

大黃甘草湯と腸内微生物叢の
クロストークに着目した
漢方薬の有用性の解明

福山大学薬学部 漢方薬物解析学研究室

高山 健人

目 次

緒 言	1
第 1 編 複合成分系薬物としての大黃甘草湯の有用性の解明	
第 1 章 HPLC による大黃甘草湯のセンノシド A 代謝定量法	5
1. 大黃甘草湯代謝混液におけるセンノシド A の定量方法	
2. 検量線ならびに添加回収試験	
3. 日内日差変動	
第 2 章 甘草に含まれるセンノシド A 代謝促進成分	12
1. センノシド A 代謝における甘草の影響	
2. リクイリチンによるセンノシド A の腸内代謝変化	
3. リクイリチンによるセンノシド A の下剤活性変化	
第 3 章 大黃に含まれるセンノシド A 代謝促進成分	19
1. センノシド A 代謝における大黃および大黃成分の影響	
2. Rhein 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside によるセンノシド A の腸内代謝変化	
3. Rhein 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside によるセンノシド A の下剤活性変化	
第 4 章 Rhein 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside およびリクイリチンによるセンノシド A 代謝促進機序	26
1. Rhein 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside およびリクイリチンのセンノシド A 代謝促進 機序	
2. 腸内微生物叢におけるセンノシド A 代謝酵素の合成に与えるセンノシド A 代謝促進成分の影響	
3. <i>Bifidobacterium spp.</i> におけるセンノシド A 代謝酵素の合成に与える rhein 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside の影響	
第 1 編 小 括	31

第2編 腸内微生物叢の変動によるクロストークの変化に適応する大黄甘草湯の有用性の解明	
第1章 抗菌薬による大黄甘草湯の薬効発現に与える影響	32
1. 大黄甘草湯の腸内代謝に及ぼす抗菌薬の影響	
2. 大黄甘草湯の下剤活性に及ぼす抗菌薬の影響	
第2章 アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の薬効発現に与える影響	37
1. アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の腸内代謝の変化	
2. アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の下剤活性の変化	
3. T-RFLP を用いたアンピシリン投与前後の腸内微生物叢の解析	
第3章 食餌による大黄甘草湯の薬効発現に与える影響	42
1. 食餌による大黄甘草湯の腸内代謝に与える影響	
2. 食餌による大黄甘草湯の下剤活性に与える影響	
第4章 大黄甘草湯の連日投与による下剤活性変化と腸内微生物叢の変動	47
1. 大黄甘草湯の連日投与による下剤活性変化	
2. 大黄甘草湯の連日投与による腸内微生物叢の変動	
第2編 小括	54
総括	56
実験方法	57
論文目録	71
引用文献	72
謝辞	78

略語一覧

ABPC : ampicillin

BPSD : behavioral and psychological symptoms of dementia

CAM : clarithromycin

CFPN-PI : cefcapene pivoxil

DK : daiokanzoto

FOM : fosfomicin

FRPM : faropenem

GL : glycyrrhizin

GR : glycyrrhiza

HPLC : high performance liquid chromatography

KM : kanamycin

LA : liquiritin apioside

LQ : liquiritin

LVFX : levofloxacin

MINO : minocycline

NMR : nuclear magnetic resonance

RG : rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside

SA : sennoside A

T-RFLP : terminal restriction fragment length polymorphism

TRP : transient receptor potential

緒 言

漢方医学は、5～6世紀ごろに中国医学が伝来し、江戸時代に日本独自で発展した伝統医学のことである。漢方医学の理論の下で使用される漢方薬は、複数の「生薬」の組合せから成り立っており、2016年現在では294処方一般用漢方製剤として規定され、148処方が医療用漢方製剤として承認されている[1]。西洋医学が中心の現代医療においても、漢方薬を処方している医師は89%に上り、漢方薬を第一選択薬として処方することがある医師は59%に上ることが報告されている[2]。このように漢方薬が臨床現場において頻用される理由として、漢方エキス製剤の開発や漢方薬の健康保険への適応などの他に、西洋薬では満足に改善できない症状に対する有効性や、治癒が困難な病気を治せる特異的な効果が期待されて使用されている。

漢方薬は数千年の年月をかけた莫大な臨床実績の上に確立された薬である。一方で、漢方薬の臨床効果における十分な基礎研究は行なわれてきておらず、ほとんどの漢方薬はその作用機序なども明確ではなかった。しかし、近年においては、漢方薬の薬理的なエビデンスも次々と報告され始めている。神経の高ぶる症状を抑える目的で使用される抑肝散は、認知症による幻覚や妄想などの周辺症状（BPSD）に対する効果が認められている[3]。その作用機序として、抑肝散の構成生薬である甘草の主要成分グリチルリチンが、興奮性アミノ酸神経であるグルタミン酸神経系におけるグルタミン酸トランスポーターを活性化[4]することで効果を発現することが明らかにされている[5]。また、開腹手術後のイレウスの予防や治療に有効性が認められている大建中湯[6]は、構成生薬である乾姜により微小血管拡張作用を示すアドレノメデュリンを動員することが明らかにされている。その作用機序として、乾姜の6-ショールオールが腸管粘膜上皮細胞膜にあるTRPチャンネルを介して作用を発現することが解明されている[7]。

漢方薬は複数の生薬を組み合わせる処方構成される複合成分系薬物であるため、個々の成分の意義やそれらの相互作用などを十分に考慮する必要がある。漢方薬を構成する生薬の主要成分のみで、漢方薬の本質や特徴的な薬効を説明することは困難である。漢方薬を構成する各生薬間の相互作用は、薬効の増強や副作用の緩和など人体への作用を発揮するにあたり重要な意味を持つと考えられる。気管支喘息などの症状緩和に用いられる麻杏甘石湯は、構成生薬に麻黄と石膏が含まれており、麻杏甘石湯の煎液中に含まれるエフェドリンやプソイドエフェドリンの量は他の麻黄を含む漢方薬よりも含量が多く、このエフェドリン類の溶解補助に石膏の硫酸カルシウムが関与していることが報告されている[8, 9]。このように薬剤学的な相互作用に関する研究成果は複数報告されている一方で、薬理的な複合作用による漢方薬の薬効の増強や副作用の緩和について明らかにしている報告はほとんどなく、西洋薬にはない漢方薬の有する特徴的な薬効を十分に解明するには至っていない。

大黄は『神農本草経』の下品に収載され、非常に古くから薬用に用いられており、

ヨーロッパでも『ギリシア本草』（ディオスコリデス）に収載され、中国からヨーロッパに輸出された数少ない生薬である。大黄は大腸刺激性下剤に分類され、西洋薬に劣らない強い下剤作用を有する。大黄を含む漢方薬は大黄剤と呼ばれ、大黄甘草湯、調胃承気湯、大承気湯、桃核承気湯、大黄牡丹皮湯、通導散、大柴胡湯、防風通聖散、三黄瀉心湯、茵陳蒿湯など多くの大黄剤が臨床で使用されている。大黄剤の基本処方である大黄甘草湯は、大黄と甘草の二味から成る漢方薬で、二重盲検臨床比較試験で便秘症における有用性が証明された代表的な緩下剤である[10, 11]。大黄の主有効成分はビアントロン配糖体であるセンノシド A（0.25%以上含有）を中心とするセンノシド類（A～F）である。漢方薬の多くは配糖体を主要成分として含んでおり、漢方薬の薬効発現にこれらが深く関与していると考えられている。漢方薬に含まれる代表的な配糖体として大黄のセンノシド類の他に、甘草のグリチルリチン、芍薬のペオニフロリン、柴胡のサイコサポニン類などがよく知られている。このような漢方薬に含まれる配糖体の多くは、 β 結合のため消化酵素ではほとんど分解されず、消化管下部で腸内微生物叢が産生する酵素によって代謝変換を受け薬効を発現する場合が多い。センノシド類は特異な腸内細菌（*Bifidobacterium sp. SEN*）由来の β -グルコシダーゼによって加水分解を受けセニジンとなり、さらに還元されてレインアンスロンへ変換され下剤作用を示す[12-14]。マウスにおけるレインアンスロンの下剤作用の機序として、主にプロスタグランジン E₂ を介する大腸蠕動運動ならびに結腸の粘液分泌を促進する作用により発現すると説明されてきた[15, 16]。それに加えて、近年では腸管表皮細胞膜にある水輸送チャネルのアクアポリン 3 の発現に、レインアンスロンの関与が示唆されており[17]、センノシド A の詳細な下剤活性メカニズムが明らかになってきている。以上のことから、配糖体を含む漢方薬の薬効発現において腸内微生物叢による代謝変換は極めて重要な役割を担っていると考えられる。

ヒトの腸管は小腸（十二指腸、空腸、回腸）と大腸（盲腸、結腸、直腸）からなり、その長さは7～9 m で、断面積は約 200 m²にも及ぶ。その腸内には約 100 兆個にも及ぶ腸内細菌が腸内微生物叢を形成しており、約 37 兆個から成るとされるヒトの体細胞数を遥かに上回る。その菌種の多様性は 500 から 1000 種以上とも言われ、腸内微生物叢は生体を構成する 1 つの臓器にも例えられている。腸内微生物叢は、ヒトの消化酵素では十分に代謝できなかった食事成分などを代謝して、アミノ酸やビタミン、脂肪酸などを生体に供給している。また、腸内微生物叢は、胆汁酸代謝やコレステロール代謝、有害な代謝産物の解毒など物質代謝の調節や、外部から侵入してきた病原体に対する生体バリアの強化、腸管上皮細胞の分化誘導など、さまざまな機能を担っている[18, 19]。そのため、腸内微生物叢は生体にとって必要不可欠な存在であり、生体と腸内微生物叢は共進化を遂げた 1 つの超有機体としても考えられている。近年では、食事内容や抗生物質などの薬物摂取、ストレスなどにより腸内微生物叢の構成異常（dysbiosis）が生じることで、消化器疾患だけにとどまらず、自己免疫疾患やアレルギー疾患、メタボリックシンドロームや精神神経疾患などさまざまな疾病の発症

に關与することが明らかになってきている [20-29]。

腸内微生物叢はさまざまな疾病の発症との直接的な關係性が科学的に証明され始めていることから、多彩な薬効を有している漢方薬の特徴的な薬効は、腸内微生物叢により漢方薬成分が代謝変換されるだけでなく、漢方薬成分が腸内微生物叢の多様性や腸内細菌の持つ酵素活性など機能変化に影響を及ぼすことによって発現しているのではないかと考えた (Fig. 1)。すなわち、漢方薬成分と腸内微生物叢のクロストークの結果が、漢方薬の特徴的な薬効として発現していると推論した。

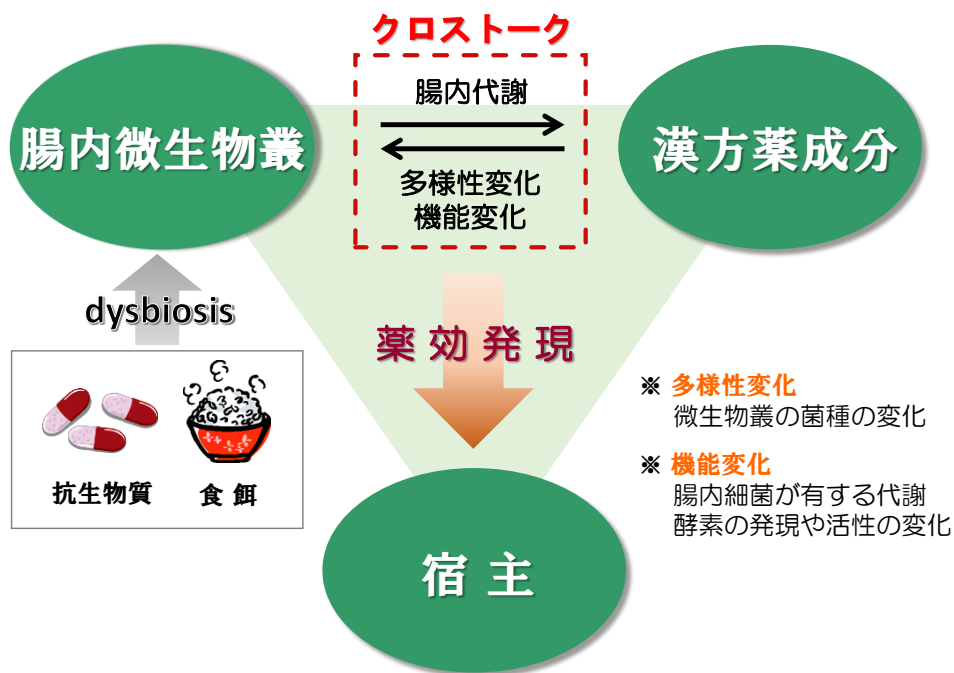


Fig. 1. Working Hypothesis to the Crosstalk between the Constituent of Kampo Medicines and Intestinal Microbiota

本研究では、一般ならびに医療用漢方製剤として便秘症の治療に頻用される大黄甘草湯について、腸内微生物叢とのクロストークに着目して漢方薬の有用性を解明していく。大黄甘草湯は、主有効成分であるセンノシド A からなる西洋薬 (プルゼニド) と同様に便秘症の治療に頻用されるが、大黄甘草湯に含まれるセンノシド A 以外の他成分の薬効や相互作用などは明らかにされておらず、腸内微生物叢に与える影響なども全く解明されていない。また、大黄甘草湯は下剤活性を有するため、他の漢方薬とは異なり *in vivo* における評価が明瞭であるため、本研究では大黄甘草湯について漢方薬の有用性を解明することとした。

第 1 編では、複合成分系薬物として的大黄甘草湯の有用性を解明するために以下に示す研究を遂行し、腸内微生物叢における多様性や機能に与える影響を証明する。

- 1) HPLCによる大黃甘草湯のセンノシドA代謝定量法の確立(第1章)
- 2) 甘草に含まれるセンノシドA代謝促進成分の同定(第2章)
- 3) 大黃に含まれるセンノシドA代謝促進成分の同定(第3章)
- 4) センノシドA代謝促進成分の作用機序の解明(第4章)

臨床現場において、漢方薬はそれ単独で使用されることよりも、西洋薬と併用して使用されることが多いことから、漢方薬と西洋薬との相互作用の問題が指摘されている[30-34]。漢方薬の有効成分の多くは配糖体であり、これらの成分の作用発現には腸内微生物叢により代謝変換される必要があると考えられることから、抗生物質などの腸内微生物叢の構成に影響を及ぼす薬物との併用は問題視されている[30, 31]。

そこで第2編では、腸内微生物叢の構成異常(dysbiosis)を引き起こした条件下で、以下に示す研究を遂行し、大黃甘草湯成分の腸内代謝および大黃甘草湯が及ぼす腸内微生物叢の多様性変化や機能変化の解析、大黃甘草湯の下剤活性変化を評価することで、大黃甘草湯の有用性を解明する。

- 1) 抗菌薬による大黃甘草湯の薬効発現に与える影響(第1章)
- 2) アンピシリン継続投与下における大黃甘草湯の薬効発現に与える影響(第2章)
- 3) 食餌による大黃甘草湯の薬効発現に与える影響(第3章)
- 4) 大黃甘草湯の連日投与による下剤活性変化と腸内微生物叢の変動(第4章)

これまでに、漢方薬成分の作用発現における腸内代謝の重要性や、疾病の発症と腸内微生物叢の関連性については多数報告されている。しかし、複合成分系薬物である漢方薬による腸内微生物叢の多様性変化や腸内微生物叢の産生する酵素などの機能変化に与える影響は研究されておらず、漢方薬と腸内微生物叢のクロストークは明らかになっていない。また、漢方薬とのクロストークを介して宿主にどのような薬効を及ぼしているのか全く解明されていない。

本研究では、大黃甘草湯による腸内微生物叢の多様性および機能変化に与える影響を明らかにし、大黃甘草湯成分と腸内微生物叢のクロストークを介した宿主に対する大黃甘草湯の薬効発現を解析することで、漢方薬の有用性を新たな視点で解明していく。

第1編 複合成分系薬物としての大黃甘草湯の有用性の解明

第1章 HPLCによる大黃甘草湯のセンノシドA代謝定量法

漢方薬は複数の生薬の組み合わせにより構成される複合成分系薬物で、その多くは配糖体を主要成分として含んでおり、漢方薬の薬効発現に深く関与していると考えられている。漢方薬に含まれる代表的な配糖体として人参のギンセノシド類や、芍薬のペオニフロリン、柴胡のサイコサポニン類などがよく知られている。このような配糖体の多くは、 β 結合のためヒトの消化酵素ではほとんど分解されず、消化管下部で腸内細菌が産生する酵素によって代謝変換を受け薬効を発現する機会が多いことから、腸内微生物叢はこれら配糖体を含む漢方薬の薬効発現に重要な役割を担っている。

大黃甘草湯の主要成分であるセンノシドAは *Bifidobacterium sp. SEN* が産生する β -グルコシダーゼによりセニジンに代謝され、さらに非酵素的に還元されることで瀉下活性本体であるレインアンスロンへ変換されることが明らかになっている (Fig. 2) [10-12]。

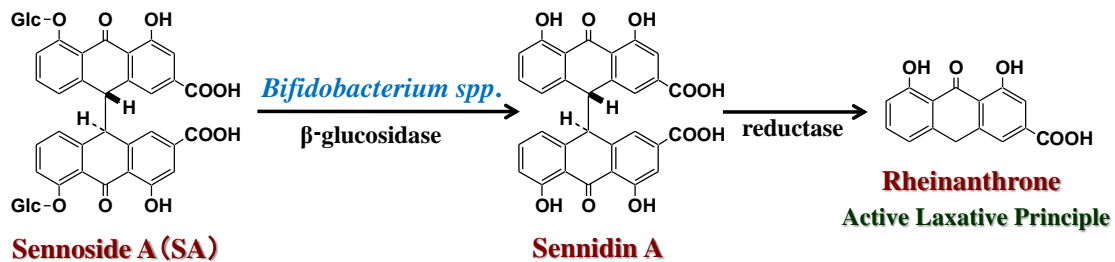


Fig. 2. Metabolism of Sennoside A by Intestinal Microbiota

本研究の目的である複合成分系薬物としての大黃甘草湯の有用性を解明するためには、センノシド類の腸内代謝における他成分の影響を *in vitro* 系で評価できる腸内代謝実験法を確立する必要がある。そこで、腸内代謝実験の指標成分としては、大黃やセンナの品質評価に一般的に用いられているセンノシドAを指標成分とした [35-38]。瀉下活性本体であるレインアンスロンは極めて酸化を受けやすいため、短時間でレインなどに変化する。そのため、小林らはセンノシドAならびにレインアンスロンを誘導化反応なしに簡便に定量できる HPLC 分析法を初めて確立し、ラットの糞便懸濁液によるセンノシドA代謝物の測定に成功している [39]。しかし、小林らの方法では、大黃や大黃甘草湯を用いるとレインアンスロンが不安定となり、再現性良く定量することは困難である。また、安原らが報告している大黃剤の多成分同時定量法 [40] では、大黃甘草湯代謝混液に生じる代謝物によってセンノシドAを正確に定量することができない。そこで、大黃甘草湯代謝混液に含まれる甘草成分グリ

チルリチンおよびリクイリチン、リクイリチンアピオシド (Fig. 3) の分析が可能であり、残存する未代謝のセンノシド A が定量できる HPLC 分析法を検討した。

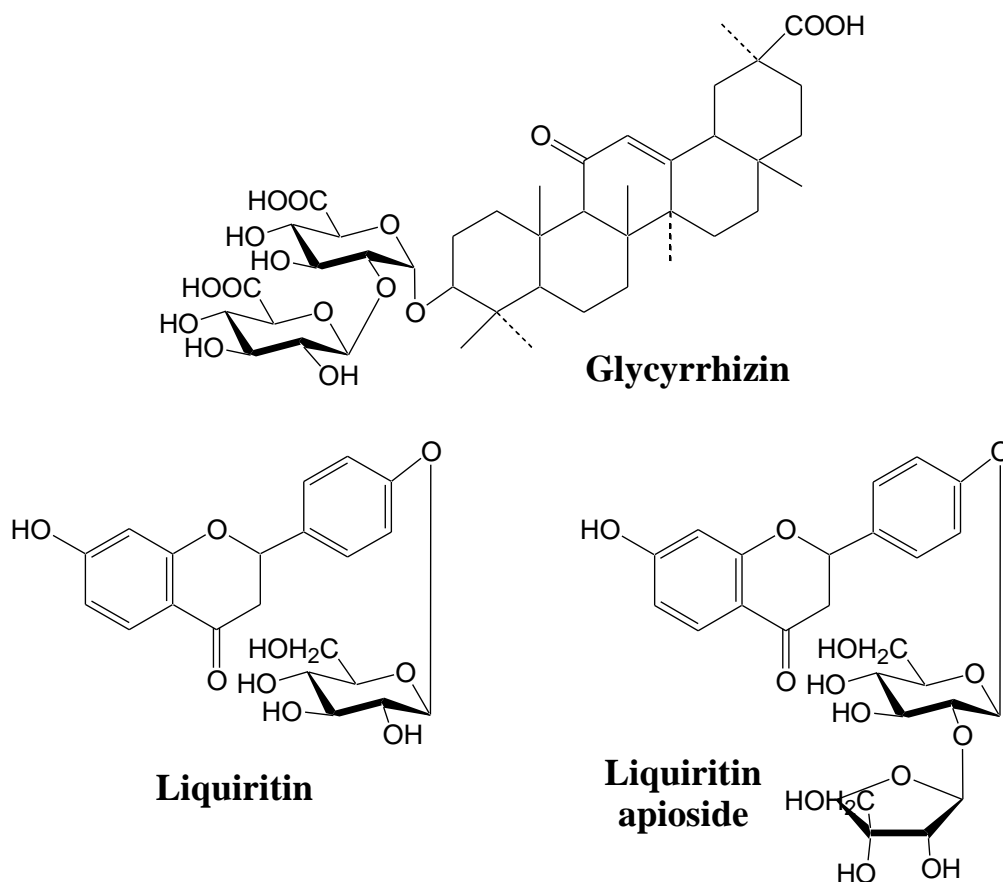


Fig. 3. Chemical Structure of Glycyrrhiza constituents

1. 大黄甘草湯代謝混液におけるセンノシド A の定量方法

大黄甘草湯ならびに大黄甘草湯のマウス糞便懸濁液中のセンノシド A、グリチルリチン、リクイリチン、リクイリチンアピオシドの同時分析を目的に、Wakosil-II 5C18HG、Wakosil-II 5C18AR、Navi C18-5 (いずれも 4.6 I.D.x15cm, 和光純薬)、Shim-pack XR-ODS (3.0 I.D.x10cm, 島津)、TSKgel ODS-120T、TSKgel ODS-80TsQA (いずれも 4.6 I.D.x15cm, 東ソー) のカラムについて、0.017%リン酸水溶液 (A 液) とアセトニトリル (B 液) による検討を行った。その結果、Fig. 4 に示すように TSKgel ODS-80TsQA (4.6 I.D.x15cm, 東ソー) に 0.017%リン酸水溶液 (A 液) とアセトニトリル (B 液) を用い、リニアグラジエント (B 液) 19–20% (0–3min)、20–21% (3–8min)、38–42% (8–16min) の条件下で、特別な前処理なしに 18 分以内にセンノシド A (9.26min) とグリチルリチン (17.04min) の最も良好な分離が得られた。ピークの純度は三次元 HPLC によりピークを 5 分割した UV スペクトルから検定した。リクイリチン (6.29min) とリクイリチンアピオシド (5.85min) については大黄由来の成分が重なるため、大黄の存在下では定量できなかった。

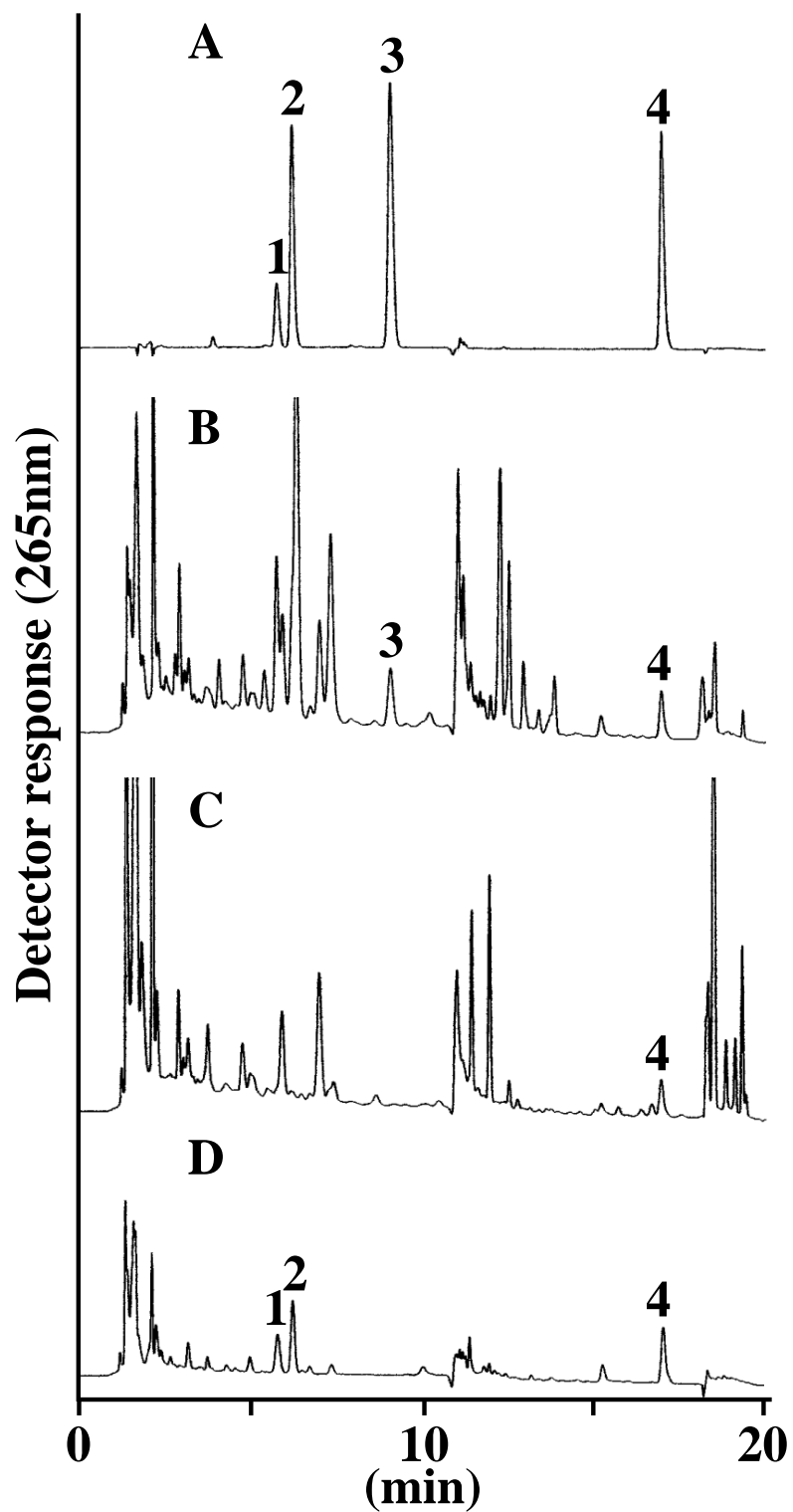


Fig. 4. HPLC Profiles of Standard (A), Daiokanzoto (B), Daiokanzoto Incubation Mixture (C) and Glycyrrhiza (D)
 Peaks: 1, liquiritin apioside; 2, liquiritin; 3, sennoside A; 4, glycyrrhizin.
 Column: TSKgel ODS-80TsQA (4.6 I.D. × 15cm)

2. 検量線ならびに添加回収試験

腸内代謝実験法に準じ、標準品のメタノール溶液（センノシド A : 24mg、グリチルリチン : 40mg、リクイリチン : 16mg、リクイリチンアピオシド : 8mg）を 1~4096 倍に希釈し、各希釈液を 0.01M リン酸塩緩衝液-0.708%リン酸メタノール溶液（リン酸混液）に添加した標準溶液を用いて検量線を作製した。しかし、標準溶液 1~4 倍希釈液（センノシド A : 0.87~3.48mM）ではセンノシド A が析出することから、リン酸混液の代わりに、精製水-メタノール（水メタノール混液）を用いた標準溶液（1~4096 倍）についても検量線を作成した。二つの検量線の傾き比（水メタノール混液/リン酸混液）は、センノシド A 0.994、グリチルリチン 0.984、リクイリチン 0.983、リクイリチンアピオシド 0.995 であった。したがって、水メタノール混液で作成した検量線を使用した。センノシド A が析出した理由として、リン酸混液は酸性であるためセンノシド A の溶解性が低下したことが考えられる。さらにリン酸混液の標準溶液を用いた添加回収試験において、センノシド A の析出を認めなかったことから、糞液懸濁液がセンノシド A の溶解性を高めていることが推察された。

Tab. 1 はリクイリチンアピオシド、リクイリチン、センノシド A、グリチルリチンの保持時間 (t_R)、質量分布比 (k')、定量範囲 (μM - mM)、回帰方程式、相関係数、検出限界 (μM) である。いずれも表に示す濃度範囲で良好な直線関係が得られた。

Tab. 1. Retention Times, Capacity Factors, Linear Response Ranges, Regression Equations, Correlation Coefficient and Detection Limit for Marker Substances

Compound	t_R (min)	k'	Linear response range (μM -mM)	Regression ^{a)} equation	Correlation ^{b)} coefficient	Detection ^{c)} limit(μM)
Liquiritin apioside	5.85	2.69	56.80 - 1.82	$y = 0.14x + 0.35$	1.0000	1.78
			3.55 - 0.23	$y = 0.14x - 0.02$	1.0000	
Liquiritin	6.29	2.97	149.48 - 2.39	$y = 0.17x + 0.42$	0.9999	2.34
			4.67 - 0.60	$y = 0.17x + 0.11$	1.0000	
SennosideA	9.26	4.84	108.67 - 1.74	$y = 0.36x + 0.39$	0.9998	1.70
			3.40 - 0.44	$y = 0.36x - 0.13$	1.0000	
Glycyrrhizin	17.04	9.75	189.87 - 6.08	$y = 0.14x + 0.63$	1.0000	2.97
			5.93 - 0.76	$y = 0.14x - 0.08$	1.0000	

^{a)}y: peak-area, x: μM . ^{b)}Triplicate assay about the different concentration ($n = 11 - 12$).

