 | -15.1 | 10.1 | 0.91 | 0.24 | 0.36 |
| 215.0 | 195.6 | 234.4 | 189.9 | 166.9 | 212.9 | 13.6 | 1.0 | 26.2 | 9.0 | -7.6 | 25.6 | 0.12 | 0.57 | 0.67 |
| 69.5 | 59.9 | 79.0 | 69.2 | 60.5 | 77.9 | 0.0 | -3.9 | 3.9 | 3.4 | -2.1 | 8.9 | 0.55 | 0.33 | 0.32 |
| 123.0 | 110.0 | 136.0 | 102.4 | 80.7 | 124.1 | 7.2 | -2.9 | 17.3 | 4.6 | -8.4 | 17.6 | 0.13 | 0.48 | 0.76 |
| 104.5 | 54.7 | 154.2 | 83.6 | 52.4 | 114.8 | 33.5 | -5.4 | 72.5 | 13.0 | -8.1 | 34.1 | 0.98 | 0.42 | 0.44 |
| 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.4 | 0.2 | 0.6 | 0.0 | -0.1 | 0.2 | -0.1 | -0.2 | 0.0 | 0.84 | 0.11 | 0.21 |
| 78.9 | 77.3 | 80.4 | 78.6 | 74.8 | 82.4 | 0.4 | -3.0 | 3.8 | -6.4 | -15.2 | 2.4 | 0.12 | 0.73 | 0.12 |
| 5.2 | 5.2 | 5.3 | 5.1 | 4.9 | 5.2 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | -0.1 | 0.2 | 0.11 | 0.13 | 0.89 |
| 14.2 | 13.5 | 14.9 | 13.6 | 13.0 | 14.3 | -0.3 | -0.5 | -0.2 | -0.4 | -0.6 | -0.2 | 0.32 | 0.63 | 0.62 |

認されたことから、糞便回数が定めた範囲を超えていた者5名を除外した追加解析も実施した。追加解析はKH2群では10名(男性2名,女性8名,39.7±6.6歳),プラセボ群では15名(男性3名,女性12名,42.9±6.6歳)であった。解析対象者の背景

は表1に示した。

2 腸内細菌叢

T-RFLP法による腸内菌叢についての解析の結果を表2に示した。群間比較において摂取前のKH2群とプラセボ群とのあいだに *Bacteroides* 占有率に有

意差 ($P=0.01$), 摂取後の *Clostridium cluster IV* 占有率に有意差 ($P=0.02$) を認めた。また, 摂取前と摂取 1 週間後の占有率の変化量について解析した結果, *Clostridium cluster IV* は有意 ($P=0.003$) の増加が認められた。

3 自覚症状

便通日誌による排便状態の評価 (CAS) 得点, 排便日数, 排便回数および排便量に関する結果を表 3 に示した。排便日数/週および排便回数/週に関しては KH2 群, プラセボ群ともに数値は増加した。しかし, 排便量 (個/週) のみが KH2 摂取で有意に ($P=0.01$) 増加し, 変化量においても KH2 群の排便量は有意 ($P=0.01$) に増加した。便の形状に関しては, 群間に有意差は認められなかった (データ表示なし)。

4 高感度 CRP

KH2 群とプラセボ群の群内比較と群間比較の結果を表 4 に示した。いずれの比較でも有意差は認められなかった。

5 安全性評価

身体測定, 理学検査を表 5, 尿検査を表 6, 末梢血液検査結果を表 7 に示した。

身体測定, 理学検査, 尿検査においてはプラセボ群, KH2 群ともに摂取前後, 変化量で有意な差は認められなかった。

末梢血液検査においては, プラセボ群と KH2 群の群間比較の変化量 (摂取前~摂取 1 週間後) で有意差が認められた項目は, MCHC ($P=0.013$), 好塩基球率 ($P=0.03$), 単球数 ($P=0.015$), 好塩基球数 ($P=0.011$) であった。また, 有意差が認められた項目の変化量平均値は, MCHC (プラセボ群 0%, KH2 群 -0.9%), 好塩基球率 (プラセボ群 0%, KH2 群 0.4%), 単球数 (プラセボ群 $59.6/\mu\text{L}$, KH2 群 $-23.4/\mu\text{L}$), 好塩基球数 (プラセボ群 $3.1/\mu\text{L}$, KH2 群 $15.7/\mu\text{L}$) であった。また, 群間比較の変化量で傾向差が認められた項目は, MCH ($P=0.099$), 尿素窒素 ($P=0.057$) であった。傾向差が認められた項目の変化量平均値は, MCH (プラセボ群 0.4 pg , KH2 群 -0.5 pg), 尿素窒素 (プラセボ群 -1.1 mg/dL , KH2 群 1.5 mg/dL) であった。しかし, いずれの有意差も医学的に問題のある差ではなかった。また, KH2 摂取による医学的問題のある変化, 有害事