^{c)}Signal-to-noise ratio = 3.

添加回収率は糞便懸濁液の 4 時間後の代謝溶液に標準品の希釈液（リン酸混液）を添加したものと、検量線の標準溶液（水メタノール混液）から得られた回帰直線式の傾きの比から求めた（Tab. 2、Fig. 5）。センノシド A、大黄甘草湯の代謝溶液におけ

るセンノシド A、グリチルリチンの添加回収率 (%) 83.0~100.8 であった。

Tab. 2. Slopes of Regression Equations of Marker Substances with and without Feces

Marker Substance	Initial amount of decoction(μM)	Slope of standard solution ^{a)}		Recovery (%)
		with incubation mixture	without incubation mixture	
Sennoside A Daiokanzoto	0.0	0.365	0.362	100.8
Sennoside A	13.5	0.353	0.362	97.5
Glycyrrhizin	304.7	0.115	0.138	83.0

^{a)}Concentration of standards (μM): sennosideA = 52.3 - 418.6; daiokanzoto, sennosideA = 52.3 - 418.6, glycyrrhizin = 91.5 - 754.1

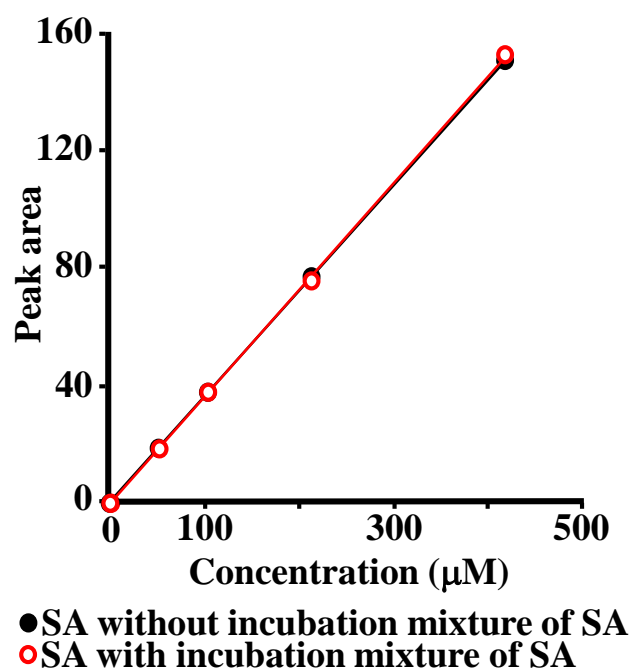


Fig. 5-1. Calibration Curves of Sennoside A (SA) with and without Incubation Mixture of Sennoside A.

Open circles: $y = 0.36x - 0.96$, $r = 0.9998$, closed circles: $y = 0.36x - 0.13$, $r = 1.0000$.

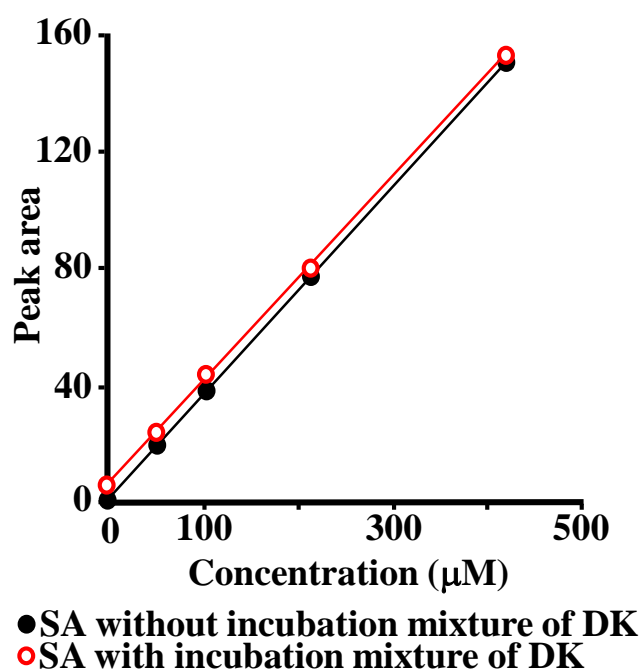


Fig. 5-2. Calibration Curves of Sennoside A (SA) with and without Incubation Mixture of Daiokanzoto (DK).

Open circles: $y = 0.35x + 4.98$, $r = 0.9999$, closed circles: $y = 0.36x - 0.13$, $r = 1.0000$.

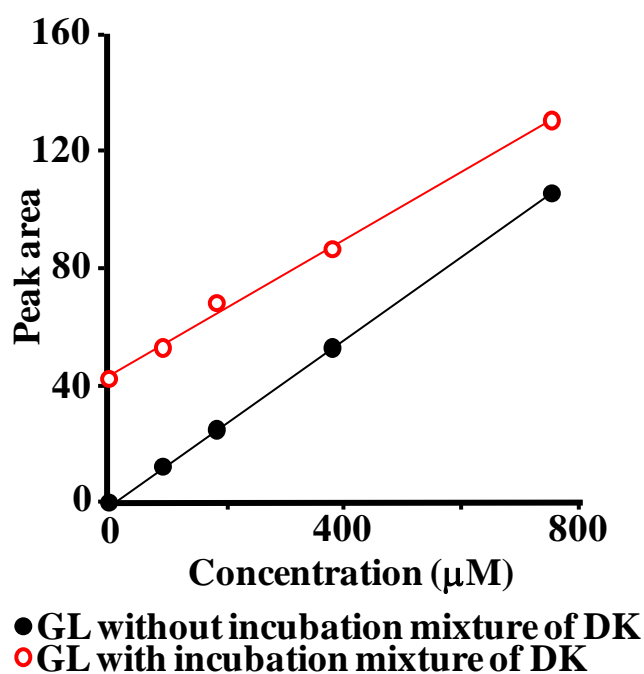


Fig. 5-3. Calibration Curves of Glycyrrhizin (GL) with and without Incubation Mixture of Daiokanzoto (DK).

Open circles: $y = 0.11x + 43.86$, $r = 0.9984$, closed circles: $y = 0.14x - 0.08$, $r = 1.0000$.

3. 日内日差変動

標準溶液ならびに大黃甘草湯の代謝溶液（反応 0 時間）を用いて日内変動（15 回）と日差変動（5 日間）を検討した（Tab. 3）。日内変動の相対標準偏差（%）は 0.25～1.04、日差変動の相対標準偏差（%）は 0.45～1.35 であり、分析上問題はないと判断した。

Tab. 3. Within-Day and Day-to-Day Relative Standard Deviations for Marker Substances in Standard and Incubation Mixtures

Marker substance	Amount (mM)	RSD (%)	
		Within-day ^{a)}	Day-to-day ^{b)}
Standard solution			
Sennoside A	0.206	0.25	0.71
Glycyrrhizin	0.374	0.38	1.35
Liquiritin	0.293	0.35	0.54
Liquiritin apioside	0.113	0.82	0.45
Daiokanzoto with feces			
Sennoside A	0.203	1.04	1.31
Glycyrrhizin	0.380	0.48	0.48

^a $n = 15$, ^b $n = 5$

第2章 甘草に含まれるセンノシドA代謝促進成分

漢方薬は複数の生薬を組み合わせた複合成分系薬物であり、各生薬間の相互作用は薬理的あるいは薬物動態的な複合作用により薬効の増強や副作用の緩和など、人体への作用を発揮するにあたり重要な意味を持つと考えられる。2016年現在、148処方がある医療用漢方エキス製剤として認められており、甘草はそのうち7割以上に配合されている生薬である。漢方薬における甘草の配合される意義として、配合される他の個性的な生薬の働きを調和し、服用困難な漢方薬の矯味剤としての役割を担っているとされる。大黄甘草湯をはじめとする大黄剤に配合される場合においても、大黄による大腸の痙攣を甘草が緩和し、強力な瀉下作用による腹痛などの副作用を緩解すると考えられている。しかし、宮脇らは、大黄甘草湯において大黄と甘草の配合割合が4:1のときに大黄の下剤活性が有意に増強することを、ラットを用いた実験において証明している[41]。我々もマウスに大黄と甘草の配合割合を変化させた大黄甘草湯を経口投与して10時間にわたり下剤活性を評価したところ、甘草添加による大黄甘草湯の下剤活性の有意な亢進を確認した (Fig. 6)。この結果から、大黄甘草湯における甘草の配合意義として、大黄による下剤効果を増強していることが示唆されるが、大黄甘草湯の主有効成分であるセンノシドAの代謝活性および下剤活性の発現における甘草の影響については報告されていない。そこで、センノシドAの腸内代謝および下剤活性における甘草ならびに甘草成分の影響を検討した。

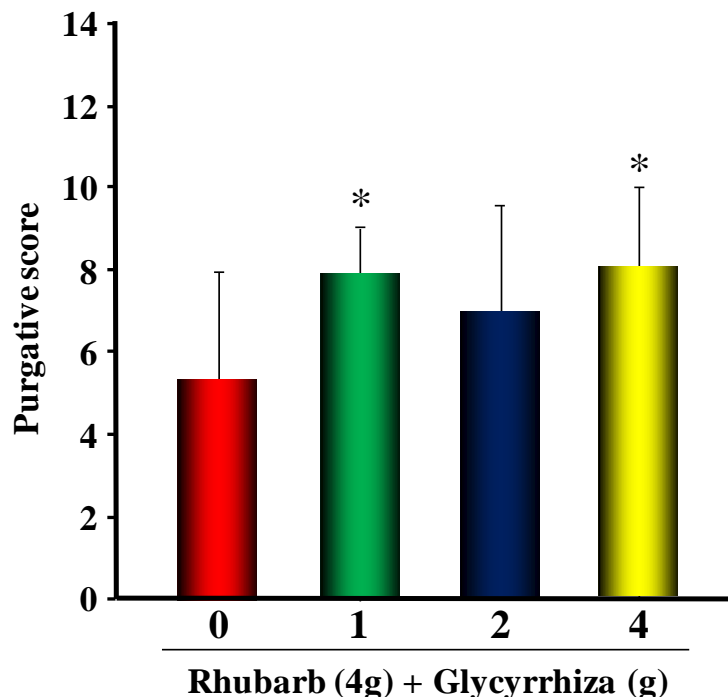


Fig. 6. Effects of Daiokanzoto and Rhubarb on Purgative Action

Each column represents the mean ± S.D. of 12 mice. * $p < 0.05$, significant difference from glycyrrhiza (0g) (Steel's test).

1. センノシドA代謝における甘草の影響

センノシドAの腸内代謝における甘草の影響を検討した。センノシドA (0.5mM) と甘草凍結乾燥品 (1/4 倍~4 倍量) を混合した試料溶液をマウス糞便懸濁液 (排便後 1.5 時間以内に採取した糞便の 5 倍希釈液) に添加し、嫌気条件下 37°C でインキュベートした。センノシドA (0.5mM) と甘草凍結乾燥品 (4.25mg) の割合は大黄甘草湯中のセンノシドA とグリチルリチンを基準に設定した。

甘草の凍結乾燥品を混合したときのセンノシドAの代謝率は Fig. 7 の通りである。甘草は 1/4 (1.063mg) ならびに 1/2 倍量 (2.125mg) で最もセンノシドAの代謝を促進し、甘草の量を増加させることでセンノシドA代謝を抑制した。これは甘草に含まれる共存成分による代謝抑制が考えられる。

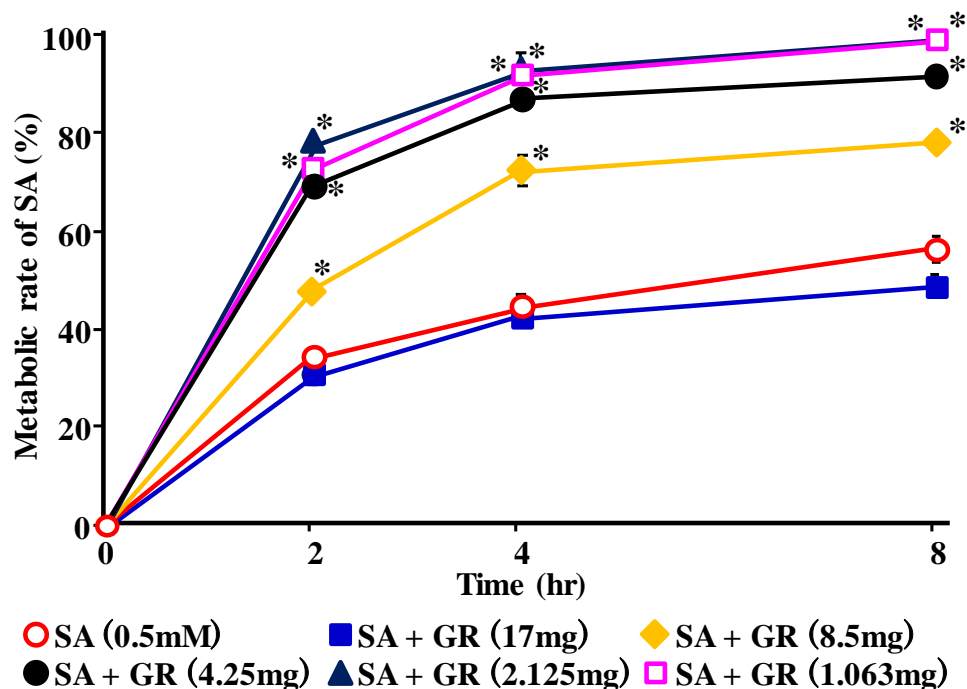


Fig. 7. Accelerating Effect of Glycyrrhiza (GR) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. * $p < 0.05$, significant difference from sennoside A (Dunnett's test).

2. リクイリチンによるセンノシドAの腸内代謝変化

甘草の主要成分であるグリチルリチン、リクイリチン、リクイリチンアピオシドについて、センノシドA代謝における影響を検討した。センノシドA (0.5mM) とグリチルリチン、リクイリチン、リクイリチンアピオシド (1/16 倍~4 倍量) を混合した試料溶液をマウス糞便懸濁液に添加し、嫌気条件下 37°C でインキュベートした。センノシドA (0.5mM) とリクイリチン (2.4mM)、リクイリチンアピオシド (1.5mM) およびグリチルリチン (3.9mM) の割合は、大黄甘草湯に含まれるセンノシドAとの割合を基準に設定した。リクイリチンは濃度依存的にセンノシドA代謝を促進さ

せ、1 倍量 (2.4mM) または 2 倍量 (4.8mM) が最も顕著で、8 時間後において 1/16 倍量 (0.15mM) 以外はいずれもセンノシド A 単独と比較して有意なセンノシド A 代謝促進を認めた (Fig. 8)。リクイリチンアピオシドもリクイリチンと同様に濃度依存的にセンノシド A の代謝を促進させ、8 時間後においてはいずれもセンノシド A 単独と比較して有意なセンノシド A 代謝促進を認めた (Fig. 9)。一方、グリチルリチンはいずれの濃度においてもセンノシド A 代謝の有意な変化を認めなかった (Fig. 10)。

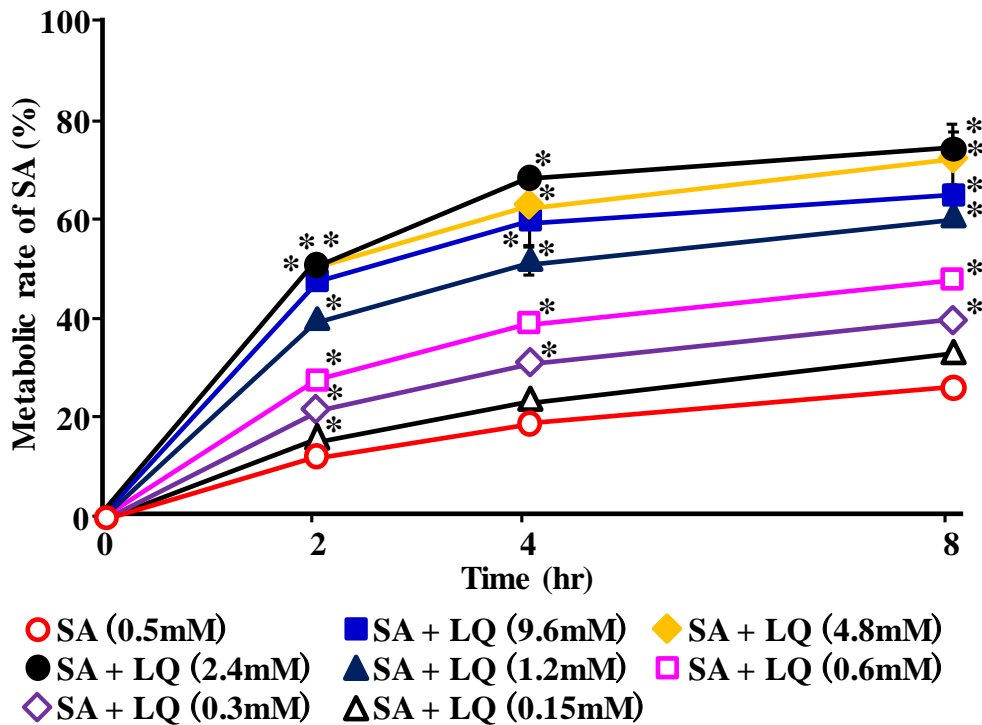


Fig. 8. Accelerating Effect of Liquiritin (LQ) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. * $p < 0.05$, significant difference from sennoside A (Dunnett's test).

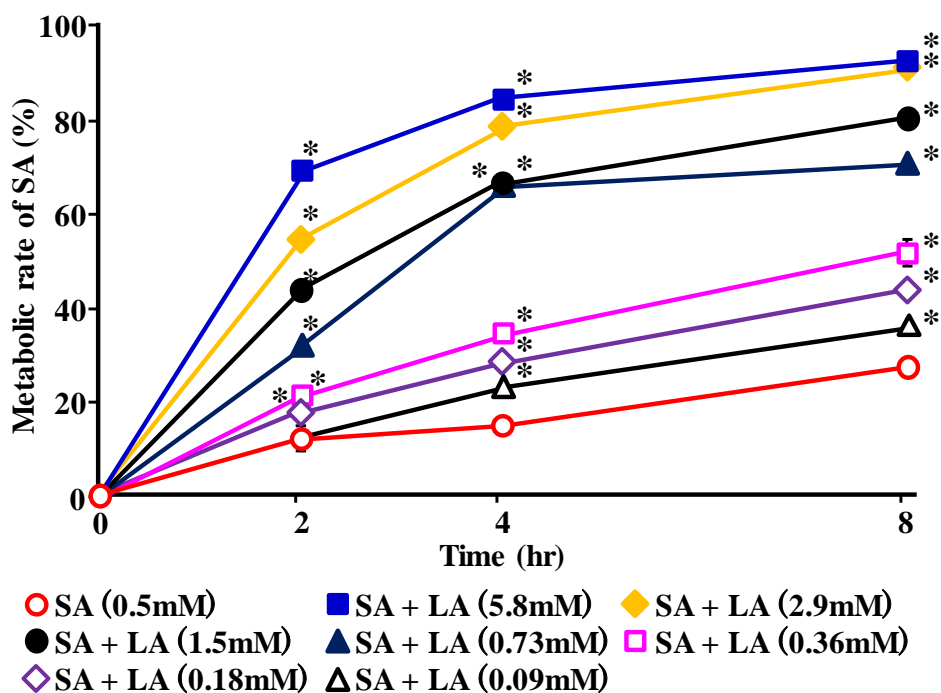


Fig. 9. Accelerating Effect of Liquiritin apioside (LA) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. * $p < 0.05$, significant difference from sennoside A (Dunnett's test).

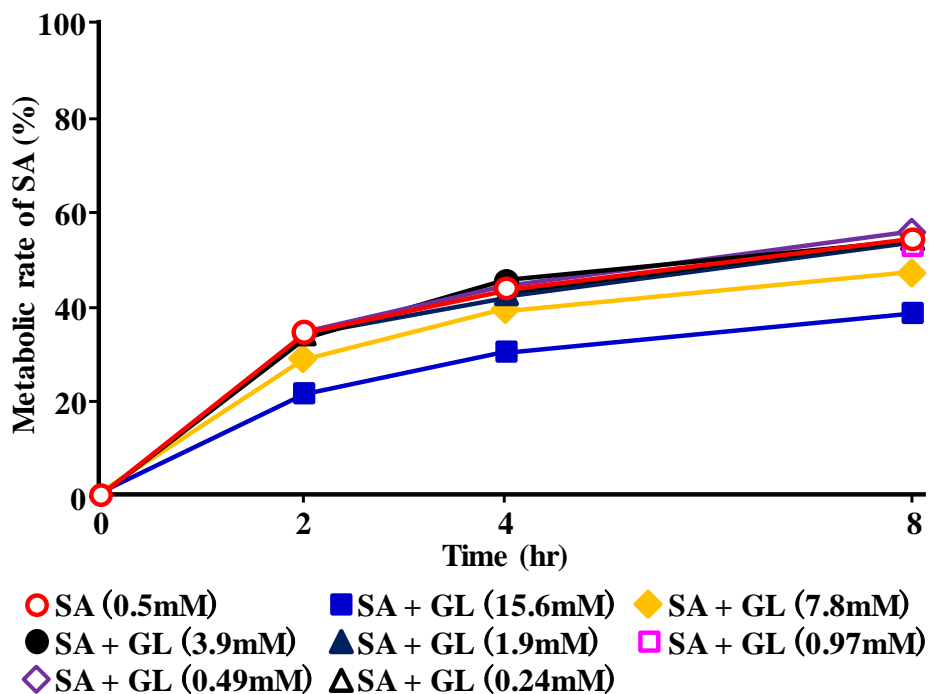


Fig. 10. Accelerating Effect of Glycyrrhizin (GL) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. * $p < 0.05$, significant difference from sennoside A (Dunnett's test).

3. リクイリチンによるセンノシドAの下剤活性変化

大黃甘草湯の甘草に含まれるフラボノイド成分であるリクイリチン、リクイリチンアピオシドがセンノシド A の腸内代謝を促進することから、大黃甘草湯の下剤活性におけるリクイリチンとリクイリチンアピオシドの寄与が示唆された。そこで、センノシド A の下剤活性に及ぼす甘草及びこれら成分の影響について、マウスを用いた下剤活性評価法によって検討を行った。下剤活性評価は、マウスを投与1時間前からビーカーをかぶせた網上に放置し、下痢をしていない正常便排出マウスのみを使用した。実験中は絶食絶水とし、経口投与後下剤活性を1時間毎10時間にわたり観察し、正常便、膨潤便、軟便、泥状便、粘液便に分類し個数を記録した。下痢の程度は、斉藤らの方法 [42] に準じ、観察時間内に排出された便のうち最も性状が悪化したものを採用した。便の状態を普通便（正常便，膨潤便）：0、軟便：1、水様便（泥状便、粘液便）：2 の3段階にスコア化し、各個体での10時間の合計の平均値を算出し各群の下痢スコアとした。

センノシド A (15mg/kg) は10時間後の下痢スコアが1.5未満となるように設定し、センノシド A (15mg/kg) と甘草凍結乾燥品 (170mg/kg) の割合は大黃甘草湯中のセンノシド A とグリチルリチンの割合を基準に設定した。その結果を Fig. 11 に示す。甘草は濃度依存的に下剤活性を亢進し、2倍量と4倍量で下剤活性の有意な増強を示した。

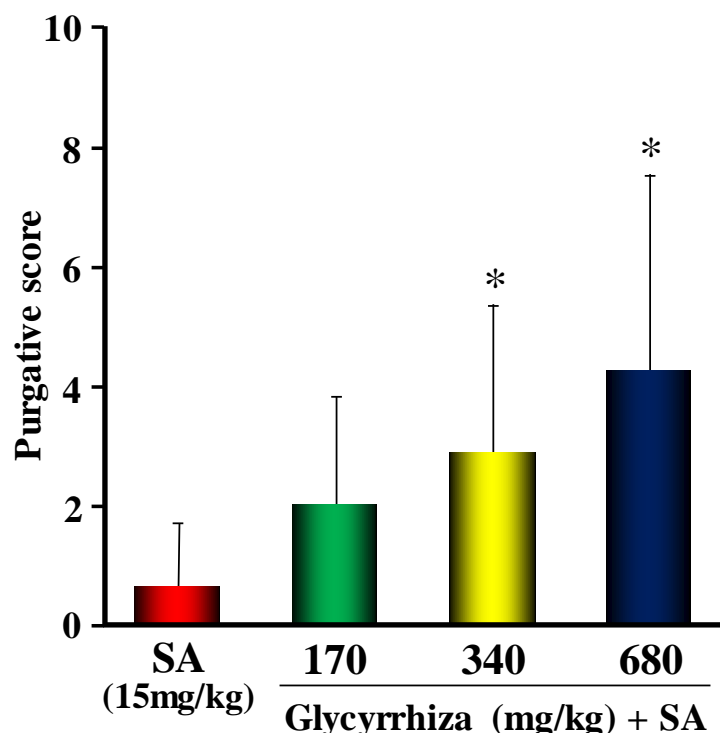


Fig. 11. Accelerating Effect of Glycyrrhiza on Purgative Action of Sennoside A

Each column represents the mean ± S.D. of 10 mice. * $p < 0.05$, significant difference from glycyrrhiza (0mg) (Steel's test).

甘草によりセンノシド A の下剤活性は有意に亢進したことから、甘草の主要成分であるグリチルリチン、リクイリチン、リクイリチンアピオシドについて、センノシド A の下剤活性における影響を検討した。センノシド A (15mg/kg) とリクイリチン (10mg/kg)、リクイリチンアピオシド (8mg/kg)、グリチルリチン (32mg/kg) の割合は大黄甘草湯中のセンノシド A との割合を基準に設定した。その結果、リクイリチンは濃度依存的に下剤活性を亢進し、4 倍量 (40mg/kg) で下剤活性の有意な増強を示した (Fig. 12)。リクイリチンアピオシドもリクイリチン同様、濃度依存的に下剤活性を亢進し、2 倍量 (16mg/kg) と 4 倍量 (32mg/kg) で下剤活性の有意な増強を示した (Fig. 13)。一方、グリチルリチンは腸内代謝実験の結果と同様に、いずれの濃度においても下剤活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。

センノシド A は甘草によって腸内代謝が促進し、甘草の主成分であるリクイリチン及びリクイリチンアピオシドがこれに関与していることを明らかにした。さらに下剤活性評価でも甘草、リクイリチン、リクイリチンアピオシドがセンノシド A の下剤活性を亢進することを確認した。このことから、甘草のフラボノイド成分であるリクイリチン及びリクイリチンアピオシドがセンノシド A の腸内代謝を促進することで下剤活性を亢進することを明らかにし、大黄甘草湯における甘草の配合意義を証明した。

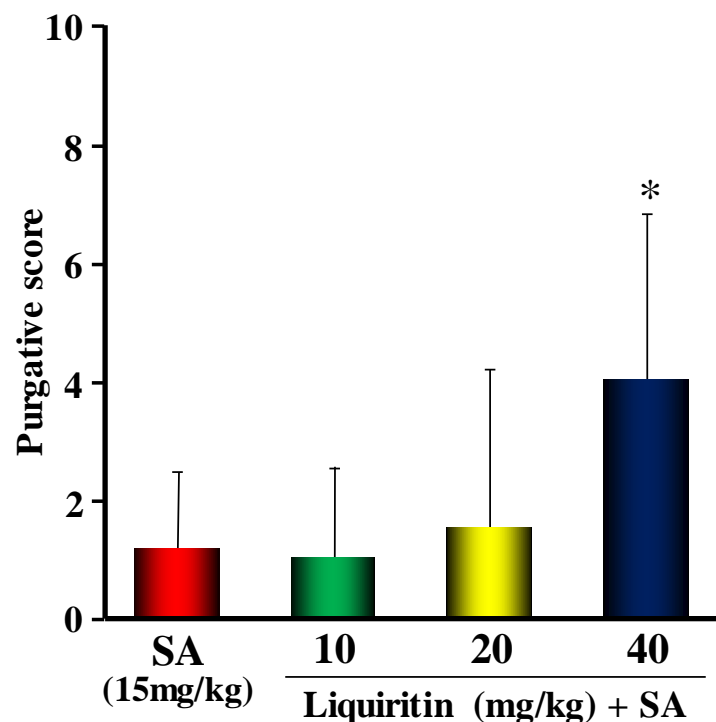


Fig. 12. Accelerating Effect of Liquiritin on Purgative Action of Sennoside A

Each column represents the mean \pm S.D. of 12 mice. * p <0.05, significant difference from liquiritin (0mg) (Steel's test).

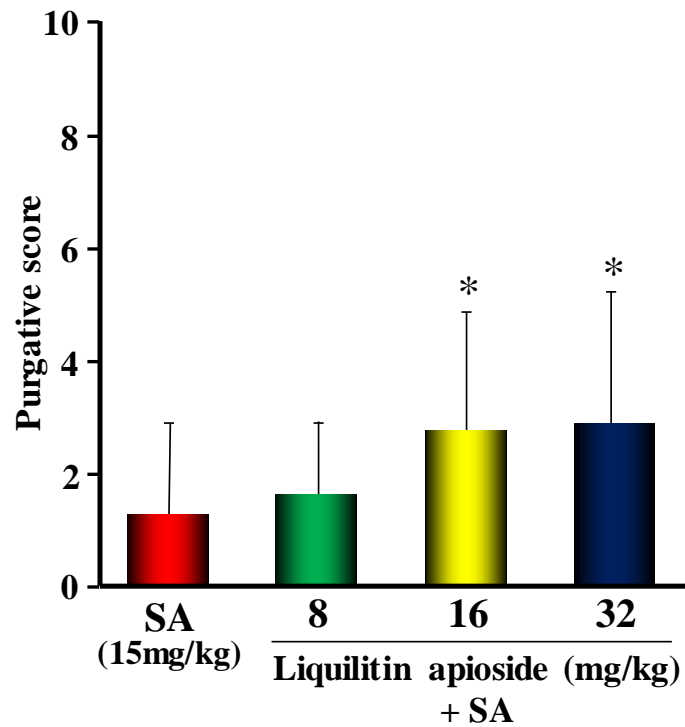


Fig. 13. Accelerating Effect of Liquilitin apioside on Purgative Action of Sennoside A

Each column represents the mean \pm S.D. of 12 mice. * p <0.05, significant difference from liquilitin apioside (0mg) (Steel's test).

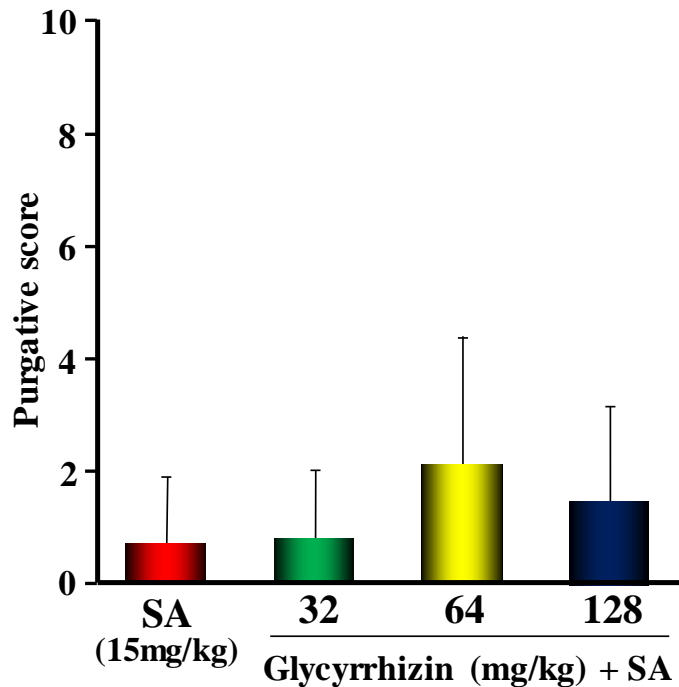


Fig. 14. Accelerating Effect of Glycyrrhizin on Purgative Action of Sennoside A

Each column represents the mean \pm S.D. of 12 mice. * p <0.05, significant difference from glycyrrhizin (0mg) (Steel's test).

第3章 大黄に含まれるセンノシド A 代謝促進成分

第2章において、甘草のフラボノイド成分であるリクイリチンおよびリクイリチンアピオシドがセンノシド A の腸内代謝を促進することで下剤活性を亢進することを明らかにし、大黄甘草湯における甘草の配合意義を証明した。大黄について含有する個々の成分の薬理作用は多く解明されている。また、大黄に含まれる成分間の相互作用については、センノシド A とセンノシド C の相乗作用に関する研究が行われており、センノシド A と C の両者の混合比が7 : 3のときにそれぞれの単独投与と比較して下剤活性が1.7倍高くなるという結果が報告されている[43]。しかし、センノシド A の腸内代謝や下剤活性に与える大黄に含まれる他成分の影響に関しては報告されていない。そこで本研究では、センノシド A の腸内代謝活性ならびに下剤活性に及ぼす大黄成分の影響について検討した。

1. センノシド A 代謝における大黄および大黄成分の影響

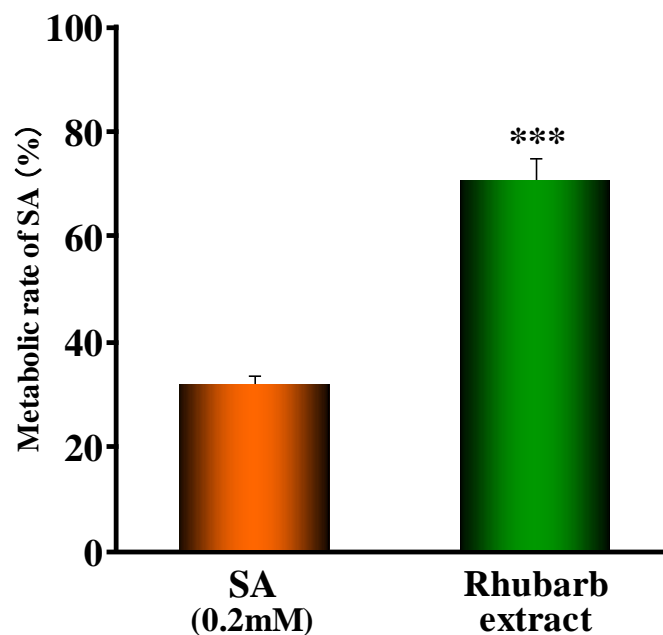


Fig. 15. Effect of Rhubarb constituents on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** $p < 0.001$, significant difference from SA (Student's *t*-test).

大黄には、センノシド A 以外にも弱いながら下剤活性を示す成分が多く含まれているが[44]、大黄に含まれるそれらの成分がセンノシド A の腸内代謝に与える影響については報告されていない。そこでセンノシド A 代謝における大黄成分の影響を検討するために、大黄 (17mg/mL) に含まれるセンノシド A と同量のセンノシド A 単独 (0.2mM) について代謝率を比較した (Fig. 15)。その結果、大黄中のセンノシド A

はセンノシド A 単独と比較して有意に代謝を促進したことから、大黃の中にセンノシド A 代謝を促進する成分の存在が示唆された。そこで、センノシド A 代謝を促進する成分を探索するために、大黃 (100g) を熱水抽出し、抽出液を DIAION MCI-gel CHP-20P を用いて Fr. I から Fr. V までの 5 つのフラクションに分画した (Fig. 16)。HPLC パターンは Fig. 17 に示す。

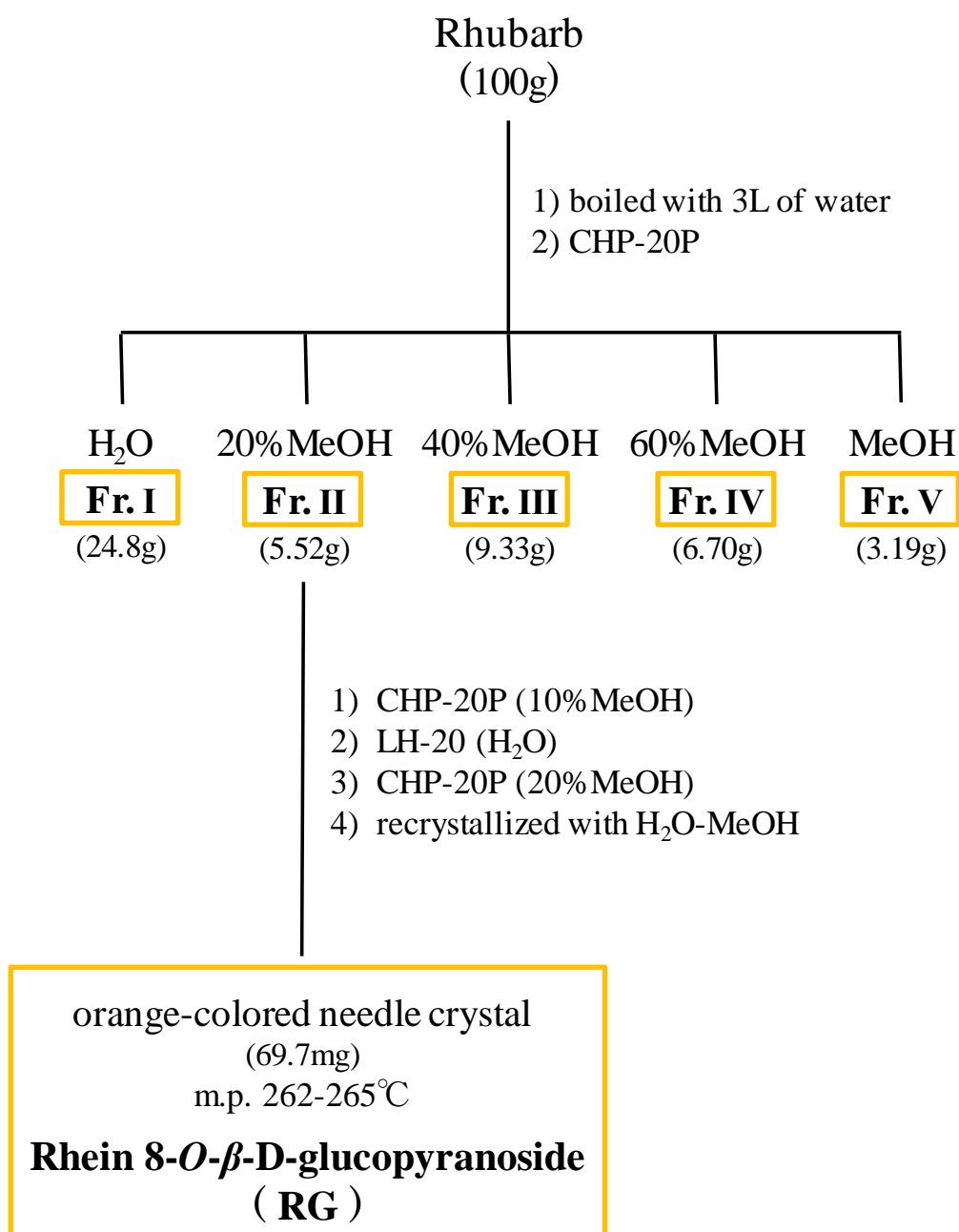


Fig. 16. Isolation of Accelerating Constituent of Sennoside A-Metabolic Activity from Rhubarb Extract

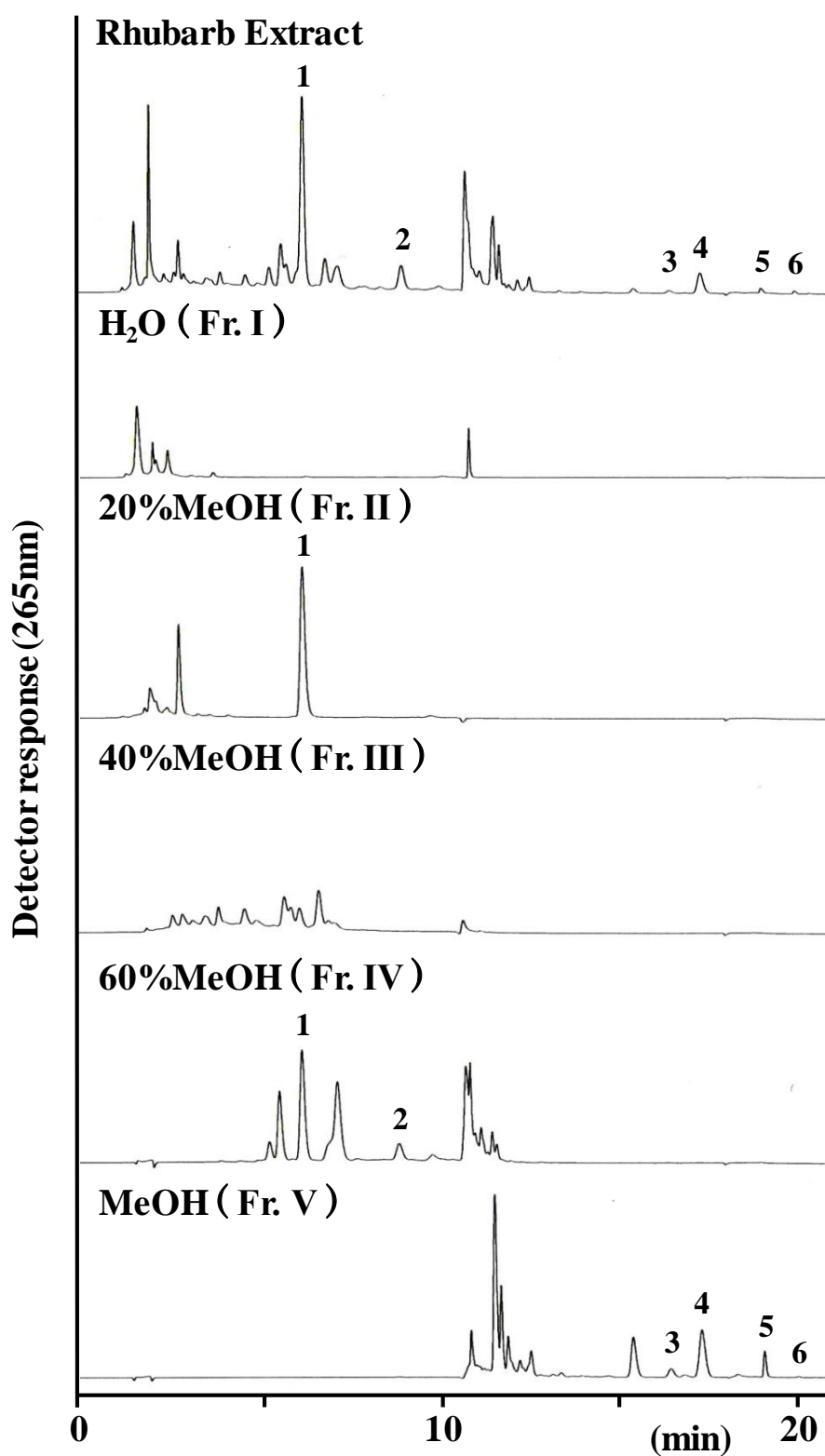


Fig. 17. HPLC Profiles of Rhubarb Extract, and H₂O, 20%, 40%, 60% MeOH and MeOH-eluted Fractions

Peaks (Retention time): 1, unknown (6.52min); 2, sennoside A (9.24min); 3, aloe-emodin (16.62min); 4, rhein (17.59min); 5, emodin (19.20min); 6, chrysophanol (20.13min)

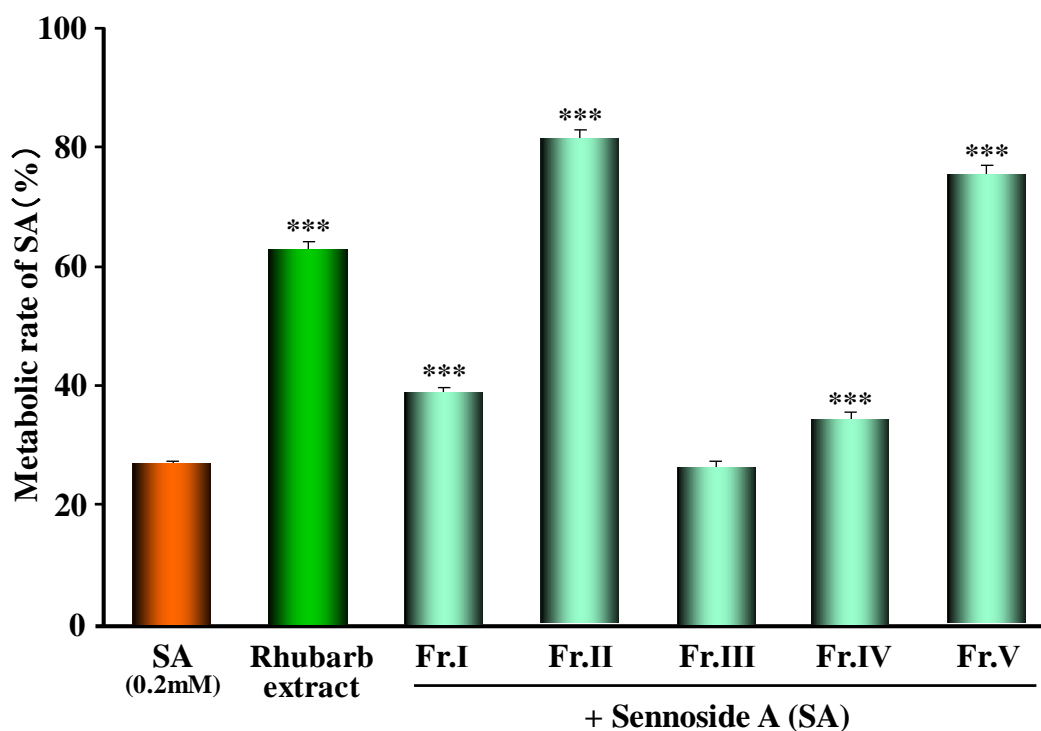


Fig. 18. Accelerating Effect of Fractions eluted from Rhubarb on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant difference from SA (Dunnett's test).

それぞれの大黄抽出画分をセンノシド A に添加してセンノシド A 代謝を検討したところ、20% MeOH 画分 (Fr. II) ならびに MeOH 画分 (Fr. V) の添加によりセンノシド A 代謝を大きく促進させた (Fig. 18)。20% MeOH フラクシヨンの主要ピークは、HPLC による UV スペクトルからアントラキノン骨格を有している可能性が考えられた。そこで、20% MeOH フラクシヨンの主要ピークについて Sephadex LH-20 と DIAION MCI-gel CHP-20P を用いて単離・精製し、各種 NMR スペクトルならびに融点から rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) と同定した (Fig. 19)。MeOH フラクシヨンには、RG のアグリコンであるレインやその関連物質 (エモジン、アロエエモジン) であるアントラキノン類が主要ピークとして含有していることを標準品との比較で明らかにした。

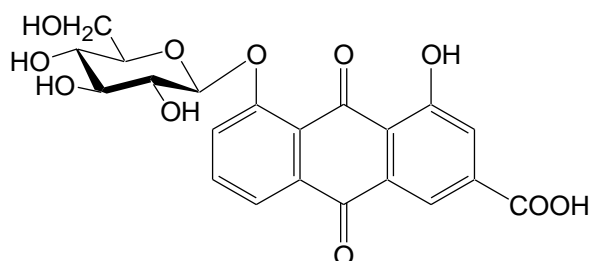


Fig. 19. Chemical Structure of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside

2. Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside によるセンノシド A の腸内代謝変化

大黃から単離精製した RG がセンノシド A 代謝を促進するか検討したところ、RG はセンノシド A 代謝を濃度依存的に有意な促進を示した (Fig. 20)。RG はレインをアグリコンとするグルコースの配糖体である。そこで、レインについて同様に検討したところ、濃度依存的にセンノシド A 代謝を有意に促進した。この結果から、RG のセンノシド A 代謝促進作用は、RG のアグリコンであるレインに起因することが明らかとなった。また、大黃に含まれる RG およびレインの濃度はセンノシド A (0.2mM) に対してそれぞれ 1mM、0.25mM であり、大黃の薬効発現に強く関与していることが示唆された。

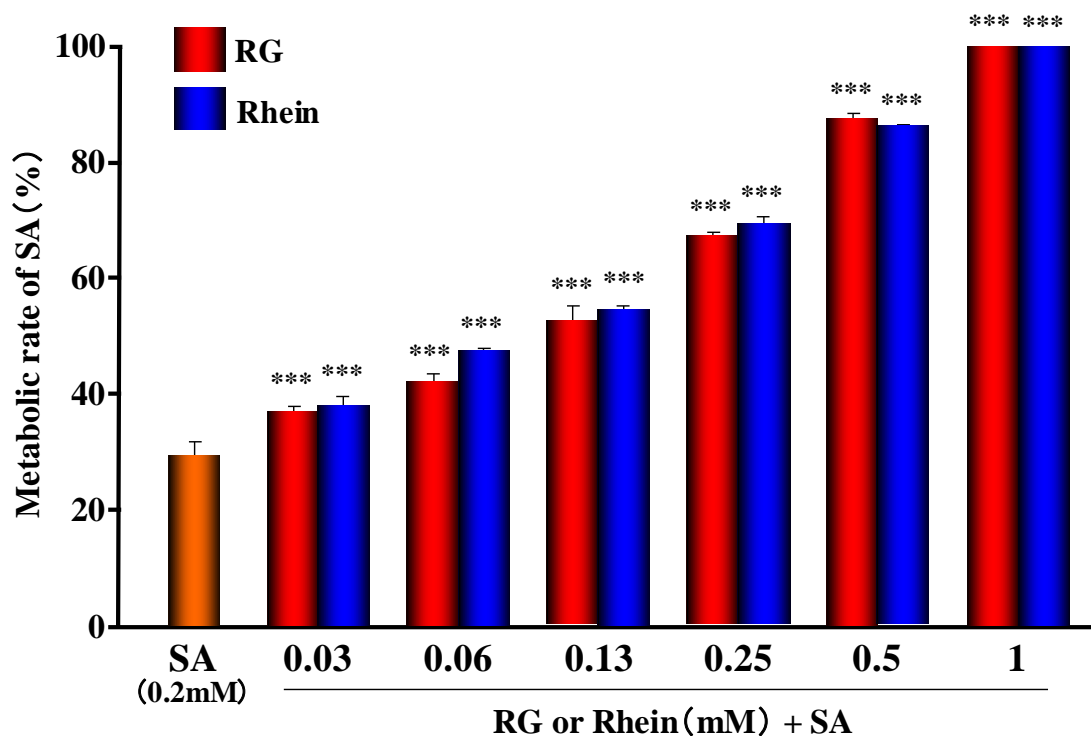


Fig. 20. Accelerating Effect of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) and Rhein on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant difference from SA (Dunnett's test).

大黃の中にはアントラキノン骨格を有する物質が多く存在し、RG やレインもその1つである。アントラキノン骨格を有する大黃成分であるエモジン、アロエーエモジンについてもセンノシド A 代謝への影響を検討したところ、エモジン、アロエーエモジン共にセンノシド A 代謝を有意に促進した (Fig. 21)。この促進作用は同じ濃度のレインと同等の促進作用を示していた。また、大黃の中にエモジン、アロエーエモジンはセンノシド A (0.2mM) に対してそれぞれ 0.03mM、0.13mM 含まれており、センノシド A 代謝促進に強く関与していると考えられる。以上の結果から、大黃のセンノシド A 代謝促進作用にアントラキノン骨格を有する成分の関与を証明した。

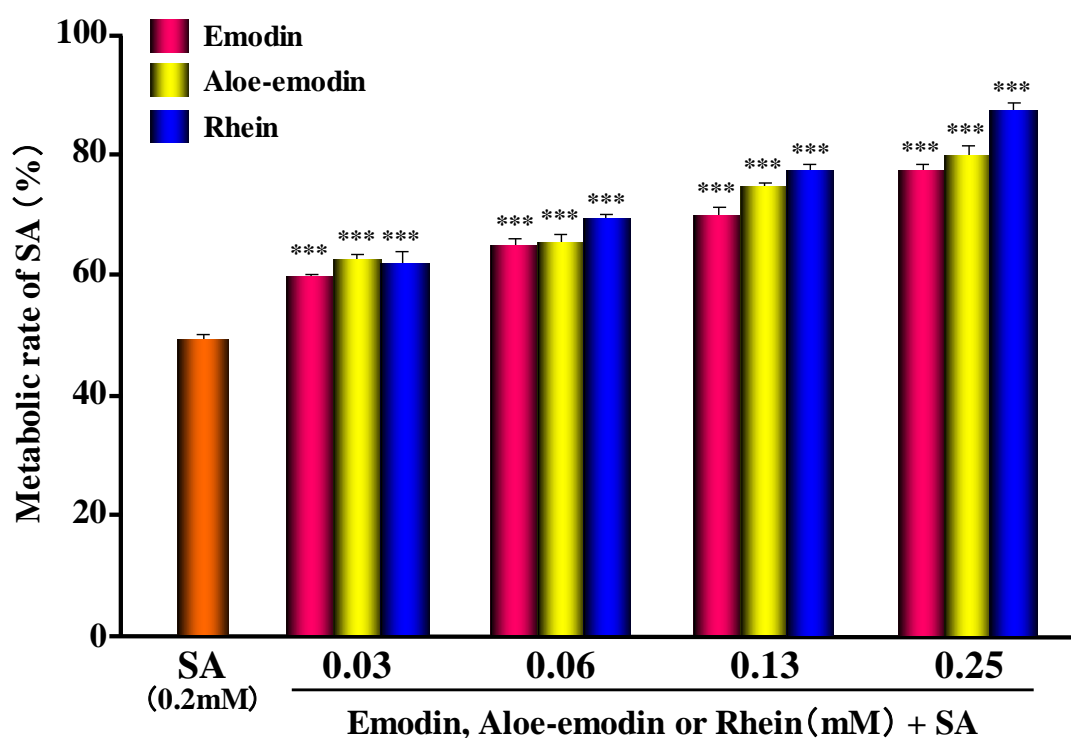


Fig. 21. Accelerating Effect of Emodin, Aloe-emodin and Rhein on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant difference from SA (Dunnett's test).

3. Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside によるセンノシド A の下剤活性変化

RG やレインもそれ自体に弱いながら下剤活性を有している。そこで、RG ならびにレインの下剤活性を 10 時間にわたり観察したところ、RG は 33.4mg/kg 以上の濃度で下痢スコアが 1.0 の下剤活性があった。この結果を踏まえて、RG が下剤活性を示さなかった 16.8mg/kg 以下の濃度に対してセンノシド A の下剤活性に対する影響を検討することとし、レインについても RG と同様に下剤活性を示さなかった 10.7mg/kg 以下の濃度で検討することとした。RG ならびにレインによるセンノシド A の下剤活性に対する影響を検討したところ、共にセンノシド A の下剤活性を有意に亢進した (Fig. 22)。これらの下剤活性はセンノシド A 単独の下剤活性と比較して大幅に下痢スコアが亢進しており、RG やレインによる相乗的なセンノシド A の下剤活性亢進作用が確認された。

以上のことから、大黄に含まれる RG やレインなどアントラキノン骨格を有する成分がセンノシド A 代謝を促進することで、センノシド A の下剤活性を亢進することを証明した。

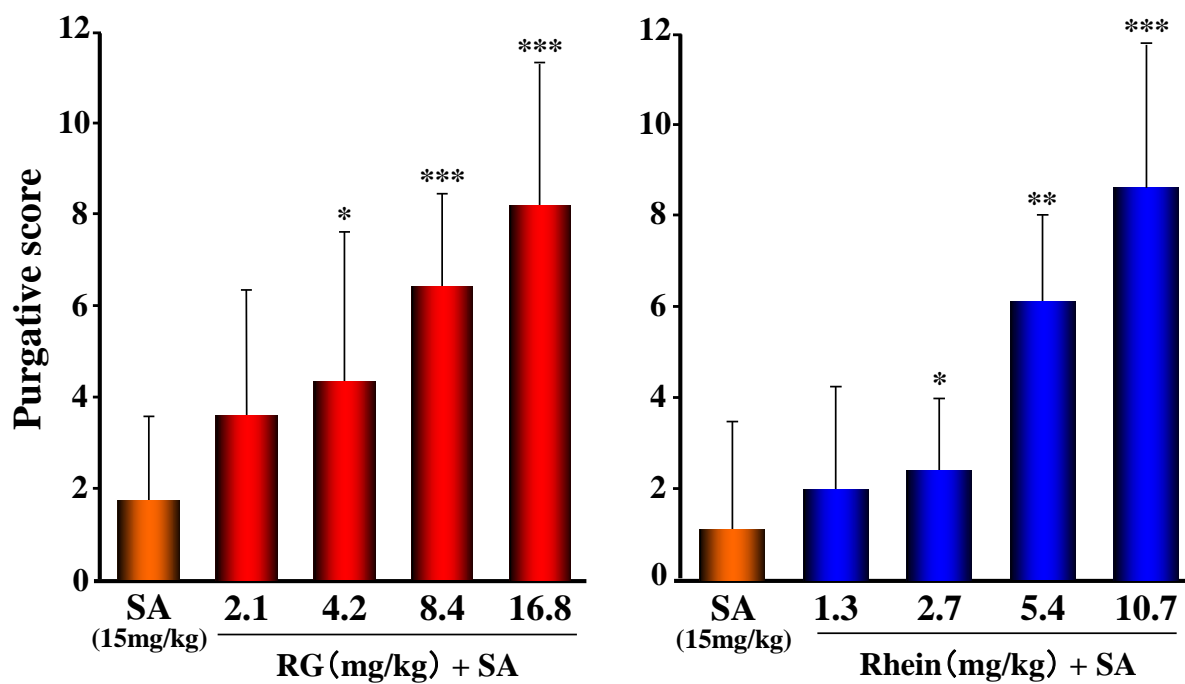


Fig. 22. Accelerating Effect of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) and Rhein on Purgative Action of SennosideA (SA)

Each column represents the mean \pm S.D. of 12 mice. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, significant difference from SA by Steel's test.