象の報告はなく試験参加者の健康状態に問題はないことを試験責任医師が判断した。

III 考 察

本試験の目的は, 殺菌乳酸菌である *E. faecalis* KH2 の継続摂取が便秘気味 (排便が週 2~5 回) である 30 歳以上 59 歳以下の日本人成人の腸内細菌叢および炎症に及ぼす影響を評価することであり, 主要評価項目は, T-RFLP 法を用いた糞便中に含まれる腸内フローラの同定とし, 試験参加者の腸内環境を評価した。その結果, 摂取前の *Bacteroides*, 摂取後の *Clostridium cluster IV* の占有率にプラセボ群と KH2 群とのあいだに差 ($P<0.05$) が認められたが, 他の細菌に対しては差が認められなかった。また, *Clostridium cluster IV* の占有率の群間比較においては, プラセボ群が摂取前 11.6% に対し摂取 1 週間後が 7.3% と減少しているのに対し, KH2 群では摂取前が 5.8%, 摂取 1 週間後が 7.4% で増加していた。この差に対し各細菌についても占有率の変化量を求め, 両群間の変化量に有意な差があるか解析した。その結果, *Clostridium cluster IV* にのみ有意な差が認められた。この結果から, KH2 の摂取は, *Clostridium cluster IV* の占有率の保持, あるいは増加に働くことが示唆された。われわれが実施したパイロット試験 (KH2 摂取の非盲検・単群前後比較試験) においても, KH2 の摂取で *Clostridium cluster IV* の占有率が有意に上昇し, さらに CAS-MT の解析により便秘の改善が期待される結果が得られていた。*E. faecalis* KH2 の摂取が *Clostridium cluster IV* の占有率の保持あるいは増加に働くことで排便に影響することが推定された。

便通に対する自覚症状は, KH2 群とプラセボ群における排便日数, および排便回数は 2 群とも有意に増加し群間における有意の差は認められなかった。これは, プラセボ効果が現れたと推測された。しかし, 排便量に対しては KH2 群でのみ有意に増加した。この結果から, KH2 摂取は排便の頻度に影響は認められないものの, 排便 1 回あたりの量を増加させる可能性があった。CAS-MT での便秘の自覚症状評価は, KH2 群とプラセボ群ともに有意に減少しており, 2 群間の差は認められなかった。摂取前から

摂取1週間後にかけての変化量は、ややKH2群のほうが大きく症例数を増加させればCAS-MTにおいても有意な差を得ることができると考えられる。便通日誌とCAS-MTを用いた排便の評価をまとめると排便回数に差はないものの、1回あたりの排便量が増加した。便秘は、日本消化器病学会より、本来対外に排出すべき糞便を十分量かつ快適に排出できない状態と定義される¹¹⁾。また、米国消化器学会のコンセンサス会議では、残便感や週3回未満の排便、肛門直腸閉塞感などが便秘の診断基準とされた¹²⁾。本試験の結果である排便量の増加は、残便感の低下に寄与すると考えられ便秘改善が期待でき、排便量の増加は、腸内フローラの変動から*Clostridium* cluster IVの占有率の増加または保持が関与している可能性がある。近年の研究で*Clostridium* cluster IVおよび*Clostridium* subcluster XVaには単鎖脂肪酸、なかでも酪酸を産生し¹³⁾、抑制性T細胞(Treg)を誘導する菌^{14,15)}が多数存在することが報告されている。細菌によって腸内で産生された酪酸は、腸上皮細胞にすみやかに吸収されて、腸上皮細胞の増殖を促進し^{16,17)}、claudin-2, occludinなど上皮細胞間隙構成タンパクの発現を通じてtight junctionの復元に寄与し、炎症によって破壊された組織の修復に働いていると考えられている^{18,19)}。また、免疫反応の抑制に働くTreg細胞が消化管の炎症を実際に抑制しているかどうかはまだ明らかになっていないが、過剰な免疫応答を抑制し炎症の終息に関わっている可能性は高い。KH2の摂取が*Clostridium* cluster IVの維持・増加に働き、腸内菌叢の多様性維持に働く可能性が示されたことは大変意義深い。次世代シーケンサーを用いた近年の腸内細菌叢の研究により、菌叢を構成している主要な細菌であるFirmicutes, なかでもClostridialesの細菌とBacteroidetes Bacteroidalesの細菌が密接なネットワークを作り¹⁸⁾、菌叢の恒常性を保っていることが明らかにされている。今回の試験では摂取前のプラセボ群とKH2群のBacteroides占有率に有意の差が認められたため、解析を断念したが、今後症例数を増やし、事前の検査によりBacteroides占有率が同じになるように振り分けて、Bacteroides属の細菌とClostridium属の細菌との相互作用に与えるKH2摂取の影響の解析に興味もたれる。Clostridium cluster

IVは、腸内の炎症の抑制や免疫調整などをつかさどっていることが解明された腸内細菌でもある¹⁴⁾。高感度CRPの発現量は、潰瘍性大腸炎や過敏性腸症候群などの疾病に関与している^{20,21)}。そこで、本試験は副次的アウトカムとして、血中の高感度CRPを測定した。いずれの比較においても有意な差は認められなかったが、KH2群では平均値が減少していた(表4)。今後、KH2摂取における炎症マーカーを主要アウトカムとした追試験を実施し、炎症の軽減作用が認められれば、*E. faecalis* KH2の新たな訴求点となると考えている。