第4章 Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside およびリクイリチンによる センノシド A 代謝促進機序

大黃甘草湯の主有効成分であるセンノシド A は、*Bifidobacterium sp.* SEN が産生する β -グルコシダーゼによりセニジンに代謝され、下剤活性本体であるレインアンスロンに変換されることで下剤活性を示す [10-12]。これまでに、甘草に含まれるフラボノイド成分であるリクイリチン (LQ) やリクイリチンアピオシドならびに大黃に含まれるアントラキノン成分である rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) がセンノシド A の腸内代謝を促進することで、センノシド A の下剤活性を亢進することを明らかにした。そこで本研究では、LQ ならびに RG によるセンノシド A 代謝促進機序の解明を目的に研究を行った。

1. Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside およびリクイリチンによるセンノシド A 代謝促進機序

大黃甘草湯に含まれるアントラキノン成分およびフラボノイド成分によるセンノシド A の腸内代謝を促進する機序について検討するために、マウス糞便懸濁液を用いてセンノシド A 代謝の経時的変化を調べた (Fig. 23)。

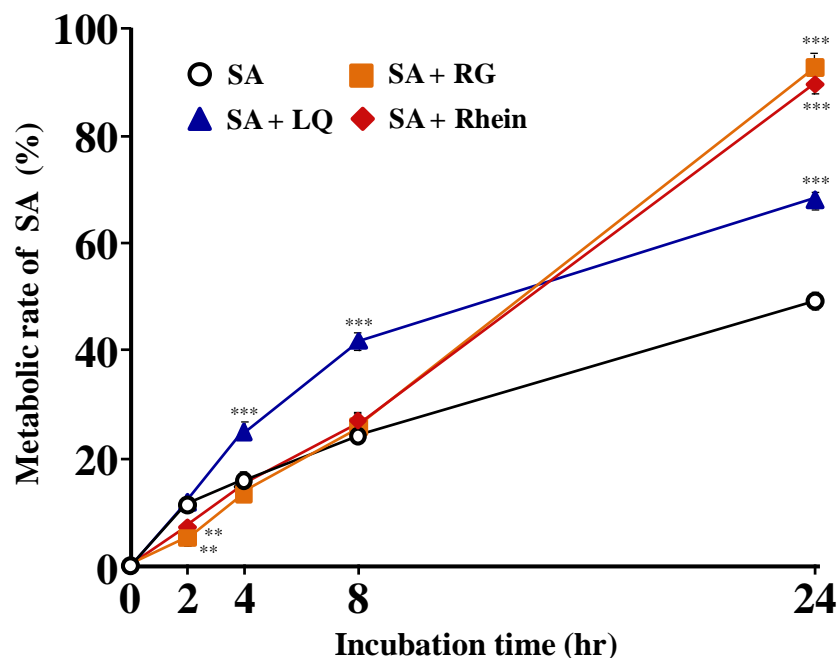


Fig. 23. Effect of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG), Rhein and Liquiritin (LQ) on Metabolism of Senoside A (SA)

Each point represents the mean \pm S.D. of 3 samples. ** p <0.01, *** p <0.001, significant difference from SA (Dunnett's test).

その結果、RG および LQ はセンノシド A 代謝を有意に促進した。しかし、センノシド A 単独の代謝変化と比較して RG ならびに LQ を添加したセンノシド A 代謝の経時的変化は異なり、LQ による代謝変化は飽和曲線を示したことから、酵素活性を高めている可能性を示唆した。一方で、RG による代謝変化は非飽和曲線を示したことから、センノシド A 代謝菌またはセンノシド A 代謝酵素を誘導することでセンノシド A 代謝を促進している可能性を示唆した。

センノシド A は主に *Bifidobacterium spp.* が産生するセンノシド A 代謝酵素により代謝され下剤活性を示す。そこで、ラックビー配合菌種 (*Bifidobacterium longum*, *B. infantis*) をチオグリコール酸培地で 24 時間培養して得られる培養液を超音波処理して、得られた菌体抽出液を用いてセンノシド A 代謝を検討した。その結果、センノシド A 単独と比較して RG および LQ を添加することで有意にセンノシド A 代謝を促進した (Fig. 24)。このことから、RG および LQ は共にビフィズス菌が産生するセンノシド A 代謝酵素の活性を高めることでセンノシド A 代謝を促進することを明らかにした。

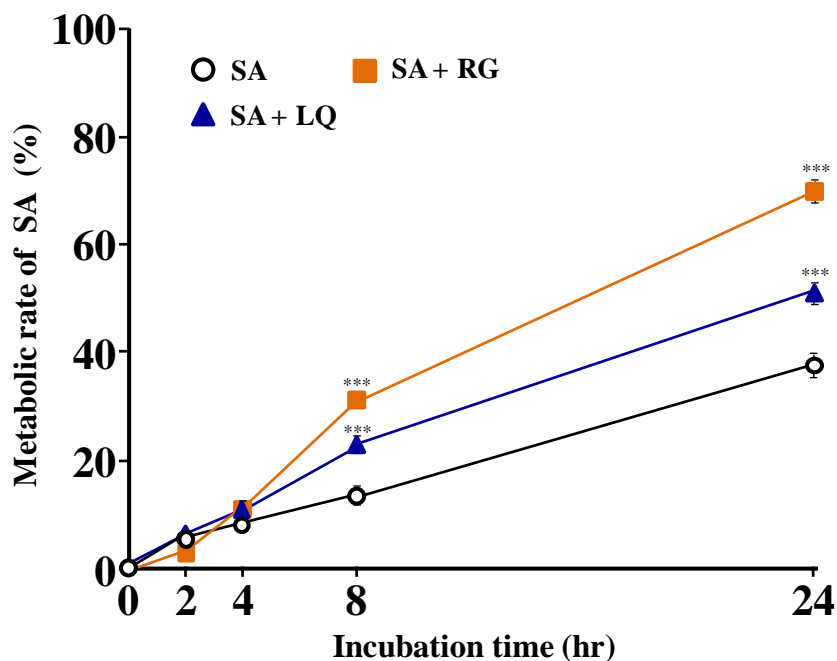


Fig. 24. Effect of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) and Liquiritin (LQ) on Sennoside A (SA) –Metabolic Enzyme of Bifidobacteria

Each point represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant difference from SA (Dunnett's test).

2. 腸内微生物叢におけるセンノシド A 代謝酵素の合成に与えるセンノシド A 代謝促進成分の影響

RG、レインならびに LQ によるセンノシド A 代謝菌または代謝酵素に対する影響を検討するため、これらの成分の溶液を糞便懸濁液に添加し 24 時間プリインキュベ

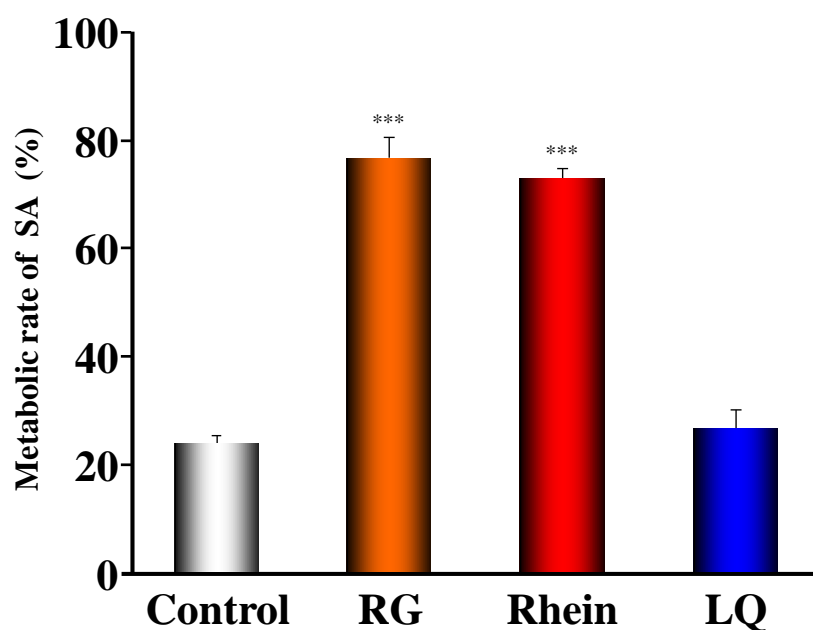


Fig. 25. Effect of Pre-incubation with Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG), Rhein and Liquiritin (LQ) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Each column represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant difference from Control (Dunnett's test).

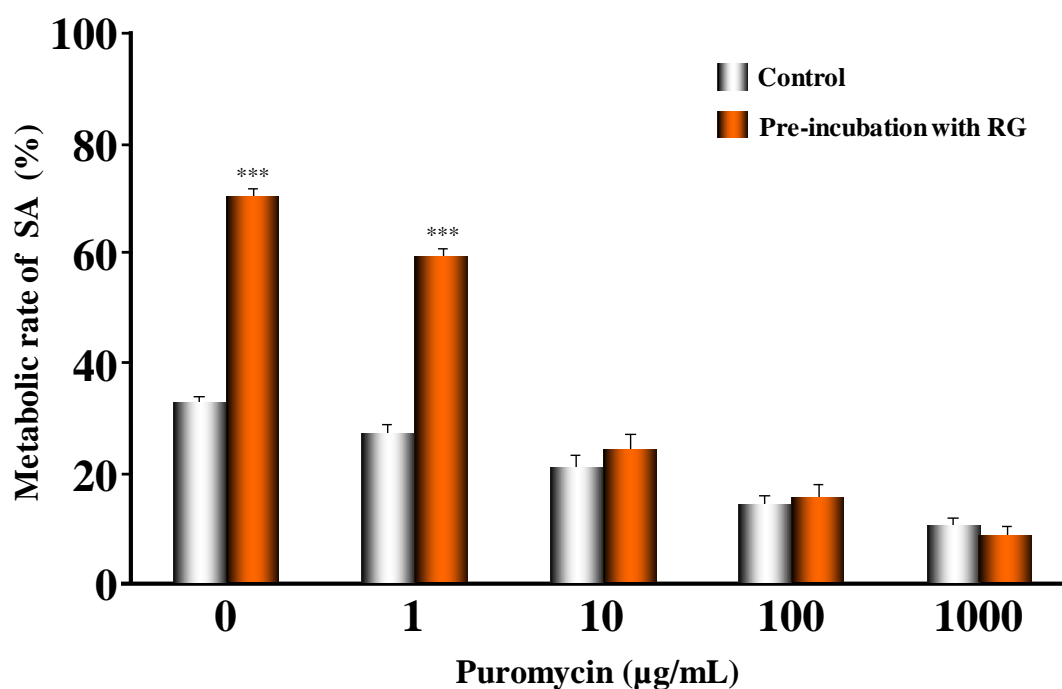


Fig. 26. Effect of Pre-incubation with Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) against Sennoside A-Metabolic Enzyme Treated with Puromycin

Each column represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** p <0.001, significant vs. control by unpaired t test.

ーションを行った。それぞれの添加培養液から陰イオン交換樹脂を用いて添加した成分を除去し、センノシド A を添加して代謝率を比較した (Fig. 25)。その結果、RG を添加してプリインキュベーションした糞便懸濁液は、コントロールと比較してセンノシド A 代謝を有意に促進した。RG のアグリコンであるレインも同様にセンノシド A 代謝を促進した。一方で、LQ はコントロールと比較して有意な変化を認めなかった。以上の結果から、RG はセンノシド A 代謝に関与する代謝菌または代謝酵素を誘導することでセンノシド A 代謝を促進することが示唆され、この作用は RG のアグリコンであるアントラキノン骨格に起因する作用であることを明らかにした。

次にセンノシド A 代謝酵素について、RG がセンノシド A 代謝酵素の誘導に影響を与えているのかを明らかにする目的で、タンパク合成阻害剤であるピューロマイシンを用いて RG の作用機序の検討を行った。その結果、RG による促進作用はピューロマイシンによって抑制されたことから (Fig. 26)、RG は腸内細菌のセンノシド A 代謝酵素の合成を誘導することでセンノシド A 代謝を促進することを明らかにした。

3. *Bifidobacterium* spp. におけるセンノシド A 代謝酵素の合成に与える rhein 8-O- β -D-glucopyranoside の影響

RG がセンノシド A 代謝菌であるビフィズス菌またはビフィズス菌が有する代謝酵素の誘導に関与するか検討を行うために、RG とラックビー配合菌種をチオグリコール酸培地で 24 時間培養して得られる培養液を用いてセンノシド A 代謝を検討した。その結果、RG はセンノシド A 代謝を有意に促進したから (Fig. 27)、RG はビフィズス菌またはビフィズス菌由来のセンノシド A 代謝酵素に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで培養液にピューロマイシンを添加して RG の作用を検討したところ、ピューロマイシンは RG によるセンノシド A 代謝促進作用を濃度依存的に抑制した (Fig. 28)。この結果から、RG はビフィズス菌由来のセンノシド A 代謝酵素を誘導することでセンノシド A 代謝を促進することを明らかにした。

以上の結果から、大黄甘草湯に含まれる RG および LQ はビフィズス菌が産生するセンノシド A 代謝酵素の活性を高めることで、センノシド A 代謝を促進することを明らかにした。また、RG はセンノシド A 代謝菌またはセンノシド A 代謝酵素の誘導に関与することが示唆されたことから、ピューロマイシンを用いてセンノシド A 代謝酵素の誘導に対する作用を検討した。その結果、ピューロマイシンは RG によるセンノシド A 代謝促進作用を濃度依存的に抑制したことから、RG はビフィズス菌由来のセンノシド A 代謝酵素の誘導に関与することを明らかにした。本研究から、RG と LQ はビフィズス菌由来のセンノシド A 代謝酵素活性を促進すること、さらに RG はセンノシド A 代謝酵素の誘導を促進することによりセンノシド A 代謝を促進することを明らかにし、複成分系薬物としての大黄甘草湯の有用性を証明した。

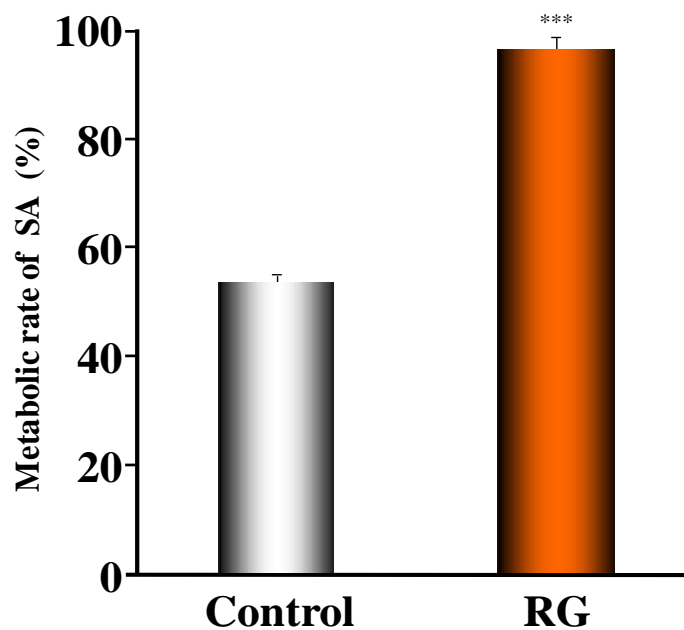


Fig. 27. Effect of Culture in Bifidobacteria with Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) on Metabolism of Sennoside A (SA)

Data are expressed as the mean \pm S.D.. *** $p < 0.001$, significant vs. control by unpaired t test (n =3).

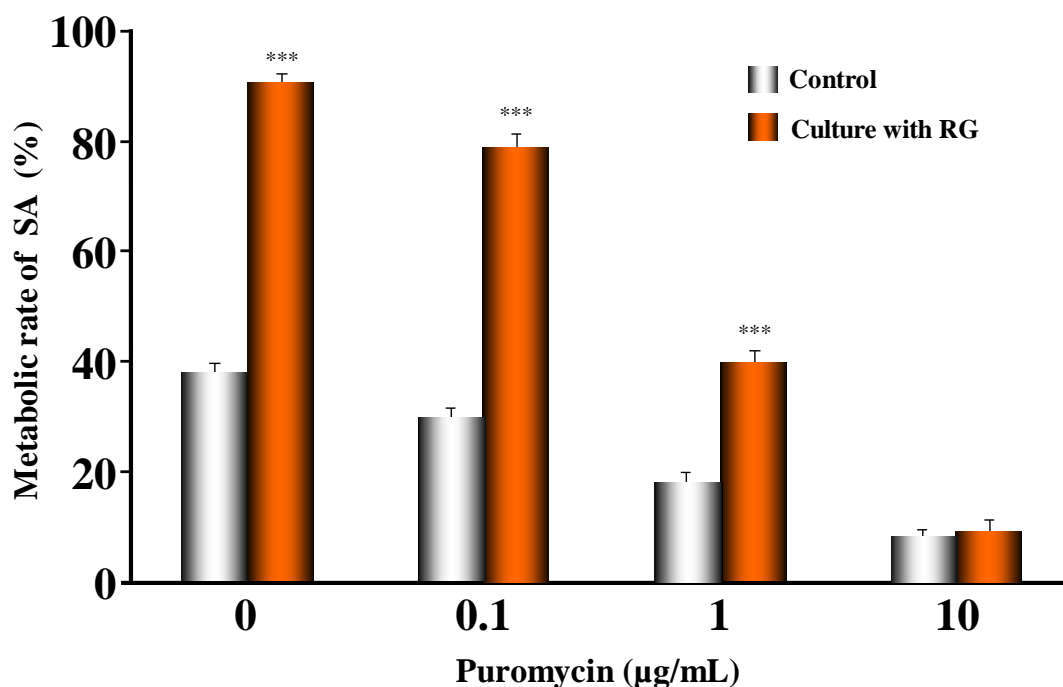


Fig. 28. Effect of Culture in Bifidobacteria with Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) against Sennoside A-Metabolic Enzyme Treated with Puromycin

Each column represents the mean \pm S.D. of 3 samples. *** $p < 0.001$, significant vs. control by unpaired t test.

小 括

第1編では、複合成分系薬物としての大黃甘草湯の有用性を解明するために、大黃甘草湯の主有効成分であるセンノシド A の腸内代謝における HPLC 定量法を確立した上で(第1章)、大黃および甘草に含まれるセンノシド A 代謝促進成分を同定し(第2、3章)、その作用機序を明らかにすることで(第4章)、腸内微生物叢における多様性や機能に与える影響について研究を行った。

本研究では、大黃に甘草を配合することでセンノシド A の下剤活性が有意に亢進したことから、マウスの糞便懸濁液を用いた腸内代謝実験法で、センノシド A 代謝における甘草成分の影響を検討した。その結果、甘草ならびに甘草の主要なフラボノイド成分であるリクイリチン (LQ) やリクイリチンアピオシド (LA) によってセンノシド A 代謝が促進することを明らかにした。さらに、下剤活性評価において、LQ や LA によってセンノシド A の下剤活性が亢進することを証明した。一方で、大黃中のセンノシド A はセンノシド A 単独よりも代謝を受け易いことから、大黃の水抽出物中のセンノシド A 代謝促進成分として rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) を単離同定した。RG の作用はアグリコンであるレインに由来し、大黃のアントラキノン成分であるエモジンやアロエエモジンも同様に代謝促進作用を示した。さらに、RG とレインが SA 代謝を促進することで、センノシド A の下剤活性を亢進することを実証した。

センノシド A 代謝における LQ や RG のセンノシド A 代謝促進作用は、*Bifidobacterium longum* および *B. infantis* が産生するセンノシド A 代謝酵素活性を高めることで、センノシド A 代謝を促進することを明らかにした。特に、RG は *B. longum* および *B. infantis* の生菌とプリインキュベーションすることでセンノシド A 代謝を促進し、この促進作用はタンパク質合成阻害剤であるピューロマイシンによって濃度依存的に抑制されことから、RG はビフィズス菌由来のセンノシド A 代謝酵素の合成を亢進することでセンノシド A 代謝を促進していることを明らかにした。

以上の結果から、大黃甘草湯の下剤活性発現メカニズムとして、センノシド A の腸内代謝を RG や LQ などが代謝促進することで、大黃甘草湯の下剤活性を亢進することを解明し、複合成分系薬物である大黃甘草湯の有用性を解明した。

現在、RG や LQ による β -グルコシダーゼの酵素活性促進作用を解明するために、*B. longum* ならびに *B. infantis* が保有する β -グルコシダーゼについて組換えタンパク質を作製し、酵素活性変化から算出された速度論的パラメータを指標に β -グルコシダーゼの酵素活性に与える影響を調べている。また、これらアントラキノン成分やフラボノイド成分について β -グルコシダーゼとのドッキングシミュレーションを行い、酵素-リガンド複合体の自由エネルギー変化を解析することで、これら促進成分の作用機構の解明を進めている。

第2編 腸内微生物叢の変動によるクロストークの変化に適応する 大黃甘草湯の有用性の解明

第1章 抗菌薬による大黃甘草湯の薬効発現に与える影響

漢方薬は2016年現在で294処方一般用漢方製剤として承認され、148処方が医療用漢方製剤として臨床現場で使用されている。しかし、漢方薬は単独で使用されることよりも、西洋薬と併用され使用されることが多く、漢方薬と西洋薬との相互作用の問題が指摘されている[30-34]。漢方薬は多くの配糖体を含んでおり、これらはβ-グルコシド結合のため消化酵素による代謝を受けずに消化管下部まで到達するが、親水性が高く消化管吸収されにくいことから腸管内に長く滞留する。そのため配糖体は、腸内微生物叢が産生する酵素によって代謝変換され、脂溶性の高いアグリコンが吸収されることで薬効発現すると考えられている。以上のことから、抗生物質などの腸内微生物叢を破綻（dysbiosis）させる薬物との併用が問題視されている[30, 31]。本研究室でも、病院および診療所の計8施設におけるセンノシド製剤ならびに大黃剤と経口抗菌薬との併用調査を実施した。その結果、センノシド製剤や大黃剤と抗菌薬の併用は日常的に行われていたが（Tab. 4）、下剤効果に対する薬物相互作用についてほとんど考慮されていなかった。そこで、腸内代謝実験法と下剤活性評価法を用いて、マウスにおける大黃甘草湯およびセンノシド A の下剤作用における8種類の抗菌薬（アンピシリン、セフカペンピボキシル、カナマイシン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ホスホマイシン、ミノサイクリン、ファロペネム）の影響を検討した。

Tab. 4. Combination Use of Kampo medicine and Antibiotics

	Peni	Ceph	Amin	Macr	Pyri	Tetr	Fosf	Pene
Sennoside-drugs	○	○	○	○	○	○	○	
Daiokanzoto		○		○	○			
Tokakujokito	○			○	○		○	
Bofutsushosan					○			
Other daio-drugs	○	○		○	○		○	

Peni: penicillins, Ceph: oral cepheims, Amin: aminoglycosides, Macr: macrolides, Pyri: pyridone carboxylic acids, Tetr: tetracyclines, Fosf: fosfomycins (other antibiotics), Pene: penems (other antibiotics).

1. 大黃甘草湯の腸内代謝に及ぼす抗菌薬の影響

抗菌薬による大黃甘草湯やセンノシド A の腸内代謝に与える影響を検討する目的で、マウスを用いた腸内代謝実験を行った。抗菌薬はヒトにおける 1 日量の 10 倍に相当する量を精製水で溶解または均一に懸濁して投与した。正常便のみを認めたマウス（体重 30g 前後）に各種抗菌薬（コントロール群は精製水）を単回経口投与し、17 時間後のマウス糞便懸濁液を用いて腸内代謝実験を行った。大黃甘草湯凍結乾燥品（20mg/mL）及びセンノシド A（0.2mM）を添加し、嫌気条件下 37°C で 4 時間インキュベートした。いずれも 4 時間インキュベートで 90% 以上代謝される濃度である。反応時間 0 分のもをブランクとし、センノシド A の代謝率（%）は（ブランク中のセンノシド A - センノシド A 残量）/ブランク × 100 で算出した。結果を Fig. 29 に示す。セフカペンピボキシルとファロペネムは大黃甘草湯及びセンノシド A のいずれにおいても代謝率を 10% 以下に抑えた。クラリスロマイシン、レボフロキサシン、ミノサイクリンの場合、コントロール群に比べて有意差があるものの、いずれも 60% 以上の代謝率が保持されており、センノシド A の代謝に対する抑制効果はあまり強くないと考えられる。アンピシリン、カナマイシン、ホスホマイシンに関してはセンノシド A 単独では代謝を顕著に抑制したが、大黃甘草湯中のセンノシド A の代謝率は 60% 以上保持され、センノシド A と大黃甘草湯に対する反応性の相違が認められた。

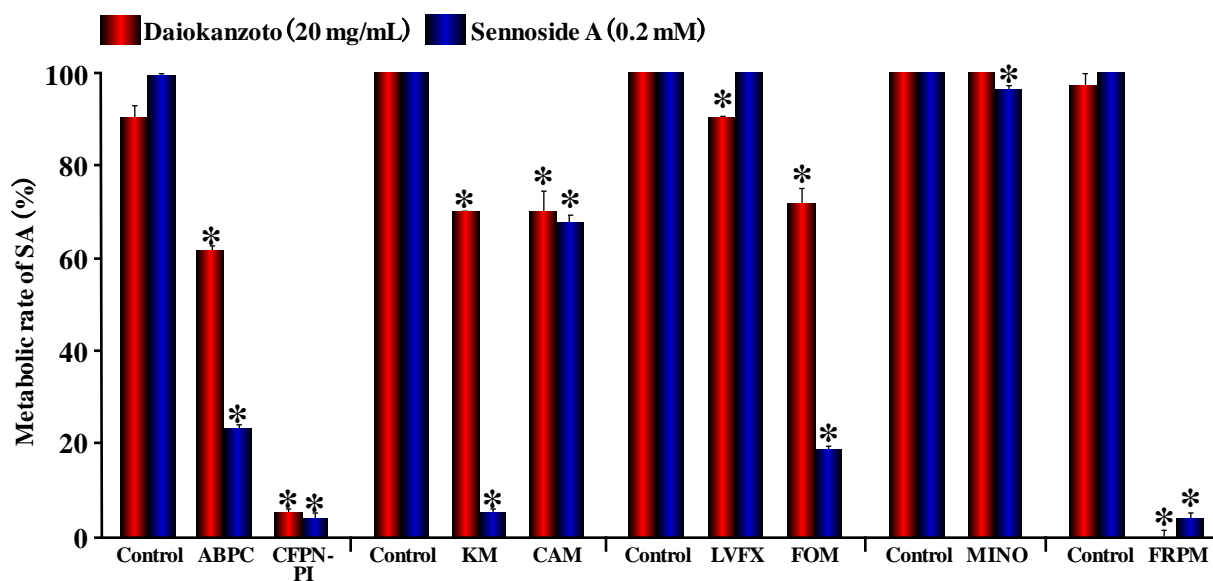


Fig. 29. Influence of Co-administered Antibiotics on Metabolism of Sennoside A

ABPC: ampicillin, CFPN-PI: cefcapene pivoxil, KM: kanamycin, CAM: clarithromycin, LVFX: levofloxacin, FOM: fosfomycin, MINO: minocycline, FRPM: faropenem.

Data are expressed as the \pm S.D.. * $p < 0.05$, significant vs. control (non-antibiotics) by Dunnett's test ($n = 3-6$)

2. 大黃甘草湯の下剤活性に及ぼす抗菌薬の影響

前述の抗菌薬を単回経口投与した 19 時間後に、同程度の下痢スコアを示す大黃甘草湯 (1.21g/kg) ならびにセンノシド A (40mg/kg) を単回経口投与した。実験中は絶食絶水とし、試料溶液投与後、下剤活性を 1 時間毎 8 時間にわたり観察し、正常便、膨潤便、軟便、泥状便、粘液便に分類し個数を記録した。便の状態をスコア化し、各個体における 8 時間の合計の平均値及び標準偏差を算出し各群の下痢スコアとした。結果を Fig. 30 に示す。アンピシリン、セフカペンピボキシル、カナマイシン、ホスホマイシン、ファロペネムは大黃甘草湯とセンノシド A のいずれにおいても有意に下痢スコアが低下しており、これらの抗菌薬は大黃甘草湯とセンノシド A の下剤活性を顕著に抑制した。一方、クラリスロマイシン、レボフロキサシンは下剤活性にほとんど影響を与えなかった。ミノサイクリンはセンノシド A 単独では顕著に下剤活性を抑制したが、大黃甘草湯では抑制を示さず、大黃甘草湯とセンノシド A に対する反応性に違いがみられた。8 種の抗菌薬のうち、消化管から吸収されにくいアンピシリン、セフカペンピボキシル、カナマイシン、ホスホマイシン、ファロペネムによって大黃甘草湯とセンノシド A の下剤活性は共に強く抑制を受けた。一方で、消化管から吸収されやすいクラリスロマイシンおよびレボフロキサシンは、両投与群の下剤活性に対してほとんど影響を及ぼさなかった。

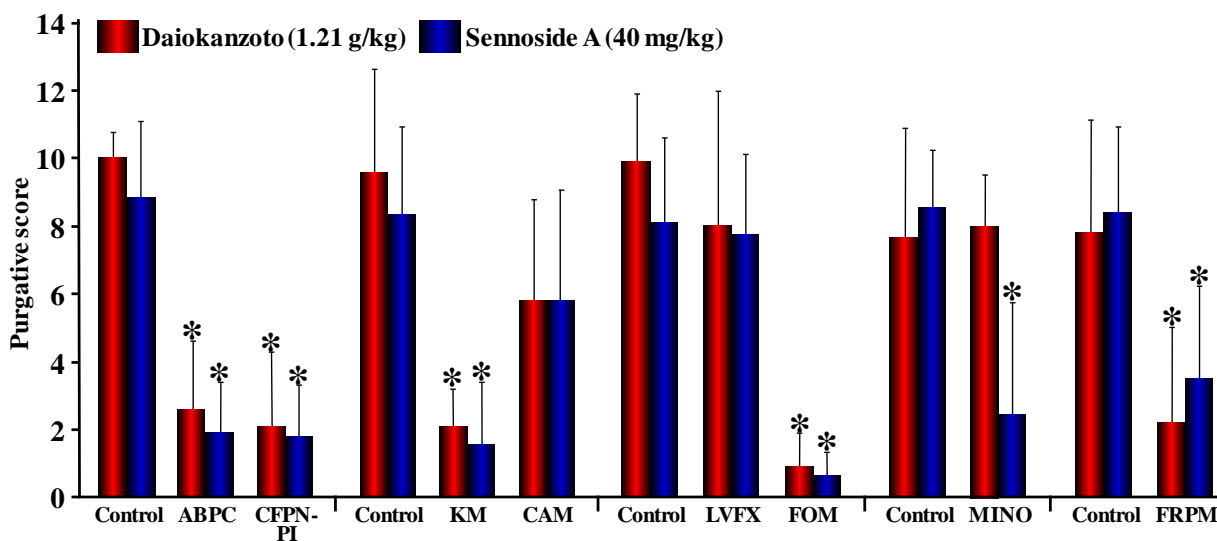


Fig. 30. Influence of Co-administered Antibiotics on Purgative Action of Daiokanzoto and Sennoside A

ABPC: ampicillin, CFPN-PI: cefcapene pivoxil, KM: kanamycin, CAM: clarithromycin, LVFX: levofloxacin, FOM: fosfomycin, MINO: minocycline, FRPM: faropenem.

Data are expressed as the \pm S.D.. * $p < 0.05$, significant vs. control (non-antibiotics) by Steel's test ($n = 6-14$).

また、ミノサイクリンはセンノシド A 単独の下剤活性を顕著に抑制したが、大黃甘草湯では抑制を示さなかった。そこで、大黃甘草湯とセンノシド A におけるミノサイクリンの反応性の違いを明らかにする目的で、ミノサイクリンによって抑制を受

けたセンノシド A の下剤活性に対する甘草及び甘草成分の影響について検討した。ミノサイクリン (1670mg/kg) をマウスに単回経口投与し、19 時間後に大黄甘草湯 (1.21g/kg)、センノシド A (40mg/kg) ならびにセンノシド A+甘草凍結乾燥品 (454mg/kg) を単回経口投与した。センノシド A (40mg/kg) と甘草凍結乾燥品 (454mg/kg) は大黄甘草湯中のセンノシド A とグリチルリチンの割合を基準に設定した。ミノサイクリン処置後の大黄甘草湯、センノシド A およびセンノシド A+甘草凍結乾燥品の下痢スコアを Fig. 31 に示す。

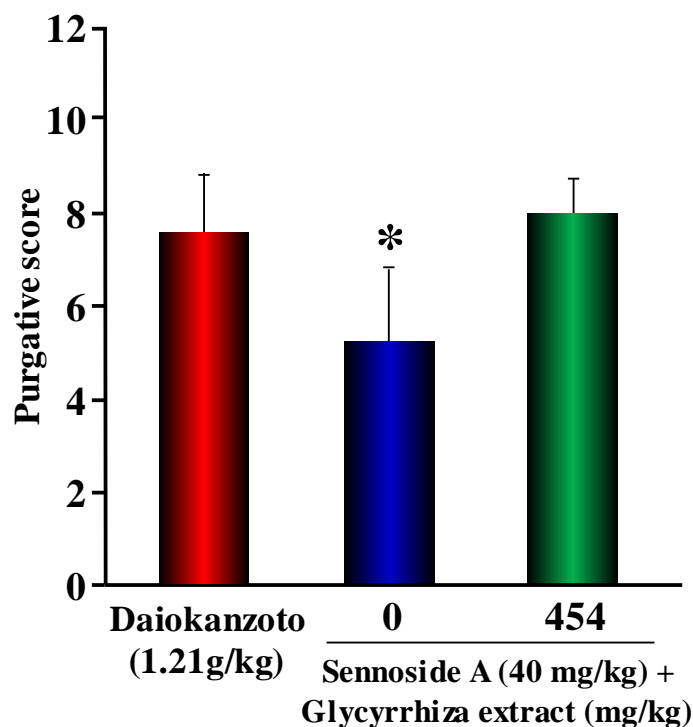


Fig. 31. Accelerating Effect of Glycyrrhiza on Purgative Action of Sennoside A Pretreated with Minocycline

Data are expressed as the \pm S.D.. * p <0.05, significant vs. Daiokanzoto by Steel's test ($n = 8$).

ミノサイクリンはセンノシド A 単独の下剤活性を有意に抑制したが、センノシド A に甘草を添加することで大黄甘草湯投与群と同等の下剤活性を示すことが確認された。そこで、この作用に関わる甘草成分を明らかにする目的で、グリチルリチンとリクイリチンについて検討した。ミノサイクリン (1670mg/kg) の投与 19 時間後、センノシド A (40mg/kg) にグリチルリチン (90mg/kg) またはリクイリチン (30mg/kg) を一緒に経口投与した。各分量とセンノシド A (40mg/kg) は大黄甘草湯中のセンノシド A との割合を基準に設定した。その結果を Fig. 32 に示す。センノシド A にグリチルリチンを加えることで、ミノサイクリンによって有意に抑制を受けたセンノシド A の下剤活性が賦活した。一方で、リクイリチン添加による影響は確認されなかった。腸内代謝実験において、グリチルリチンはセンノシド A の腸内代謝に変化を及ぼさなかったことから、ミノサイクリンによって抑制を受け

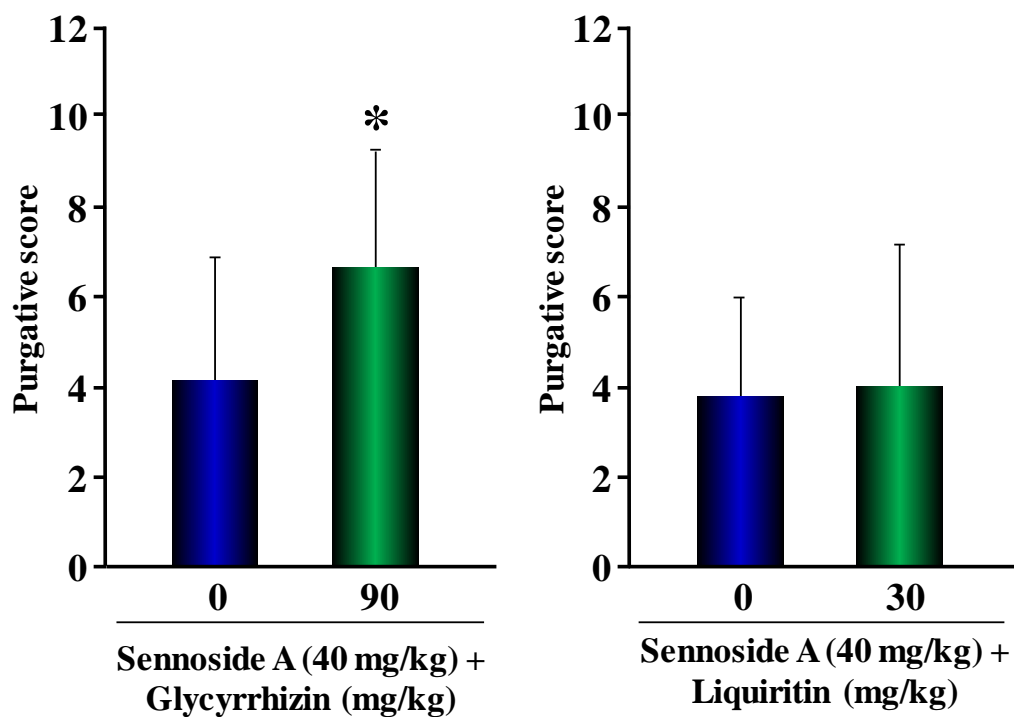


Fig. 32. Accelerating Effect of Glycyrrhizin or Liquiritin on Purgative Action of Sennoside A Pretreated with Minocycline

Data are expressed as the \pm S.D.. * $p < 0.05$, significant vs. sennoside A by Mann-Whitney's *U*-test ($n = 8$).

たセンノシド A の下剤活性を賦活する作用は、センノシド A の腸内代謝を介して発現している可能性は低いと考えられる。

第2章 アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の薬効発現に与える影響

アンピシリン継続投与下において大黄甘草湯のセンノシド A 代謝は、センノシド A 単独とは異なりセンノシド A 代謝を維持する傾向が予試験で確認された。そこで本研究では、アンピシリンをマウスに連続摂取させ、大黄甘草湯とセンノシド A の腸内代謝ならびに下剤活性に違いをもたらす大黄甘草湯成分を明らかにし、アンピシリンの投与により破綻した腸内微生物叢の変化を terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) を用いて解析した。

1. アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の腸内代謝の変化

アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯などのセンノシド A 腸内代謝変化を検討するために、マウス糞便を採取して腸内代謝実験を実施した。代謝時間を4時間に設定し、大黄甘草湯 (20mg/mL) やセンノシド A 単独 (0.2mM)、RG (1mM) および LQ (1mM) をセンノシド A に添加し、それぞれの試料についてセンノシド A 代謝変化の安定性を確認した。その後、アンピシリン (25mg/kg/day) を8日間投与して、その間のセンノシド A 代謝変化を観察した。その結果、センノシド A 単独のセンノシド A 代謝はアンピシリン投与翌日からアンピシリン無処置の群と比較して有意に抑制され続けた (Fig. 33A)。一方で、大黄甘草湯のセンノシド A 代謝はアンピシリン投与2日目までは抑制されたが、3日目以降からセンノシド A 代謝は回復し、8日目には無処置の群と比較して同等まで回復した (Fig. 33B)。このことから、大黄甘草湯にはアンピシリン投与によって変化した腸内微生物叢または腸内細菌の機能を変化させる成分の存在が考えられた。そこで、センノシド A 代謝促進作用を有する成分である LQ や RG をセンノシド A に添加して腸内代謝変動を観察した。その結果、LQ 添加群はセンノシド A 単独と同様の結果を示した (Fig. 33C)。一方で、RG 添加群のセンノシド A 代謝はアンピシリン投与2日目まで抑制されたが、3日目からセンノシド A 代謝は回復し、4日目以降から無処置群と差は認められなくなった (Fig. 33D)。このことから、大黄甘草湯に含まれる RG がアンピシリンによって変化した腸内微生物叢またはその機能に変化をもたらすことでセンノシド A 代謝を維持することを明らかにした。

2. アンピシリン継続投与における大黄甘草湯の下剤活性の変化

アンピシリン投与8日目にマウスが正常便を排泄していることを確認した上で、同程度の下剤活性を示す大黄甘草湯 (1.21g/kg)、センノシド A (40mg/kg) そしてセンノシド A+RG (22.3mg/kg) を単回経口投与した。ただし、RG は大黄甘草湯に含まれる同量に設定するとそれ単独で弱い下剤活性を有するため、下剤活性を全く示さない RG 濃度を予試験で確認した上で、上記の RG 投与濃度を決定し、センノシド A

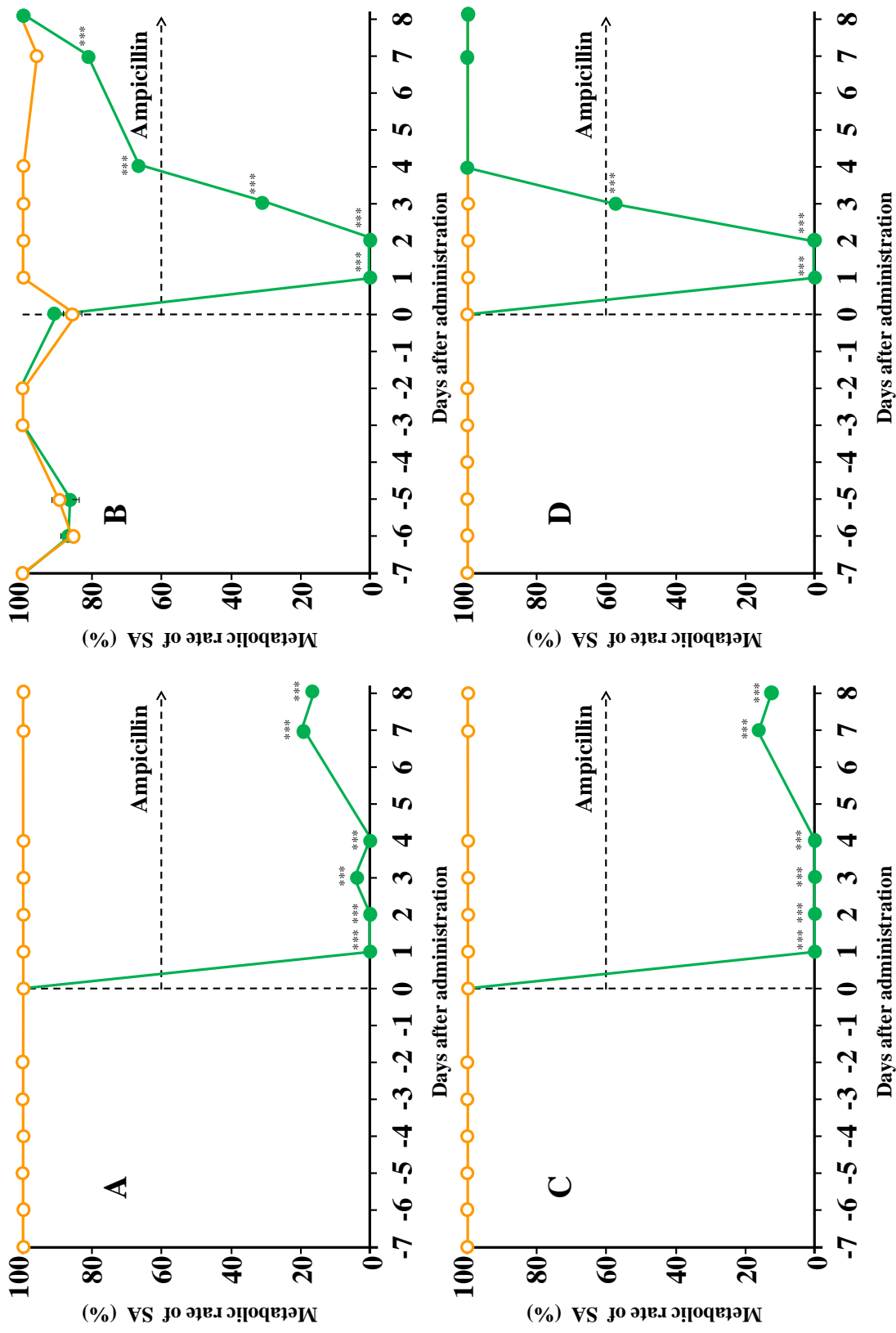


Fig. 33. The Activating Effect of Rhein 8-O-β-D-Glucopyranoside (RG) on the Metabolism of Sennoside A Is Inhibited by Ampicillin

(A) Sennoside A; (B) Daioikan zoto; (C) Sennoside A + Liquiritin; (D) Sennoside A + Rhein 8-O-β-D-Glucopyranoside. Each point represents the mean ± S.D. of 3 samples with (●) or without (○) ampicillin. Statistical significance (***) was examined by Student's *t*-test.

と同時経口投与した。アンピシリンで処置したマウスは無処置のコントロールと比較して、いずれの投与群もセンノシド A 下剤活性が有意に抑制した (Fig. 34)。しかし、アンピシリン処置したセンノシド A 投与群と比較して、大黃甘草湯ならびに RG 投与群は有意な下剤活性の亢進作用を示した。以上の結果から、アンピシリン投与下における大黃甘草湯の下剤活性の維持に RG が関与していることを明らかにした。

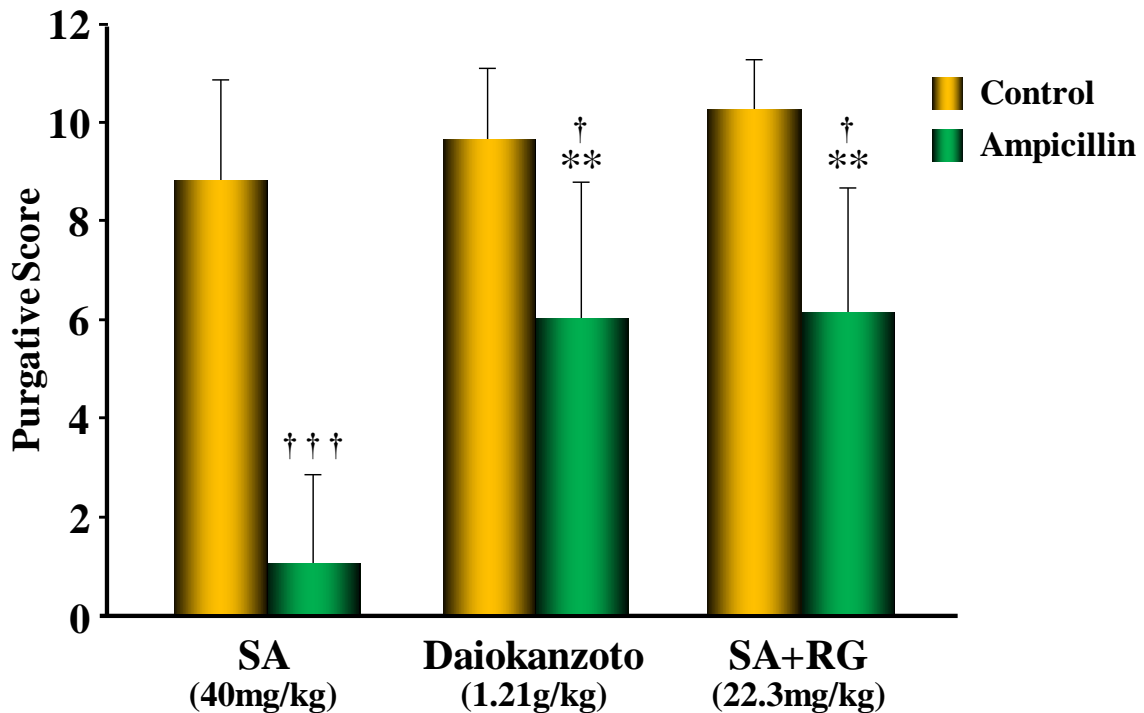


Fig. 34. The Activating Effect of Rhein 8-*O*- β -D-Glucopyranoside (RG) on the Purgative Activity of Sennoside A Is Inhibited by Ampicillin

Each column represents the mean \pm S.D. of 7 mice. † p <0.05, ††† p <0.001, significant vs. the control by Mann-Whitney's U test. ** p <0.01, significant difference from sennoside A (SA) pre-administrated with ampicillin by Steel's test.

3. T-RFLP を用いたアンピシリン投与前後の腸内微生物叢の解析

アンピシリン投与下において、RG がセンノシド A の腸内代謝を促進することで下剤活性を維持したことから、この作用機序を明らかにするため、T-RFLP を用いてアンピシリン投与前後の腸内微生物叢の変化を観察した。既に報告されている長島法 [46, 47] を用いて同定されている菌種について変化を観察した結果 (Fig. 35)、アンピシリン投与前においてビフィズス菌は 20%前後存在していたが、アンピシリン投与によって全く検出されなくなった。一方で、バクテロイデスはアンピシリン投与1日後では全く検出されなくなったが、3日目以降から投与前と比較して有意に増加した。その他の菌種についてはアンピシリン投与によって有意な変化は認められなかった。以上の結果から、RG が唯一有意に増加したバクテロイデスの機能を変化させセ

ンノシド A 代謝能を有することで、大黃甘草湯の下剤活性が維持されている可能性が強く示唆された。

アンピシリン投与下においてセンノシド A 代謝は抑制され続けたが、大黃甘草湯のセンノシド A 代謝は回復した。この実験と並行して T-RFLP で腸内微生物叢の変化を観察すると、アンピシリン投与直後からビフィズス菌は全く検出されなかった。しかし、大黃甘草湯や RG 添加群のセンノシド A 代謝の回復に伴ってバクテロイデスは有意に増加した。バクテロイデスは抗生物質、特にペニシリン系抗生物質に対して、 β -ラクタマーゼを産生することにより自然耐性を獲得しており、アンピシリンなどの β -ラクタム系の使用によりバクテロイデスの割合が増加することが複数の研究で明らかにされている [47-49]。本研究で確認されたアンピシリンの連続投与によるバクテロイデスの増加は、これらの報告と同様の傾向を示した。アンピシリン投与 8 日目に実施した下剤活性試験の結果から、アンピシリン投与によってセンノシド A の下剤活性は抑制されたが、大黃甘草湯の下剤活性は亢進し、この作用に RG が関与することを明らかにした。以上の結果から、大黃甘草湯に含まれる RG がビフィズス菌だけではなく、バクテロイデスにも作用してセンノシド A 代謝能を有することで、センノシド A 下剤活性を亢進したと推察される。

本研究から、便秘症の患者が抗生物質、特にペニシリン系抗生物質を処方された時には、プルゼニドなどセンノシド製剤ではなく、大黃甘草湯を積極的に選択することが望ましいと考える。本研究において、西洋薬にはない大黃甘草湯の複合成分系薬物としての特徴が明らかになった。

現在、バクテロイデスの β -グルコシダーゼ遺伝子をクローニングし、酵素タンパク質を発現させ、センノシド A 代謝に対する RG の詳細な作用メカニズムの解明を進めている。

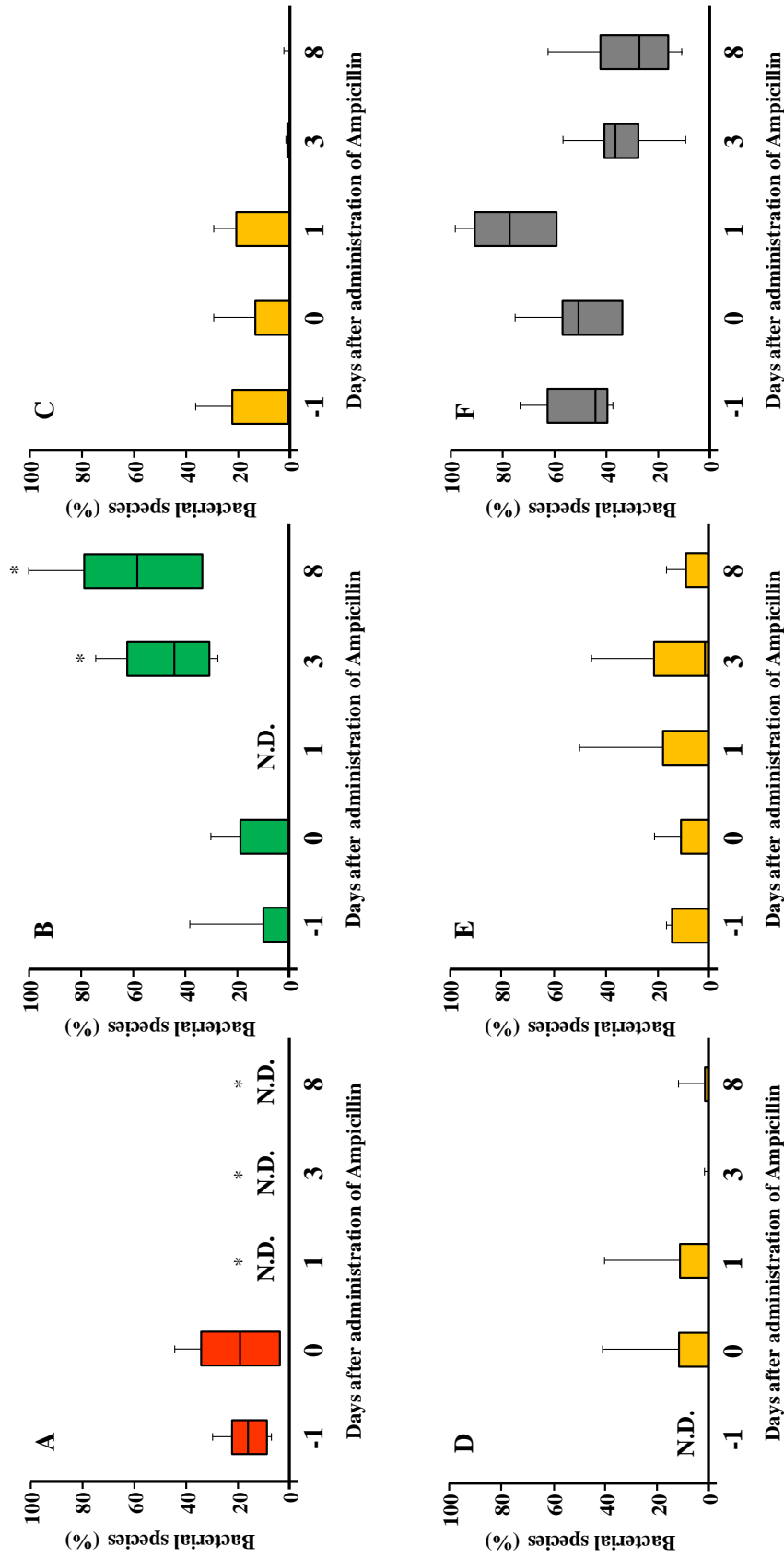


Fig. 35. Analysis of Intestinal Microbiota Treated with Ampicillin

The letters correspond to the following phylogenetic bacterial groups: (A) *Bifidobacterium*; (B) *Bacteroides*; (C) *Clostridium* cluster IV; (D) *Clostridium* cluster IX; (E) *Clostridium* subcluster XIVa; (F) Others. Statistical significance ($*p < 0.05$) were examined by Steel-Dwass test ($n = 10$).