安全性評価項目として、摂取前と摂取1週間後に身体測定・理学検査、尿検査、末梢血液検査を実施した。血液検査において一部の項目において有意な変動は認められたが、いずれも基準値内での軽微な変動であることから、KH2に起因する変動ではないと考えられた。よって、KH2の摂取に伴う医学的に問題のある変化は認められなかった。

結 論

加熱殺菌した乳酸菌*Enterococcus faecalis* KH2株を排便が週2~5回の日本人成人に1週間継続摂取させた結果、排便量が増加し排便を促進したことが認められた。加え、*Clostridium* cluster IV占有率の増加やCRP値から抗炎症作用つながる結果を得ることができた。また、安全性に関連する検査結果から、摂取に伴う副作用はなく、安全性に問題ないことが認められた。

【利益相反】 本試験は、大協眞の所属するNPO法人日本サプリメント臨床研究会が主宰し、試験の実施および論文執筆にかかわるすべての費用を負担した。(有)バイオ研に所属する渡邊卓巳、菅辰彦および中部大学に属する河原敏男は論文の執筆、試験調査、補助に携わった。山下慎一郎、山本和雄の所属は、NPO法人日本サプリメント臨床研究会が本試験を委託した(株)オルトメディコである。本試験の実施はNPO法人日本サプリメント臨床研究会と(株)オルトメディコが共同で行った。高良毅は、医療法人社団盛心会タカラクリニックに所属する本試験の責任医師であり、試験参加者の健康管理にあたった。

文 献

- 1) 平山和宏. ヒトの腸内菌の分類に関する総論. 腸内細菌誌 2016; 30: 5-15.
- 2) Gilliland SE, Speck ML, Nauyok GF Jr, Giesbrecht FG. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. Journal of Dairy Science 1978; 61 (1): 1-10.
- 3) Benno Y, Mitsuoka T. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. Microbiol Immunol 1992; 36 (7): 683-94.
- 4) Mitamura R, Ueda A, Hasegawa K, Obata A. Effects of mixed vegetable and fruit juice containing a sterilized lactic acid fermented vegetable on defecation. The Bulletin of Studies on QOL and Well-Being 2015; 10 (1): 61-6.
- 5) Jounai K, Sugimura T, Ohshio K, Fujiwara D. Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection. PLoS One 2015; 10 (3): e0119055. doi: 10.1371/journal.pone.0119055.
- 6) 西基, 三宅浩次, 国本正雄: 女子高校生の便秘に関与する因子. 小児保健研 2002; 61 (3): 520-4.
- 7) McMillan SC, Williams FA. Validity and reliability of the constipation assessment scale. Cancer Nurs 1989; 12: 183-8.
- 8) 深井喜代子, 杉田明子, 田中美穂. 日本語版便秘評価尺度の検討. 看研 1995; 28: 201-8.
- 9) 深井喜代子, 塚原貴子, 人見裕江. 日本語版便秘評価尺度を用いた高齢者の便秘評価. 看研 1995; 28: 209-16.
- 10) Davies GJ, Crowder M, Reid B, Dickerson JW. Bowel function measurements of individuals with different eating patterns. Gut 1986; 27: 164-9.
- 11) 便秘の定義. In: 日本消化器病学会関連研究会, 慢性便秘の診断・治療研究会. 慢性便秘症診療ガイドライン 2017. 2版. 南江堂; 2017. p.2.
- 12) 徳井教孝, 三成由美. 便秘の定義と便秘体質. 薬膳科学研究所研究紀要 2012; 5: 49-54.
- 13) Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 1654-61.
- 14) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. Science 2011; 331: 337-41.
- 15) 本田賢也ほか. 腸管におけるT細胞応答における腸内共生菌の役割. 腸内細菌誌 2011; 25: 103-4.
- 16) Sakata T, von Engelhard W. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1983; 74: 459-62.
- 17) Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gäbel G, Martens H, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. Ann N Y Acad Sci 2012; 1258, 52-9.
- 18) Lozupone C, Faust K, Raes J, Faith JJ, Frank DN, Zaneveld J, et al. Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. Genomic Res 2012; 22: 1974-84.
- 19) Fadlallah J, El Kafsi H, Sterlin D, Juste C, Parizot C, Dorgham K, et al. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. Sci Transl Med 2018; 1217: 1-15.
- 20) Zilberman L, Maharshak N, Arbel Y, Rogowski O, Rozenblat M, Shapira I, et al. Correlated expression of high-sensitivity C-reactive protein in relation to disease activity in inflammatory bowel disease: lack of differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. Digestion 2006; 73: 205-9.
- 21) Hod K, Dickman R, Sperber A, Melamed S, Dekel R, Ron Y, et al. Assessment of high-sensitivity CRP as a marker of micro-inflammation in irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil 2011; 23: 1105-10.

受理日 (2020-2-29), 採択日 (2020-3-25)

* * *