第3章 食餌による大黄甘草湯の薬効発現に与える影響

腸内微生物叢は食餌などの外的因子により影響を受けることが複数報告されているが [50-53]、腸内代謝により薬効を発現すると考えられている漢方薬への影響はこれまで明らかになっていない。そこで、Fig. 36 に示す実験計画に基づいて、高炭水化物飼料 (Tab. 5) をコントロール飼料として1週間与えた後、高脂肪および高繊維飼料をそれぞれ2週間与え、その間の大黄甘草湯やセンノシド A の腸内代謝変化を検討した。その後、これらのマウスを3群に分け、コントロール、高脂肪、高繊維飼料を5日間与え、下剤活性評価を行った。さらに、大黄甘草湯に含まれる rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) やリクイリチン (LQ) などのセンノシド A 代謝促進成分の作用発現の変化についても検討した。

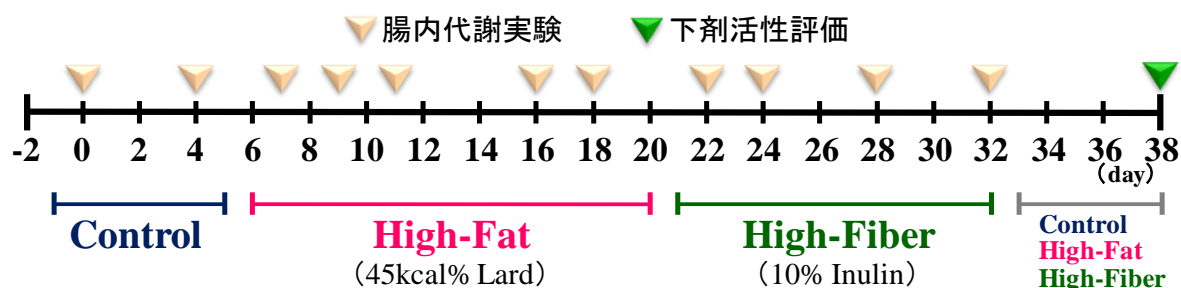


Fig. 36. Experimental Design

Tab. 5. Composition of the Diets

Product	High-Carbohydrate (Control, D12450H)		High-Fat (D12451)		High-Fiber (D14053101)	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Carbohydrate						
Corn Starch	452.2	1809	72.8	291	452.2	1809
Maltodextrin 10	75	300	100	400	75	300
Sucrose	172.8	691	172.8	691	172.8	691
Protein						
Casein	200	800	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12	3	12
Fat						
Soybean Oil	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	177.5	1598	20	180
Fiber						
Cellulose, BW200	50	0	50	0	50	0
Inulin	0	0	0	0	117	117

※ All diets were purchased from Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ, USA).

1. 食餌による大黃甘草湯の腸内代謝に与える影響

コントロール飼料として高炭水化物飼料を1週間摂取させた後、高脂肪飼料および高繊維飼料を2週間ずつ摂取させ、その間のマウス糞便を採取して腸内代謝実験を行った。腸内代謝実験は、大黃甘草湯(20mg/mL)や同量のセンノシドA単独(0.2mM)、RG(1mM)およびLQ(1mM)をセンノシドAに添加し、それぞれの試料について24時間後のセンノシドA代謝変化を観察した。その結果をFig. 37に示す。高脂肪飼料摂取によるセンノシドA代謝に対する影響は認められなかったが、いずれの添加群もセンノシドA単独より有意に高いセンノシドA代謝率を示した。特にRG添加群のセンノシドA代謝は非常に高い代謝活性を維持し、24時間代謝では100%代謝された(4時間代謝でも比較検討)。また、高繊維飼料摂取によって、センノシドA単独ならびにLQ添加群のセンノシドA代謝は有意に促進したが、大黃甘草湯添加群はRG添加群と同様にセンノシドA代謝の有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、センノシドA代謝は食餌によって大きく影響を受けることが判明した。しかし、大黃甘草湯のセンノシドA代謝能は食餌の影響を受けにくく、この現象にRGが関与していることが示唆された。

2. 食餌による大黃甘草湯の下剤活性に与える影響

高炭水化物、高脂肪および高繊維飼料をそれぞれ5日間摂取させて、1群5匹として大黃甘草湯(1.21g/kg)、センノシドA単独(20mg/kg)、RG(22.3mg/kg)およびLQ(53.3mg/kg)をセンノシドAに添加した、それぞれの試料について単回経口投与して10時間にわたり下剤活性評価を行った。その結果をFig. 38に示す。センノシドA単独ならびにLQ投与群の下剤活性は、高繊維飼料摂取により高炭水化物および高脂肪飼料摂取時と比較して有意に下剤活性を亢進し、腸内代謝実験と同様の傾向を示した。高繊維飼料に含まれている水溶性食物繊維のイヌリンはプレバイオティクスとしても知られており[54-56]、高繊維飼料摂取によりビフィズス菌などのセンノシドA代謝菌の増加が下剤活性の亢進に関与している可能性が示唆された。

一方で、RG投与群はいずれの飼料摂取においても有意な変化は認められず、大黃甘草湯投与群においては高脂肪飼料摂取と比較して高繊維飼料摂取により下剤活性が有意に抑制された。この現象はLQやRG以外の成分による影響が考えられる。高繊維飼料に含まれるイヌリンは腸内環境の改善作用に加え、腸管内水分量の増加を促すことにより便秘を改善する効果が認められている[54-56]。今回、高繊維飼料摂取時においてセンノシドA単独と大黃甘草湯の下剤活性に相反した結果が認められたことは、大黃甘草湯が腸内環境に応じて過度な薬効の発現を抑えていると仮定すると、漢方医学的な見地から大変興味深い。

腸内微生物叢は食餌や抗生物質、ストレスなどの外的因子により変動を受けることが明らかとなっている。特に食餌による腸内微生物叢の変動に関する研究は近年盛んに行なわれており、動物性または植物性の食餌を摂取することで1日で腸内微生物叢

が変化するという報告もなされている [50]。しかし、腸内代謝により薬効を発現すると考えられている漢方薬などへの影響はこれまでに解明されておらず、本研究において初めてセンノシド A の薬効発現に食餌が強く影響を及ぼすことを明らかにした。

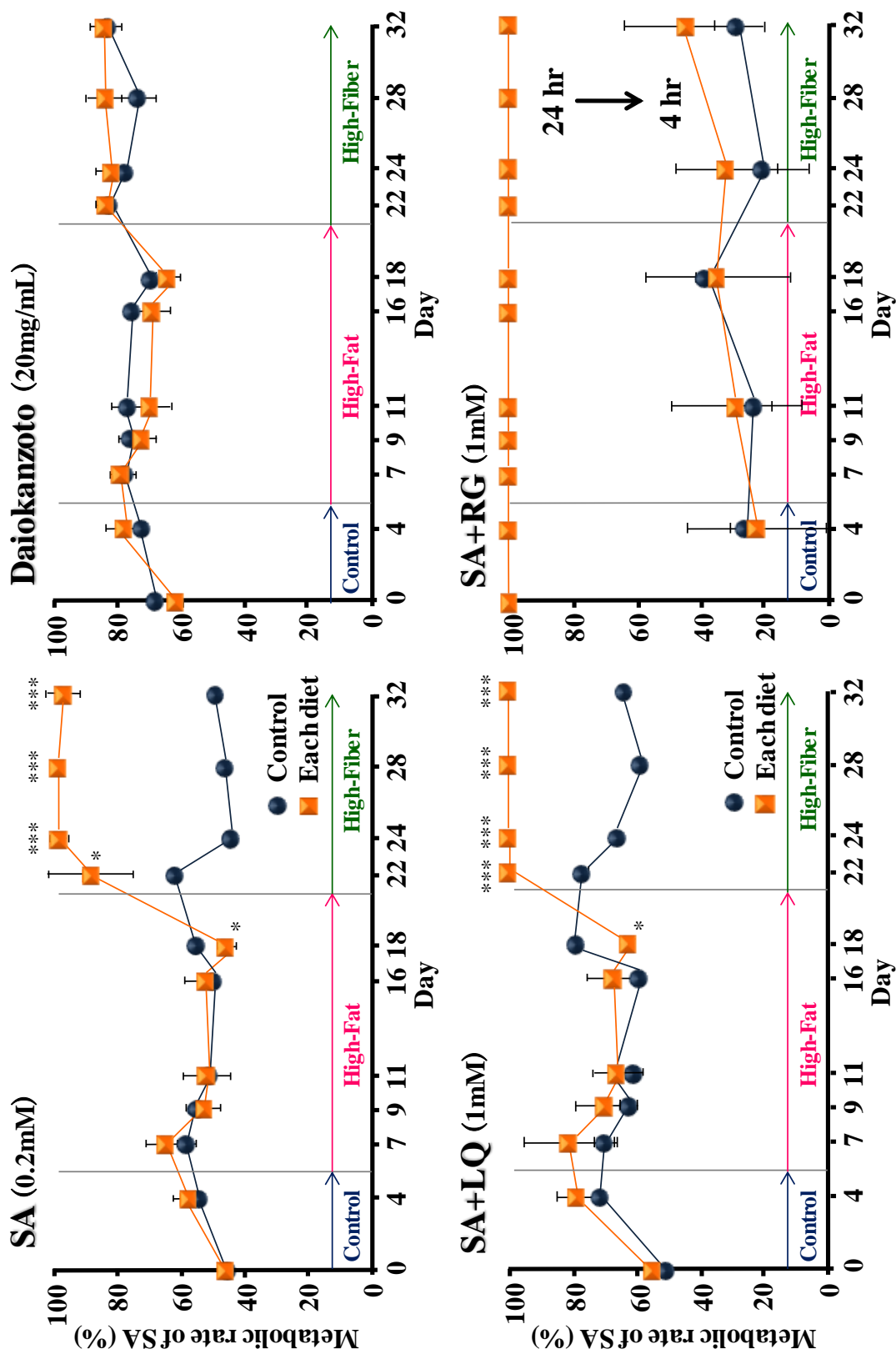


Fig. 37. Influence of Diets on Metabolic Activity of SennosideA (SA)

Each point represents the mean \pm S.D. of 3 samples. Statistical significance (* p <0.05, *** p <0.001) was examined by Student's t -test.

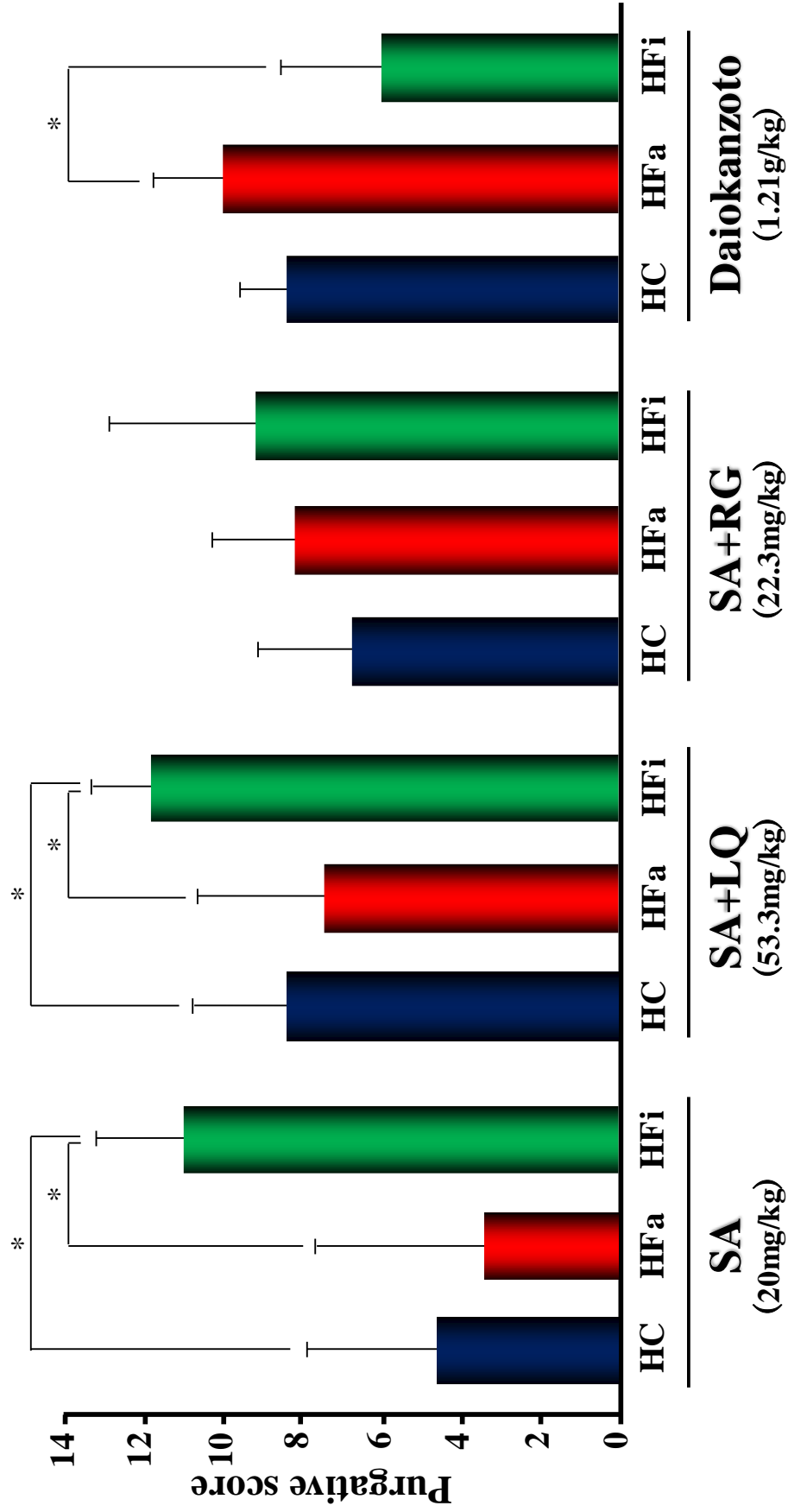


Fig. 38. Influence of Diets on Purgative Action of SennosideA (SA)

HC : High-Carbohydrate Diet, HFa : High-Fat Diet, HF1 : High- Fiber Diet. Each column represents the mean \pm S.D. of 5 mice. Post hoc multiple comparisons were made by using Steel-Dwass test between the same drug treatment (* $p < 0.05$).

第4章 大黃甘草湯の連日投与による下剤活性変化と腸内微生物叢の変動

センノシド類などアントラキノン系の緩下薬は大腸刺激性下剤に分類され、便秘症の治療に頓服として頻用されている。アントラキノン系緩下薬は長期服用により習慣性が生じやすく、欧米においてアントラキノン系緩下薬の使用期限は1~2週間以内とされ、それ以上に常習的に使用している場合は下剤乱用とされている [57]。また、アントラキノン系緩下薬の長期服用により色素沈着による腸管病変（大腸メラノーシス）が下剤耐性の一因と言われている [58-61]。アントラキノン系緩下薬の中でも、センナおよびセンナを含有する複合薬は大黄よりも大腸メラノーシスが重症化しやすいとの臨床報告もなされている [61] が、詳細は明らかになっていない。そこで、各種飼料 (Tab. 6) を1週間摂取させたマウスに、以下に示す実験計画 (Fig. 39) に基づいて、5日間にわたり大黃甘草湯やセンノシド A 単独を経口投与して下剤活性変化を検討した。また、rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) やリクイリチン (LQ) など大黃甘草湯に含まれるセンノシド A 代謝促進成分の影響についても検討した。それと同時に、T-RFLP を用いて腸内微生物叢の変動を調査し、連日投与による下剤活性の変化と腸内微生物叢の変動との関連性を解析した。

Tab. 6. Composition of the Diets

Product	High-Carbohydrate (D12450H)		High-Protein (D15122105)		High-Fat (D12451)		High-Fiber (D14053101)	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Carbohydrate								
Corn Starch	452.2	1809	150.2	600.8	72.8	291	452.2	1809
Maltodextrin 10	75	300	75	300	100	400	75	300
Sucrose	172.8	691	172.8	691.2	172.8	691	172.8	691
Protein								
Casein	200	800	200	800	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12	3	12	3	12
Egg White	0	0	302	1208	0	0	0	0
Fat								
Soybean Oil	25	225	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	20	180	177.5	1598	20	180
Fiber								
Cellulose, BW200	50	0	50	0	50	0	50	0
Inulin	0	0	0	0	0	0	117	117

※ All diets were purchased from Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ, USA).

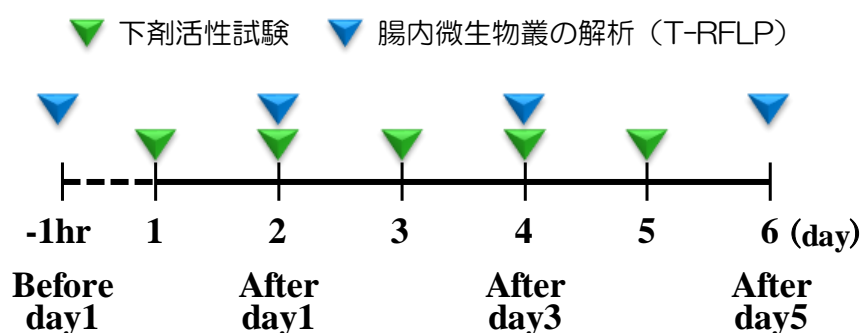


Fig. 39. Experimental Design

1. 大黄甘草湯の連日投与による下剤活性変化

高炭水化物、高脂肪、高タンパク質、高繊維飼料をそれぞれ1週間摂取させたマウスに、1群7匹として大黄甘草湯 (1.21g/kg)、センノシド A 単独 (20mg/kg)、RG (22.3mg/kg) および LQ (53.3mg/kg) をセンノシド A に添加した、それぞれの試料を5日間経口投与して下剤活性の変化を観察した。高炭水化物飼料摂取下において (Fig. 40)、センノシド A 単独ならびに LQ 併用群の下剤活性は投与2または3日目から有意に抑制した。一方で、大黄甘草湯ならびに RG 併用群には有意な変化を認めず、大黄甘草湯の下剤活性の維持に RG が深く関与していると考えられる。高脂肪飼料摂取下における下剤活性の変化は、高炭水化物飼料摂取下と同様の傾向を示した (Fig. 41)。高タンパク質飼料摂取下においては、いずれの群も下剤活性に有意な変化を認めなかった (Fig. 42)。高繊維飼料摂取下では、大黄甘草湯の下剤活性は投与2、3日目に有意な抑制を受け、投与5日目には1日目と同等までに下剤活性が回復した (Fig. 43)。

2. 大黄甘草湯の連日投与による腸内微生物叢の変動

上記の連日投与による下剤活性変化と並行して、長島らが報告している T-RFLP の方法 [45, 46] を用いて、2または4日目の試料投与前 (After days 1, 3) ならびに6日目 (After day 5) における腸内微生物叢の変動を検討した。その結果、いずれの投与においても投与翌日 (After day 1) から腸内微生物叢は大きく変化していることが明らかとなった。この変化は、下剤効果により多くの腸内細菌が便と共に排泄された上に、食餌内容の偏りによって、腸内微生物叢の乱れ (dysbiosis) が生じたためだと推測される。特に高炭水化物および高脂肪飼料摂取下において、いずれも連日投与によりバクテロイデスの存在割合が増加する傾向を認めた (Figs. 44, 45)。RG はバクテロイデスの機能を変化させることでセンノシド A 代謝能を与える可能性があることから (第2編第2章)、高炭水化物および高脂肪飼料摂取下で認められた大黄甘草湯の下剤活性を維持する作用 (Figs. 40, 41) は、RG によるバクテロイデスを介し

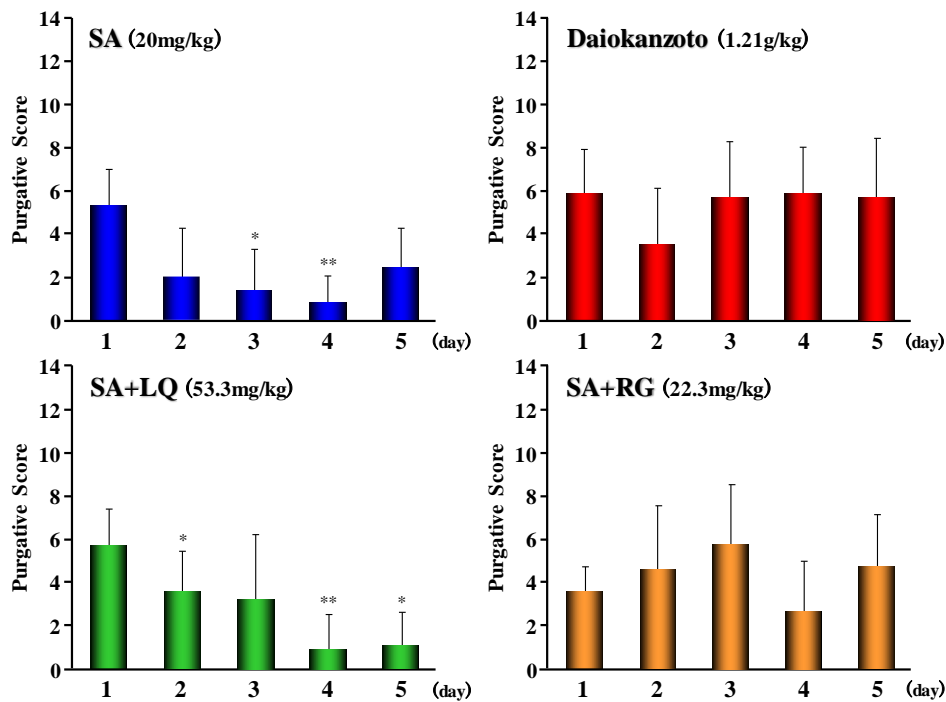


Fig. 40. Influence on the Purgative Activity Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Carbohydrate Diet

Each point represents the mean \pm S.D. of 7 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from day 1 by Steel's test.

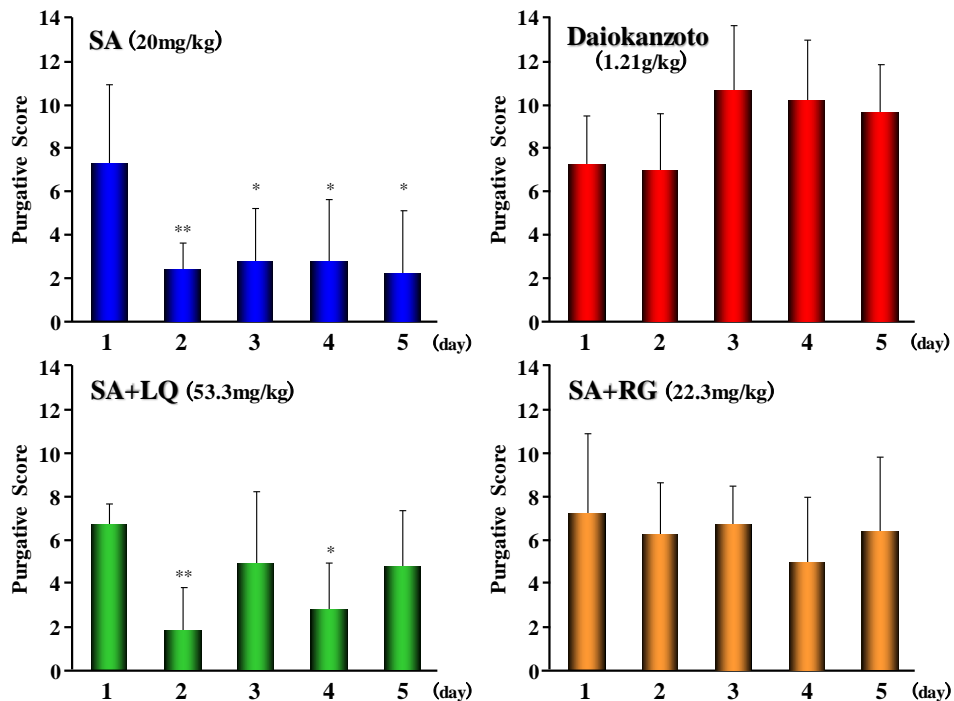


Fig. 41. Influence on the Purgative Activity Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Fat Diet

Each point represents the mean \pm S.D. of 7 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from day 1 by Steel's test.

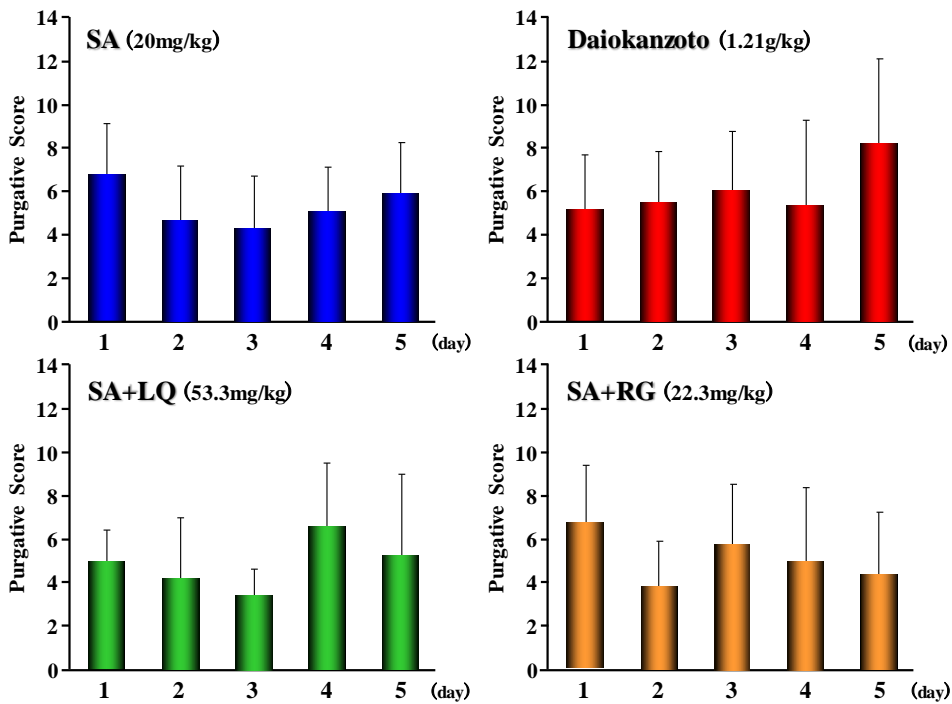


Fig. 42. Influence on the Purgative Activity Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Protein Diet

Each point represents the mean \pm S.D. of 7 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from day 1 by Steel's test.

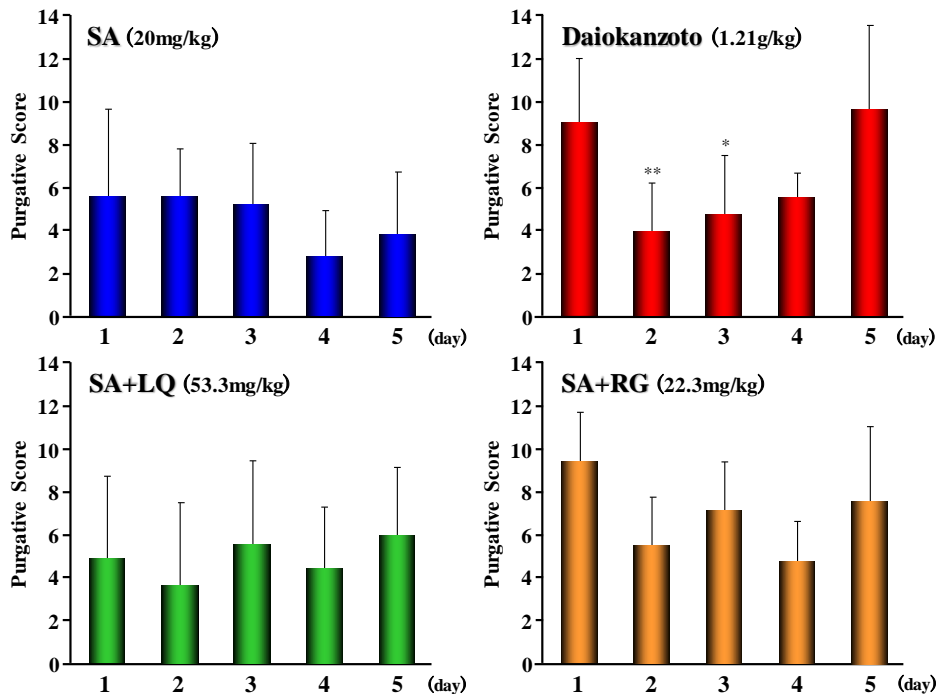


Fig. 43. Influence on the Purgative Activity Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Fiber Diet

Each point represents the mean \pm S.D. of 7 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from day 1 by Steel's test.

た作用であることが示唆される。大黃甘草湯投与後の腸内微生物叢の変化は、センノシド A 投与後の変化と比較して菌叢の変化が著しく、この変化は飼料によっても大きく異なった。高繊維飼料摂取下における大黃甘草湯の下剤活性は投与 2、3 日目に有意な抑制を受けた (Fig. 43)。この時点 (After day1 : Fig. 47) の腸内微生物叢を確認すると、*Clostridium* subcluster XIVa の存在割合が比較的増加している傾向が認められた。*Clostridium* subcluster XIVa に分類される腸内細菌は、酪酸などの短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌が多くを占めている [62]。*Clostridium* により産生された酪酸は、体内に取り込まれナイーブ T 細胞に作用して制御性 T 細胞の分化誘導を促進することにより、腸管における炎症を抑えることが解明されている [63]。このことから、*Clostridium* subcluster XIVa の存在割合が増加することで腸管の炎症は起きにくい状態に保たれているため、センノシド A 代謝によって生じたレインアンスロンによるプロスタグランジン E₂ を介した下剤活性発現が抑制されているのではないかと推測される。

センノシド製剤をはじめとするアントラキノン系下剤は、長期服用により薬剤耐性を生じることで下剤効果が減弱することが知られている。本研究により、腸内微生物叢の変動が起因する下剤耐性に対して、大黃甘草湯は腸内微生物叢の多様性やその機能に変化を及ぼすことで薬効発現を維持していると考えられる。

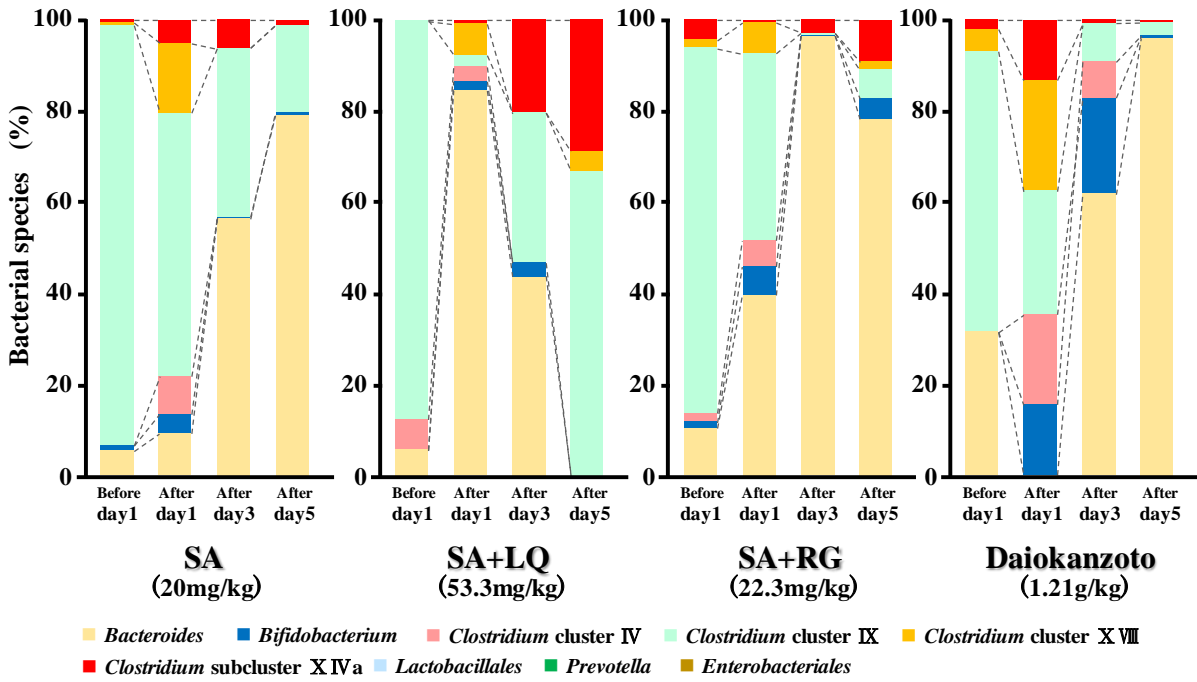


Fig. 44. Influence on the Intestinal Microbiota Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Carbohydrate Diet

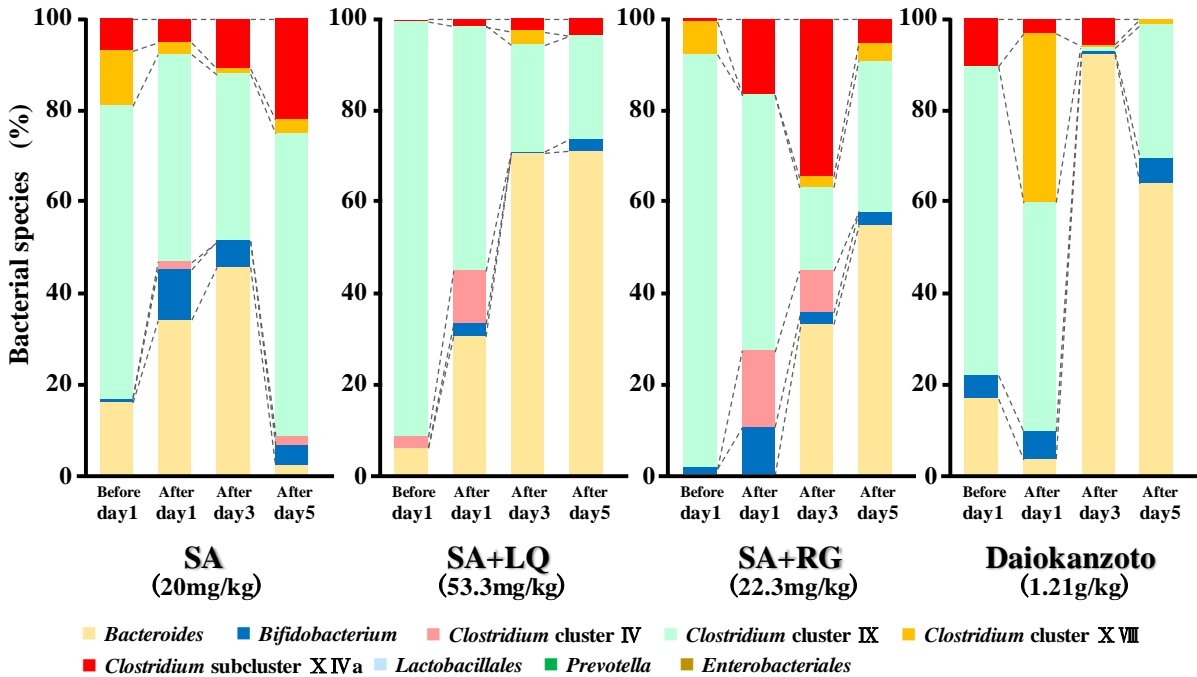


Fig. 45. Influence on the Intestinal Microbiota Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Fat Diet

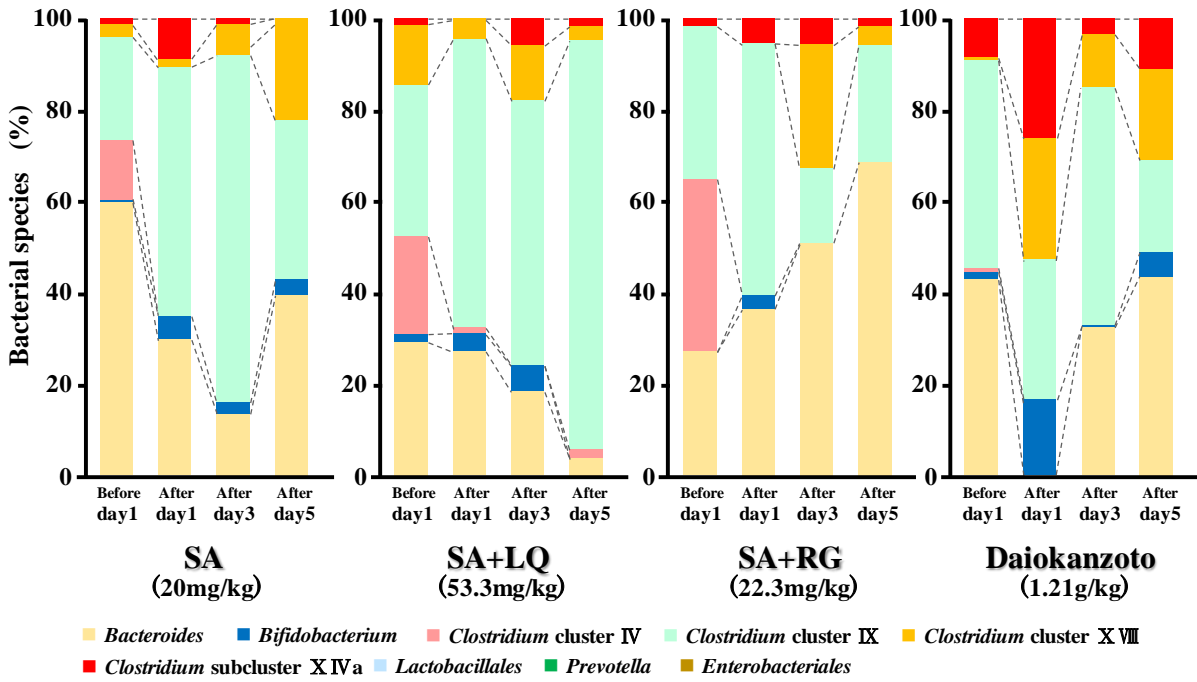


Fig. 46. Influence on the Intestinal Microbiota Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Protein Diet

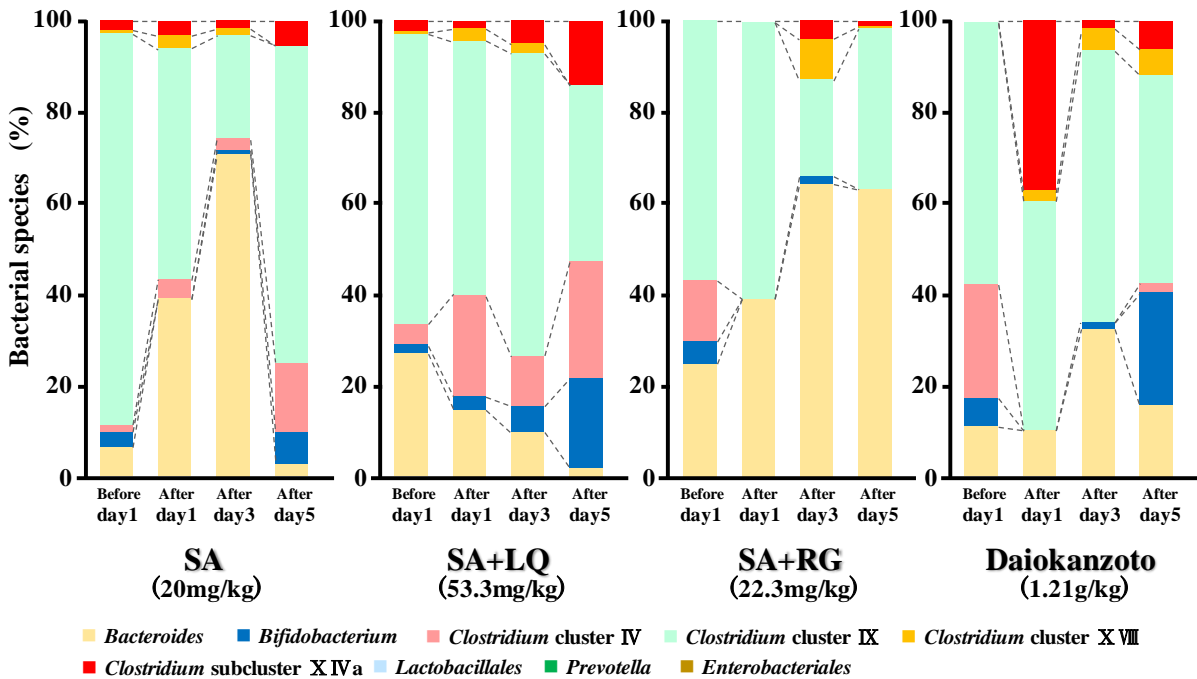


Fig. 47. Influence on the Intestinal Microbiota Treated with Laxatives for Five Consecutive Days by Intake of the High-Fiber Diet

小 括

第1章では、8種の抗菌薬を単回経口投与したマウスに、大黄甘草湯ならびにセンノシドAを投与して下剤活性を調べた結果、消化管から吸収されにくいアンピシリン、セフカペンピボキシール、カナマイシン、ホスホマイシン、ファロペネムによって下剤活性は強く抑制を受けた。一方で、消化管から吸収されやすいクラリスロマイシンとレボフロキサシンは、両投与群の下剤活性に対して顕著な影響を与えなかった。ミノサイクリンはセンノシドA投与群の下剤活性を有意に抑制したが、大黄甘草湯投与群の下剤活性は抑制されず、ミノサイクリンに対する大黄甘草湯とセンノシドAの反応性が異なった。ミノサイクリンによる下剤活性の抑制は、甘草ならびに甘草の主要成分であるグリチルリチンとセンノシドAを同時投与することによって認められなくなったが、その作用機序は現在のところ分かっていない。

第2章では、アンピシリンの継続投与によりセンノシドA代謝は抑制され続けたが、大黄甘草湯のセンノシドA代謝はアンピシリン投与3日目以降から賦活し、この賦活作用にRGが関することを明らかにした。下剤活性評価では、アンピシリン投与下において大黄甘草湯の下剤活性はセンノシドA単独と比較して有意に高い下剤活性を発現し、この作用にRGが関与することを証明した。さらに、アンピシリン投与前後の腸内微生物叢の変化をT-RFLPを用いて調べたところ、アンピシリン投与によりビフィズス菌は抑制され続けたのに対し、バクテロイデスのみがアンピシリン投与3日目以降から有意に存在割合が増加した。このことから、大黄甘草湯に含まれるRGはセンノシドA代謝に主に関与するとされるビフィズス菌だけではなく、バクテロイデスに作用することでセンノシドA代謝を促進している可能性を明らかにした。

第3章では、高繊維飼料を摂取させたマウスは、高脂肪飼料を摂取させた場合と比較して、センノシドA代謝ならびにセンノシドA下剤活性を有意に亢進した。特にセンノシドA代謝は摂取1日目から変動したことから、食餌によって腸内微生物叢が速やかに影響を受けることを本研究においても確認できた。大黄甘草湯の下剤活性は、高脂肪飼料摂取および高繊維飼料摂取間で有意差が認められ、高繊維飼料摂取によって抑制を受けたことから、この現象はLQやRG以外の成分が関与していると考えられる。

第4章では、アントラキノン系緩下薬を5日間にわたり連日投与することにより、高炭水化物および高脂肪飼料摂取によって、センノシドAの下剤活性が有意に抑制を受けたことから、下剤耐性の一因として腸内微生物叢の変動が示唆された。一方で、大黄甘草湯の下剤活性は高炭水化物および高脂肪飼料摂取時においても維持され続けた。この結果は、これらの飼料摂取により増加したバクテロイデスにRGが作用することで維持されている可能性が推測される。また、高繊維飼料摂取時における大黄甘草湯の下剤活性は投与2、3日目に抑制され、投与5日目には1日目と同等の下剤活性まで回復した。このように大黄甘草湯の下剤活性は、複合成分系薬物としての特

性を生かして腸内微生物叢の変動に応じて作用発現を調節しているのではないかと考えられた。

以上の結果から、抗菌薬や食餌による腸内微生物叢の変動に大黄甘草湯に含まれる様々な成分が、腸内微生物叢の多様性や腸内細菌が有する酵素活性など機能変化に影響を及ぼすことで大黄甘草湯の薬効発現を調節していることを解明し、西洋薬にはない漢方薬の腸内微生物叢とのクロストークを介した有用性を証明した。

総 括

近年では腸内微生物叢の変化がさまざまな疾病の発症に直接的に関与することが科学的に証明され [20-29]、腸内細菌が産生する代謝産物を介して宿主に作用することが解明され始めている [64-67]。特に、腸内細菌が糖質や食物繊維を代謝することで産生する短鎖脂肪酸が注目を集めており、短鎖脂肪酸は宿主のエネルギー源になるばかりではなく、細胞膜上の短鎖脂肪酸受容体（GPR41、GPR43 など）に作用することで交感神経系の調節やインスリンシグナルを抑制して脂肪の蓄積を抑制することが解明されている [66]。また、ビフィズス菌による糖質代謝により産生した酢酸が、腸管上皮細胞のバリア機能を強化することで腸管出血性大腸菌 O157 の感染死を防いでいることも明らかになっている [67]。

このような報告から、腸内微生物叢の多様性変化および腸内細菌が有する代謝酵素などの機能変化が宿主のホメオスタシスの維持に深く関与していると考えられる。一方、漢方医学では、病気は生理機能のバランスが崩れることで発症するという想定のもとに治療体系が構築されており、漢方薬は生体の自然治癒力を高めることでホメオスタシスの維持に寄与していると考えられている。以上のことから、近年明らかになってきた宿主と腸内細菌叢の関連性と、古来より用いられてきた漢方薬の概念に大きな共通点があると考えた。

そこで本研究では、漢方薬成分による腸内微生物叢の多様性変化および機能変化に与える影響を明らかにすることで、漢方薬成分と腸内微生物叢のクロストークの解明に努めた。本研究から、大黃甘草湯の下剤活性発現メカニズムとして、主有効成分であるセンノシド A の腸内代謝をセンノシド A 代謝促進成分である RG や LQ などが代謝促進することで、大黃甘草湯の下剤活性を亢進することを解明し、複合成分系薬物である大黃甘草湯の有用性を解明した。また、大黃甘草湯に含まれる様々な成分が腸内微生物叢の多様性や機能変化に影響を及ぼすことにより、抗菌薬や食餌による腸内微生物叢の変動に対応して、大黃甘草湯の薬効発現を調節していることを解明した。これまで報告されてきた漢方薬や生薬分野の研究において、酵素の働きを抑制する生薬成分は報告されているが、酵素活性を促進する生薬成分は本研究を除いて全く報告されていない。また、腸内細菌研究の分野においても、腸内有用菌の生育を促すプレバイオティクスの開発研究は盛んに進められているが、本研究で解明した RG および LQ は、腸内細菌が有する酵素活性など機能を高める作用により、腸内細菌による糖質代謝などを促進し腸内代謝産物の産生に大きく影響を及ぼすことが考えられる。これは、これまでのプレバイオティクスなどの概念には当てはまらない新たな作用機構であり、興味深い知見であるといえる。

本研究から得られた結果について、より詳細な検討を行い、科学的に解析を進めることで、多彩で特徴的な薬効を示す漢方薬のエビデンスの構築に繋げていく。

実験方法

1. 試薬及び実験材料

生薬 (栃本天海堂) : 大黄 (錦紋大黄、Lot.100901)、甘草 (東北甘草、Lot.050202) ; 試薬 : センノシド A、グリチルリチン酸二カリウム、アロエ - エモジン、ピューロマイシン二塩酸塩、アンピシリン (和光純薬)、レイン、エモジン (フナコシ)、リクイリチン、リクイリチンアピオシド、rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (本研究室にて単離精製) ; ビクシリンドライシロップ 10% (アンピシリン)、カナマイシンドライシロップ 20% (カナマイシン)、ホスミシンドライシロップ 400 (ホスミシン) (明治製菓株式会社)、フロモックス小児用細粒 100mg (セフカペンピボキシル) (塩野義製薬株式会社)、クラリシッド・ドライシロップ 10%小児用 (クラリスロマイシン) (アボットジャパン株式会社)、クラビット細粒 (レボフロキサシン) (第一三共株式会社)、ミノマイシン顆粒 2% (ミノマイシン) (ファイザー株式会社)、ファロムドライシロップ小児用 10% (ファロペネム) (マルホ株式会社) ; ラックビー微粒N (日研化学) ; チオグリコール酸培地 (日水製薬) ; 緩衝液調製用水、HPLC 用水 : Elix 純水装置システム (日本ミリポア) で製した純水をさらに超純水製造装置 (日本ミリポア) で製した超純水 ; HPLC 用アセトニトリル (和光純薬) ; アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) ; メンブランフィルター (ミニザルト RC15、0.45 μ m : ザルトリウス)、ミレックス - GP (0.22 μ m、日本ミリポア) ; 陰イオン交換樹脂 : TOYOPAK® DEAE M (東ソー) ; カラム : DIAION MCI-gel CHP-20P (三菱化学)、Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア)、クロマトグラム管 (直径 : 6.5cm、高さ : 60cm) ; 糞便破砕用チューブ (ザルスタット)、16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプライマー (516f-FAM : 5' - FAM - TGCCAGCAGCCGCGGTA、1510r : GGTTACCTTGTTACGACTT)、Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ)、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)、制限酵素 *Bs*I (New England BioLabs)、100bp DNA Ladder、Agarose LO3 「TAKARA」 (タカラバイオ) ; 特殊飼料 : 高炭水化物 (コントロール) 飼料 (D12450H)、50kcal%高タンパク質飼料 (D15122105)、45kcal%高脂肪飼料 (D12451)、10%インスリン添加高繊維飼料 (D14053101) (Research Diets, Inc) ; 実験動物 : ddY 系雄性マウス (体重 30-40g 前後、清水実験動物)

2. 漢方薬ならびに生薬抽出物の凍結乾燥品

1) 大黄甘草湯凍結乾燥品

大黄甘草湯の1日量に相当する大黄 (4 g)、甘草 (1 g) に精製水 (500mL) を加え、40 分間で約半量になるまで煎じ、温時ガラスフィルター (11G-1) を用いて吸引濾過後、濾液を凍結乾燥し製したものを大黄甘草湯凍結乾燥品 (収量 : 2.18~2.30 g) とした。

3. 日内日差変動の測定

1) 標準溶液の調製

標準品の 1/16 希釈液 (0.5mL : センノシド A、0.206mM ; グリチルリチン、0.374mM ; リクイリチン、0.293mM ; リクイリチンアピオシド、0.113mM) に精製水 (1.25mL) とメタノール (0.75mL) を混ぜ、メンブランフィルターでろ過したものを標準溶液とした。

2) 代謝混液の調製

大黃甘草湯凍結乾燥品 (5mg) ならびにセンノシド A (0.125mg) - 甘草凍結乾燥品 (4.25mg) の 0.01M リン酸塩緩衝液 (0.25mL) に 0.425% リン酸メタノール溶液 (1.25mL) を加え、糞便懸濁液 (1mL) を添加したもの (反応 0 時間) を代謝溶液とした。

3) 日内日差変動の測定

上記の標準溶液と代謝溶液を用い日内変動 ($n=15$) ならびに日差変動 ($n=5$) を測定し、相対標準偏差値を求めた。日差変動の試料は 4°C で保管し、用時室温に戻した後に測定した。

4. 添加回収試験

1) 試料溶液の調製

大黃甘草湯凍結乾燥品 (20mg)、センノシド A (0.2mg) をそれぞれ 0.01M リン酸塩緩衝液 (1mL) に溶解し、腸内代謝実験 (後述) で 4 時間代謝したものを試料溶液とした。

2) 添加回収試験

試料溶液または精製水 (1.25mL) に標準品の希釈液 (0.5mL) を添加し、直ちに 0.708% リン酸メタノール溶液またはメタノール (0.75mL) を加え反応を停止し、遠心後 (3000rpm、5min)、メンブランフィルターでろ過したものを添加回収溶液とした。各試料溶液に添加した標準品の希釈液の濃度は次の通りである。大黃甘草湯 (センノシド A : 52.3 - 418.6 μ M、グリチルリチン : 91.5 - 754.1 μ M)、センノシド A (センノシド A : 52.3 - 418.6 μ M)。この添加回収溶液の面積値と濃度 (μ M) から回帰直線式の傾きを計算し、試料溶液の有無による標準溶液の傾きの比を添加回収率 (%) として求めた。

【第 1 編 第 2 章 甘草に含まれるセンノシド A 代謝促進成分】

1. 腸内代謝実験

1) 試料溶液の調製

甘草凍結乾燥品 (952mg) を 0.01M リン酸塩緩衝液 (14mL) で均一にした溶液 (7mL) を量りとり、0.01M リン酸塩緩衝液 (7mL) で希釈した。この操作を繰り返し、5 種類の甘草懸濁液 (68、34、17、8.5、4.25mg/mL) を調製した。センノシ

ド A (1mM) を 0.01M リン酸緩衝液で調製し、5 種類の甘草懸濁液を添加して試料溶液を作製した。

同様の方法を用いて、リクイリチン (56mg) は 7 種類 (4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625mg/mL)、リクイリチンアピオシド (44.8mg) は 7 種類 (3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05mg/mL)、グリチルリチン (179mg) は 7 種類 (12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2mg/mL) の、それぞれセンノシド A (0.5mM) を含有する試料溶液を作製した。リクイリチンだけは加熱溶解が必要であった。大黄甘草湯または甘草に含まれるセンノシド A 及びグリチルリチンの割合を基準に、甘草凍結乾燥品、グリチルリチン、リクイリチン、リクイリチンアピオシドを調製した。

2) 代謝実験 (腸内代謝実験法)

ddY 系雄性マウス (4 週齢、体重 30g 前後) を下剤活性評価用ボックスに入れ、排便後 1.5 時間以内の糞便 (約 30mg/糞便) を個々のマウスから均等に採取し、各群の糞便とした。糞便を 5 倍の 0.01M リン酸塩緩衝液中でホモジナイズし、遠心 (3000rpm、1min) 後の上澄み液をサンプル管に移し、炭酸ガスで置換した。上澄み液 (1mL) に試料溶液 (0.25mL) を添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37°C で 2、4、8 時間インキュベートした。終了後直ちに 0.425% リン酸/メタノール (1.25mL) を加え反応を停止し、遠心後 (3000rpm、5min)、メンブランフィルターでろ過したものを HPLC で分析した。試料溶液のそれぞれ反応 0min のものをブランクとした。センノシド A の代謝率 (%) は (ブランク中のセンノシド A - センノシド A 残量) / ブランク × 100 で算出した。有意差検定は Dunnett's test で行った。

2. 下剤活性評価

1) 経口投与試料溶液の調製

甘草凍結乾燥品 (952mg) を 0.01M リン酸塩緩衝液 (28mL) で均一にした溶液 (14mL) を量りとり、0.01M リン酸塩緩衝液 (14mL) で希釈した。この操作を繰り返して、3 種類の甘草懸濁液 (34、17、8.5mg/mL ; 投与量 680、340、170mg/kg) を調製した。センノシド A (9mg) に 3 種類の甘草懸濁液 (12mL) を添加した。

同様の方法を用いて、リクイリチン (56mg) は 3 種類 (2、1、0.5mg/mL ; 投与量 40、20、10mg/kg)、リクイリチンアピオシド (44.8mg) は 3 種類 (1.6、0.8、0.4mg/mL ; 投与量 32、16、8mg/kg)、グリチルリチン (179.2mg) は 3 種類 (6.4、3.2、1.6mg/mL ; 投与量 128、64、32mg/kg) の、それぞれセンノシド A (0.75mg/mL ; 投与量 15mg/kg) を含有する試料溶液を作製した。大黄甘草湯中に含まれるセンノシド A 及びグリチルリチンの割合を基準に甘草凍結乾燥品、グリチルリチン、リクイリチンを調製した。

2) 下痢の判定方法 (下剤活性評価法)

ddY 系雄性マウス (4 週齢、体重 30g 前後) を経口投与 1 時間前から 1 L ビーカー

Tab. 5. ^1H and ^{13}C NMR Spectral Data of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (DMSO- d_6)

H atom	δH ppm (J Hz)	C atom	δC ppm
2	7.76 s	1	161.07
4	8.12 s	2	123.86
5	7.86-7.93	3	137.20
6	7.86-7.93	4	117.99
7	7.73 dd ($J_{6,7}=7.6$ / $J_{5,7}=1.5$)	5	120.56
1'	5.18 d ($J_{1',2'}=7.6$)	6	136.19
2'	3.40-3.58	7	122.50
3'	3.15-3.39	8	158.29
4'	3.15-3.39	9	187.31
5'	3.40-3.58	10	181.52
6'	3.40-3.58	11	134.65
	3.72 d ($J_{6',6''}=11.6$)	12	132.91
		13	120.67
		14	119.47
		COOH	165.45
		1'	100.54
		2'	77.24
		3'	76.47
		4'	69.52
		5'	73.26
		6'	60.60

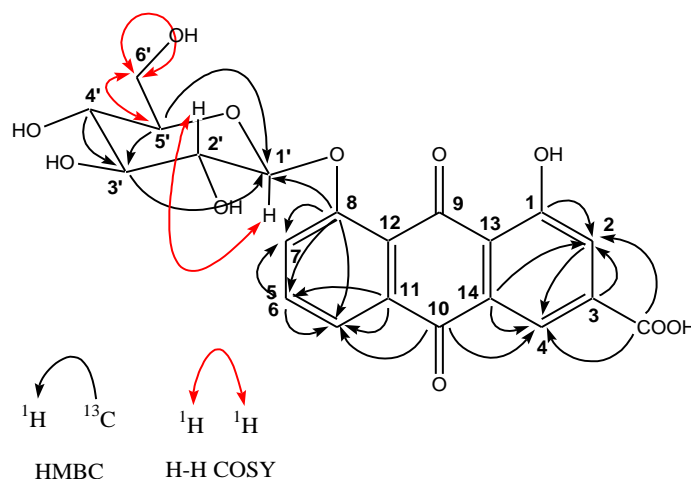


Fig. 48. HMBC and ^1H - ^1H COSY Correlations of Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside

3. 腸内代謝実験

1) 試料溶液の調製

(1) センノシド A 代謝に及ぼす大黄抽出物の影響

センノシド A (0.2mM) を 0.01M リン酸緩衝液で調製した。大黄抽出物の各フラクションの凍結乾燥品の濃度は大黄 17mg/mL に相当する量を算出し、センノシド A (0.2 mM) と Fr. I (0.5mg/mL)、Fr. II (1.9mg/mL)、Fr. III (3.2mg/mL)、Fr. IV

(2.3mg/mL)、Fr.V (1.1mg/mL) をそれぞれ混合したものを試料溶液とした。Fr.Vは溶解しなかったため懸濁液とした。

(2) センノシド A 代謝に及ぼす RG などのアントラキノン成分の影響

センノシド A (0.2mM) は 0.01M リン酸緩衝液で調製した。RG (0.03~1mM)、レイン (0.03~1mM)、エモジン (0.03~0.25mM) およびアロエ - エモジン (0.03~0.25mM) は 0.5%炭酸水素ナトリウム溶液で溶解後、センノシド A 溶液を添加し試料溶液とした。

2) 代謝実験 (腸内代謝実験法)

ddY 系雄性マウス (4 週齢、体重 30g 前後) を下剤活性評価用ボックスに入れ、排便後 1.5 時間以内の糞便 (約 30mg/糞便) を個々のマウスから均等に採取した。糞便を 20 倍の 0.01M リン酸緩衝液中でホモジナイズし、ガーゼ濾過後糞便懸濁液を炭酸ガスで置換した。直ちにネジ付き試験管に移しアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に入れ 24 時間プリインキュベーションをした。プリインキュベーションした糞便懸濁液 (1mL) に試料溶液 (0.25mL) を添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37°C で 4 時間インキュベーションした。反応後直ちに 0.425% リン酸/メタノール (1.25mL) を加え反応を停止し、遠心後 (3000rpm、5min)、メンブランフィルターでろ過したものを HPLC で分析した。試料溶液のそれぞれ反応 0min のものをブランクとし、センノシド A の代謝率 (%) は (ブランク中のセンノシド A - センノシド A 残量) / ブランク × 100 で算出した。有意差検定は Dunnett's test で行った。

4. 下剤活性評価

1) 経口投与試料溶液の調製

センノシド A (投与量 15mg/kg) は 0.01M リン酸塩緩衝液と 0.5%炭酸水素ナトリウム溶液で調製した。RG (投与量 4.2~66.8mg/kg) およびレイン (投与量 1.3~10.7mg/kg) は 5%炭酸水素ナトリウム溶液で完全に溶解後、精製水で 10 倍希釈した後、センノシド A 溶液を添加して経口投与試料溶液とした。

2) 下痢の判定方法 (下剤活性評価法)

第 1 編第 2 章と同様。

【第 1 編 第 4 章 Rhein 8-O-β-D-glucopyranoside およびリクイリチンによるセンノシド A 代謝促進機序】

1. HPLC 条件

第 1 編第 3 章と同様。

2. 腸内代謝実験法

1) 試料溶液の調製

センノシド A (0.2mM) は 0.01M リン酸緩衝液で調製した。RG (0.4mM)、レイン (0.4mM) ならびにリクイリチン (0.4mM) は 0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で溶解後、センノシド A 溶液を添加し試料溶液とした。ピューロマイシン (10mg/mL) は超純水で溶解後、適正濃度まで超純水で 10 倍ずつ希釈し調製した。

2) 代謝実験 (腸内代謝実験法)

(1) センノシド A 代謝促進成分によるセンノシド A 代謝変化

ddY 系雄性マウス (4 週齢、体重 30g 前後) を下剤活性評価用ボックスに入れ、排便後 1.5 時間以内の糞便 (約 30mg/糞便) を個々のマウスから均等に採取した。糞便を 20 倍の 0.01M リン酸緩衝液中でホモジナイズし、ガーゼ濾過後、炭酸ガス置換を行う。この糞便液 (1mL) に試料溶液 (0.25mL) を添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37°C で 2 - 24 時間インキュベートした。反応後直ちに 0.425% リン酸/メタノール (1.25mL) を加え反応を停止し、遠心後 (3000rpm、5min)、上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、HPLC で分析した。試料溶液のそれぞれ反応 0min のものをブランクとし、センノシド A の代謝率 (%) は (ブランク中のセンノシド A - センノシド A 残量) / ブランク × 100 で算出した。得られた結果については Dunnett's test を用いて有意差検定を行った。

(2) ビフィズス菌のセンノシド A 代謝酵素活性における代謝促進成分の影響

チオグリコール酸培地に精製水を加え濃度を 29.3g/L とし、オートクレーブ処理 (120°C、2 気圧、20min) 及び炭酸ガス置換を行った培養液にラックビー配合菌種 (2mg/mL) を添加して、アネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 24 時間嫌気培養した。培養液 (1mL) を試料溶液 (0.25mL) に添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37°C で 2 - 24 時間インキュベートした。反応後は (1) と同様の操作を行った。

(3) 腸内細菌のセンノシド A 代謝酵素に対する代謝促進成分の影響

(1) と同様にして糞便を採取した。糞便を 20 倍の 0.01M リン酸緩衝液中でホモジナイズし、RG (0.4mM)、レイン (0.4mM)、リクイリチン (0.4mM) をそれぞれ添加し、アネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 24 時間プラインキュベートした。それぞれの糞便懸濁液をガーゼ濾過し、遠心後 (4°C、3000rpm、10min)、上澄み液を陰イオン交換樹脂で濾過した。濾過した液 (1mL) に炭酸ガス置換を行った後、センノシド A (0.2mM) を 0.25mL 添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37°C で 24 時間インキュベートした。反応後 (1) と同様の操作を行った。また、前述と同様にホモジナイズした糞便懸濁液に RG (0.4mM)、ピューロマイシンならびに 0.01M リン酸緩衝液をそれぞれ添加し、アネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 24 時間プラインキュベートした。以下の操作は前述と同様の操作を行った。得られた結果については unpaired *t* test を用いて有意差検定を行った。

(4) ビフィズス菌のセンノシド A 代謝酵素の誘導における RG の影響

チオグリコール酸培地に精製水を加え濃度を 6.45g/L とし、オートクレーブ処理

(120℃、2 気圧、20min) 及び炭酸ガス置換を行った培養液と RG (0.4mM) を混合した後、混合液をラックビー配合菌種 (2mg/mL) に添加しアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 24 時間プリインキュベートした。プリインキュベートしたラックビー懸濁液 (1mL) をセンノシド A (0.25mL) に添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37℃で 24 時間インキュベートした。反応後は(1)と同様の操作を行った。得られた結果については unpaired *t* test を用いて有意差検定を行った。また、前述と同様にオートクレーブ処置及び炭酸ガス置換を行った培養液と試料溶液の混合液にピューロマイシンを添加し、ネジ付き試験管に量り取ったラックビーに添加しアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 24 時間プリインキュベートした。プリインキュベートしたラックビー懸濁液 (1mL) をネジ付き試験管に量り取ったセンノシド A (0.25mL) に添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して 37℃で 24 時間インキュベートした。反応後は(1)と同様の操作を行った。得られた結果については unpaired *t* test を用いて有意差検定を行った。

【第2編 第1章 抗菌薬による大黄甘草湯の薬効発現に与える影響】

8種類の抗生剤について2種類ずつ(アンピシリン・セフカペンピボキシル、カナマイシン・クラリスロマイシン、レボフロキサシン・ホスホマイシン、ミノサイクリン・ファロペナム)の組み合わせに対して1サイクルを9日間とし、以下の実験を行った。ddY系雄性マウス(4週齢、体重30g前後)を下剤活性評価用ボックスに1匹ずつ1.5時間放置し、2日間にわたって糞便数を記録する。1匹毎の2日間の合計糞便数をもとに順位をつけ、上位36匹を選抜し、どの群もほぼ同程度の糞便数が得られるように群分けを行った。群分け後、3日目から3日間にわたり、腸内代謝実験を行った(後述参照)。この3日間のセンノシドAの代謝率をもとにコントロール群を決定した。8日目に、腸内代謝実験を行うと共にコントロール群には蒸留水をその他の群には抗生剤(後述)を単回経口投与した。9日目は下剤投与2.5時間前に抗生剤による下痢の有無を確認すると共に、得られた糞便は腸内代謝実験の試料とした。

1. HPLC 条件

第1編第1章と同様。

2. 腸内代謝実験

1) 試料溶液の調製

大黄甘草湯凍結乾燥品(20mg)及びセンノシドA(0.2mg)の0.01Mリン酸塩緩衝液(1mL)で調製したものを試料溶液とした。いずれも4時間インキュベート後にほぼ100%代謝される濃度である。

2) 腸内代謝実験

下剤活性評価において抗生剤及び蒸留水を経口投与したマウスの17時間後の新鮮な糞便(排便後1.5時間以内)を群ごとに総て採取し、5倍の0.01Mリン酸塩緩衝液

中でホモジナイズし、上述の試料溶液について前述の腸内代謝実験法を用い 37°Cで 4 時間インキュベートしたものについて代謝率を計算した。センノシド A の代謝率 (%) は (ブランク中のセンノシド A - センノシド A 残量) / ブランク × 100 で算出した。有意差検定は Dunnett's test で行った。

3. 下剤活性評価

1) 経口投与試料溶液の調製

抗菌薬を微粉化し、ヒトにおける 1 日量の 10 倍量に相当する量を蒸留水で溶解または懸濁した。アンピシリン [ABPC 商品名: ビクシリンドライシロップ 10%] (0.04984g/12mL; 投与量 83mg/kg)、セフカペンピボキシル [CFPN-PI 商品名: フロモックス小児用細粒 100mg] (0.035g/14mL; 投与量 50mg/kg)、カナマイシン [KM 商品名カナマイシンドライシロップ 20%] (0.495g/15mL; 投与量 660mg/kg)、クラリスロマイシン [CAM 商品名クラリシッド・ドライシロップ 10%小児用] (0.0671g/20mL; 投与量 67mg/kg)、レボフロキサシン [LVFX 商品名クラビット細粒] (0.0375g/15mL; 投与量 50mg/kg)、ホスホマイシン [FOM 商品名ホスミシンドライシロップ 400] (0.375g/15mL; 投与量 500mg/kg)、ミノサイクリン [MINO 商品名ミノマイシン顆粒 2%] (0.02505g/15mL; 投与量 33.4mg/kg)、ファロペネム [FRPM 商品名ファロムドライシロップ小児用 10%] (0.2475g/15mL; 投与量 330mg/kg) を蒸留水で溶解または懸濁した。抗菌薬は攪拌後、10 分間ソニケーション処理を行った。ビクシリンのみ溶解し、その他の抗菌薬は均一な懸濁液として、マウスの体重 10g あたり 0.2mL を経口投与した。同程度の下痢スコアを示す大黄甘草湯 (1.21g/20mL; 投与量 1.21g/kg) ならびにセンノシド A (36mg/18mL; 投与量 40mg/kg) を 0.01M リン酸塩緩衝液で調製した。大黄甘草湯については 10 分間ソニケーション処理したものを試料溶液とした。センノシド A に甘草 (454mg/kg)、リクイリチン (30mg/kg)、グリチルリチン (90mg/kg) の混合溶液は、甘草凍結乾燥品 (272.4mg)、リクイリチン (18mg)、グリチルリチン (54mg) を 0.01M リン酸塩緩衝液 (12mL) で調製後、各 10mL をセンノシド A (20mg) に溶解した。

2) 下痢の判定方法 (下剤活性評価法)

抗菌薬投与 19 時間後に大黄甘草湯 (1.21g/kg) およびセンノシド A (40mg/kg)、またはセンノシド A に甘草 (454mg/kg)、リクイリチン (30mg/kg)、グリチルリチン (90mg/kg) の混合溶液を経口投与し、下剤活性評価用ボックスを用いて下剤活性を 1 時間毎、8 時間にわたり観察し、正常便、膨潤便、軟便、泥状便、粘液便に分類し個数を記録した。観察中は絶食絶水とした。下痢のスコア化は前述のように行い、各個体での 8 時間の合計の平均値を算出した下痢スコアについて、Steel's test または Mann-Whitney's U-test を用いて有意差検定を行った。

【 第2編 第2章 アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯の薬効発現に与える影響 】

1. アンピシリン含有粉末飼料の調製

ddY系雄性マウス（7匹/群）の1日あたりの平均食餌率が60%であったことから、この60%にヒトの1日量の3倍に相当する量のアンピシリン（25mg/kg）が100%含有されるように粉末飼料と混合した。

2. HPLC条件

第1編第3章と同様。

3. 腸内代謝実験

1) 試料溶液の調製

大黄甘草湯（20mg/mL）を0.01Mリン酸緩衝液と0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液を等量ずつ加えて製した。センノシドA（0.2mM）をセンノシドA（0.4mM）と0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液を等量ずつ加えて製した。RG添加試料およびLQ添加試料は、RG（2mM）ならびにLQ（2mM）とセンノシドA（0.4mM）を等量ずつ添加して試料溶液とした。

2) 腸内代謝実験

第2編第1章と同様。

4. 下剤活性評価

1) 試料溶液の調製

センノシドA（投与量40mg/kg）および大黄甘草湯（投与量1.21g/kg）を0.01Mリン酸緩衝液と0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液を等量ずつ加えて製した。RG（投与量22.3mg/kg）を0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で溶解後、センノシドA溶液を0.01Mリン酸緩衝液で製したものを等量ずつ添加して試料溶液とした。

2) 下痢の判定方法（下剤活性評価法）

第2編第1章と同様。

5. T-RFLPを用いたアンピシリン投与前後の腸内微生物叢の解析

1) 糞便DNAサンプルの調製

アンピシリン投与1日前～投与8日後のマウス糞便を採取するために、排便後1.5時間以内の糞便（約30mg/糞便）を個々のマウスから均等に採取した。糞便200mgをBeads Tubeに入れた後、0.01Mリン酸緩衝液（1mL）を添加し、ボルテックスで糞便を完全に懸濁させ、遠心分離（20℃、12,000g、5min）を行った。上清を新しいチューブに移し、10%SDS（100μL）を添加し十分に混和した後、遠心分離（20℃、20,000g、10min）を行った。上清を新しいチューブに移し、等量のPCI溶液を添加

して十分に混和した後、遠心分離（20℃、20,000g、10min）を行った。その後、同様の操作をもう1度繰り返し、上清を新しいチューブに移して、3M酢酸ナトリウム（50μL）とイソプロパノール（600μL）を加え転倒混和した後、遠心分離（4℃、20,000g、10min）を行った。冷凍庫で静置し、遠心分離（4℃、20,000g、5min）を行った。その後、上清を捨て、70%エタノール（1mL）を加え、遠心分離（4℃、20,000g、5min）を行い、フラッシングした後、風乾して、TE（100μL）とRNaseA（1μL）を加え、室温で30分以上静置した。その後、High Pure PCR Template Preparation Kit（Roche）のプロトコールに従ってサンプル精製を行い、糞便DNAサンプルを調製した。

2) T-RFLPによる腸内微生物叢の解析

T-RFLPによる腸内微生物叢の解析は長島らが報告している方法を用いて解析を行った。PCR反応はTks Gflex™ DNA Polymerase（タカラバイオ）を用いて、糞便DNAサンプル（10ng）、各プライマー（516f-FAM、1510r）を各0.5μL、2×Gflex buffer（10μL）、Tks Gflex polymerase（0.4μL）、滅菌水を加えて全量20μLとしてPCRサンプルを調製した。PCR条件は94℃1分間に続き、94℃10秒、55℃15秒、68℃1分を35サイクルに設定し、最後に68℃10分間で行なった。その後、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて、プロトコールに従いPCR産物の精製を行った。*Bs*IIによる制限酵素処理を行うために、PCR産物（2μL）、滅菌水（6μL）、Cut Smart Buffer（1μL）、*Bs*II（1μL）を加えて全量10μLとして55℃、3時間で制限酵素処理した。その後、制限酵素処理サンプル（2μL）、MapMarker 1000（0.5μL）、Hi-Di Formamide（12μL）を調製し、96℃で2分間熱処理後、5分以上冷却したサンプルを、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）でフラグメント解析を行った。得られたピークについては、Gene Mapper v5. software（Applied Biosystems）を用いてフラグメントピーク高さおよび面積値を算出し解析した。

【 第2編 第3章 食餌による大黄甘草湯の薬効発現に与える影響 】

1. HPLC条件

第1編第3章と同様。

2. 各種飼料の給餌方法

ddY系雄性マウス（4週齢、体重30g前後、60匹）を体重、糞便個数ならびにセンノシドA代謝率を指標にコントロール群ならびにそれぞれの飼料を与える群に分けた。コントロール群は常時、高炭水化物飼料（D12450H）を与え、それぞれの飼料を与える群には、初めの1週間は高炭水化物飼料を与えた後、高脂肪飼料（D12451）を2週間、高繊維飼料（D14053101）を2週間投与した。その後、これらのマウスを3群に分け、それぞれコントロール・高脂肪・高繊維飼料を5日間摂取させ、最終日

に下剤活性評価を行った。

3. 腸内代謝実験

1) 試料溶液の調製

第2編第2章と同様。

2) 腸内代謝実験

マウスを下剤活性評価用ボックスに入れ、排便後1時間以内の糞便(約30mg/糞便)を個々のマウスから均等に採取した。糞便を40倍の0.01Mリン酸緩衝溶液中でホモジナイズし、ガーゼろ過した後、ろ液を炭酸ガスで置換した。糞便懸濁液(1mL)を試料溶液(0.25mL)に添加し、直ちにアネロパック・ケンキ入りの密閉容器に移して37°Cで4~24時間インキュベートした。終了後直ちに0.425%リン酸/メタノール(1.25mL)を加え反応を停止し、遠心(3000rpm, 5min)後、メンブランフィルターでろ過したものをHPLCで分析した。試料溶液のそれぞれ反応0minのものをブランクとした。センノシドAの代謝率(%)は(ブランク中のセンノシドA—センノシドA残量)/ブランク×100で算出した。各試料のコントロールと比較してStudent's *t*-testを用いて有意差検定を行った。

4. 下剤活性評価

1) 経口投与試料溶液の調製

センノシドA(投与量20mg/kg)および大黄甘草湯(投与量1.21g/kg)は0.01Mリン酸緩衝液と0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で調製した。RG(投与量22.3mg/kg)ならびにLQ(投与量53.3mg/kg)は0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で完全に溶解後、センノシドA溶液を添加して試料溶液とした。

2) 下痢の判定方法(下剤活性評価法)

マウスを経口投与1時間前から1Lビーカーをかぶせた網上に放置し(下剤活性評価ボックス)、下痢をしていない正常便排出マウスのみを使用した。投与群は1群を5匹とし、12群60匹を使用した。下剤活性評価については第1編第2章と同様であり、得られた結果はSteel-Dwass testを用いて有意差検定を行った。

【第2編 第4章 大黄甘草湯の連日投与による下剤活性変化と腸内微生物叢の変動】

1. 各種飼料の給餌方法

高炭水化物飼料を給餌させたddY系雄性マウス(4週齢、体重30g前後、112匹)を体重、糞便個数およびセンノシドA代謝率を指標に各種摂取飼料ごとに28匹ずつに群分けした。群分け後、高炭水化物飼料(D12450H)、高タンパク質飼料(D15122105)、高脂肪飼料(D12451)、高繊維飼料(D14053101)を各群1週間給餌した後、下剤活性評価を行った。

2. 下剤活性評価

1) 経口投与試料溶液の調製

センノシド A (投与量 20mg/kg) および大黃甘草湯 (投与量 1.21g/kg) は 0.01M リン酸緩衝液と 0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で調製した。RG (投与量 22.3mg/kg) ならびに LQ (投与量 53.3mg/kg) は 0.5%炭酸水素ナトリウム水溶液で完全に溶解後、センノシド A 溶液を添加して試料溶液とした。

2) 下痢の判定方法 (下剤活性評価法)

マウスを経口投与 1 時間前から 1L ビーカーをかぶせた網上に放置し (下剤活性評価ボックス)、下痢をしていない正常便排出マウスのみを使用した。試料投与群は飼料摂取群を 4 群に分けて 1 群を 7 匹とした。下剤活性評価については第 1 編第 2 章と同様の方法で 5 日間を通して評価を行った。得られた結果は Steel's test を用いて有意差検定を行った。

3. T-RFLP を用いた大黃甘草湯の連日投与による腸内微生物叢の解析

1) 糞便 DNA サンプルの調製

大黃甘草湯などの下剤投与の直前、投与 1 日後、3 日後および 5 日後のマウス糞便を採取するために、排便後 1 時間以内の糞便 (約 30mg/糞便) を個々のマウスから均等に採取した。糞便 DNA の抽出・精製に関しては、第 2 編第 2 章と同様の方法で行なった。

2) T-RFLP による腸内微生物叢の解析

第 2 編第 2 章と同様の方法で T-RFLP を行い、フラグメント解析は Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

論文目録

本研究の主要部分は以下の論文に公表した。

1. Takayama K., Matsui E., Kobayashi T., Inoue H., Tsuruta Y., Okamura N. High-performance liquid chromatographic determination and metabolic study of sennoside A in daiokanzoto by mouse intestinal bacteria. *Chem.Pharm.Bull.*, **59**, 1106-1109 (2011).
2. Matsui E., Takayama K., Sato E., Okamura N. The influence of glycyrrhiza and antibiotics on the purgative action of sennoside A from daiokanzoto in mice. *Biol.Pharm.Bull.*, **34**, 1438-1442 (2011).
3. Takayama K., Tsutsumi H., Ishizu T., Okamura N. The influence of rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside on the purgative action of sennoside A from rhubarb in mice. *Biol.Pharm.Bull.*, **35**, 2204-2208 (2012).
4. Takayama K., Morita T., Tabuchi N., Fukunaga M., Okamura N. The effect of anthraquinones in daiokanzoto on increasing the synthesis of sennoside A-metabolic enzyme derived from bifidobacteria. *J. Trad. Med.*, **30**, 215-220 (2013).
5. Takayama K., Tabuchi N., Fukunaga M., Okamura N. Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside elicited the purgative action of daiokanzoto (da-huang-gan-cao-tang), despite dysbiosis by ampicillin. *Biol.Pharm.Bull.*, **39**, 378-383 (2016).

参考論文目録

6. Okamura N., Takayama K., Kaita T. Effect of goreisan on diarrhea model mouse induced by saline purgative. *Kampo Medicine*, **60**, 493-501 (2009).

引用文献

- 1) 日本漢方生薬製剤協会 編：新 一般用漢方処方の手引き（じほう、2013）
- 2) 日本漢方生薬製剤協会：漢方薬処方実態調査（2011）
- 3) Iwasaki K., Satoh-Nakagawa T., Maruyama M., Monma Y., Nemoto M., Tomita N., Tanji H., Fujiwara H., Seki T., Fujii M., Arai H., Sasaki H., A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients, *J Clin Psychiatry*, **66**, 248-252 (2005)
- 4) Kawakami Z., Kanno H., Ueki T., Terawaki K., Tabuchi M., Ikarashi Y., Kase Y., Neuroprotective effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cells, *Neuroscience*, **159**, 1397-1407 (2009)
- 5) Kawakami Z., Ikarashi Y., Kase Y., Glycyrrhizin and its metabolite 18 β -glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes, *European Journal of Pharmacology*, **626**, 154-158 (2010)
- 6) Itoh T., Yamakawa J., Mai M., Yamaguchi N., Kanda T., The effect of the herbal medicine dai-kenchu-to on post-operative ileus, *J Int Med Res.*, **30**, 428-432 (2002)
- 7) Kono T, Kaneko A, Omiya Y, Ohbuchi K, Ohno N, Yamamoto M., Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **304**, G428-G436 (2013).
- 8) Okamura N., Miki H., Harada T., Yamashita S., Masaoka Y., Nakamoto Y., Tsuguma M., Yoshitomi H., Yagi A. Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **20**, 363-372 (1999).
- 9) Nakamura R., Makino B., Endo Y., Sakakibara I., Terabayashi S., Takeda S., Sasaki H. Investigation of the role of a mineral crude drug in Kampo medicine (part 1) chemical analysis of multiple effects of Gypsum fibrosum in makyokansekito. *Japan. J. Pharmacog*, **60**, 59-67 (2006).
- 10) Hattori M., Namba T., Akao T., Kobashi K., Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Pharmacology*, **36**, 172-179 (1988).
- 11) Kobashi K., Nishimura T., Kusaka M., Hattori M., Namba T.: Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Med.*, **40**, 225-236 (1980).
- 12) Matsumoto M., Ishige A., Yuzawa Y., Kondo M., Muramatsu K., Watanabe K. Promotion of intestinal peristalsis by bifidobacterium spp. capable of hydrolyzing sennosides in mice. *PLoS ONE*, **7**, e31700 (2012).

- 13) Yagi T., Miyawaki Y., Nishikawa A., Horiyama S., Yamauchi K., Kuwano S., Prostaglandin E2-mediated stimulation of mucus synthesis and secretion by rheinanthrone, the active metabolite of sennosides A and B, in the mouse colon. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 542-545 (1990).
- 14) Yagi T., Miyawaki Y., Nishikawa A., Yamauchi K., Kuwano S. Suppression of the purgative action of rhein anthrone, the active metabolite of sennoside A and B, by indomethacin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 307-310 (1991).
- 15) Kon R., Ikarashi N., Nagoya C., Takayama T., Kusunoki Y., Ishii M., Ueda H., Ochiai W., Machida Y., Sugita K., Sugiyama K. Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract. *J. Ethnopharmacol.*, **152**, 190-200 (2014).
- 16) Miyoshi A., Masamune O., Fukutomi H., Mori H., Miwa T., Kojima K., Aono M., Nakajima M. The clinical effect of TSUMURA daiokanzoto extract granules for ethical use (TJ-84) by double blind test against the constipation. *Gastroenterology*, **18**, 299-312 (1994).
- 17) Miyoshi A., Masamune O., Fukutomi H., Mori H., Miwa T., Kojima K., Aono M., Nakajima M. The clinical effect of TSUMURA daiokanzoto extract granules for ethical use (TJ-84) against the constipation based on the new standard. *Gastroenterology*, **22**, 314-328 (1996).
- 18) Mitsuoka, T., *Biosci. Microbiota. Food Health*, **33**, 99-116 (2014).
- 19) 神谷茂、大崎敬子：医学のあゆみ、**251**、5-11 (2014)。
- 20) Kim YG., Udayanga KG., Totsuka N., Weinberg JB., Núñez G., Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE₂. *Cell Host Microbe.*, **15**, 95-102 (2014).
- 21) Tsuda M., Hosono A., Yanagibashi T., Kihara-Fujioka M., Hachimura S., Itoh K., Hirayama K., Takahashi K., Kaminogawa S. Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol. Lett.*, **132**, 45-52 (2010).
- 22) Rosenfeldt V., Benfeldt E., Nielsen SD., Michaelsen KF., Jeppesen DL., Valerius NH., Pærregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol.*, **111**, 389-395 (2003).
- 23) Larsen N., Vogensen FK., van den Berg FW., Nielsen DS., Andreasen AS., Pedersen BK., Al-Soud WA., Sørensen SJ., Hansen LH., Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, **5**, e9085 (2010).
- 24) Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss CA., Maza O., Israeli D., Zmora N., Gilad S., Weinberger A., Kuperman Y., Harmelin A., Kolodkin-Gal I., Shapiro H., Halpern Z., Segal E., Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by

- altering the gut microbiota. *Nature*, **514**, 181-186 (2014).
- 25) Turnbaugh PJ., Ley RE., Mahowald MA., Magrini V., Mardis ER., Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031 (2006).
 - 26) Turnbaugh PJ., Bäckhed F., Fulton L., Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.*, **3**, 213-223 (2008).
 - 27) Foster JA., McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci*, **36**, 305-312 (2013).
 - 28) Finegold SM., Dowd SE., Gontcharova V., Liu C., Henley KE., Wolcott RD., Youn E., Summanen PH., Granpeesheh D., Dixon D., Liu M., Molitoris DR., Green JA III. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, **16**, 444-453 (2010).
 - 29) Lee YK., Menezes JS., Umesaki Y., Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4615-4622 (2011).
 - 30) Ishihara M., Homma M., Kuno E., Watanabe M., Kohda Y. Combination use of Kampo-medicines and drugs affecting intestinal bacterial flora. *YAKUGAKU ZASSHI*, **122**, 695-701 (2002).
 - 31) Akase T., Akiba T., Isai H., Suzuki S. A pharmacoepidemiological and economic study on the medicinal expenses for the treatment of colds – Comparison between modern drugs and kampo medicine -. *Kampo Medicine*, **50**, 655-663 (2000).
 - 32) Ikarashi N., Shimura A., Takezawa T., Muto A., Toda T., Ito K., Kimura T., Akiba T., Irie Y., Watanabe K., Fukuzawa M., Ishii H., Watanabe K., Sugiyama K. Survey of the use of kampo medicines at kampo clinic 1 – Combined use with western drugs -. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **33**, 353-358 (2007).
 - 33) Hayasaka M., Katayama J., Nakamura S., Murai Y., Saito K., Mizugaki M. Investigation of the simultaneous use of kampo extracts and occidental medicines. *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **17**, 353-360 (1991).
 - 34) Tsukamoto A., Homma M., Kambayashi Y., Kizu J., Kohda Y. Influence of co-administered drugs on shakuyaku-kanzo-to induced hypokalemia. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **33**, 687-692 (2007).
 - 35) Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). XV. : Simultaneous Determination of Phenolic Constituents by High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 999-1004 (1989).
 - 36) Ohshima Y., Takahashi K., Hiraga Y., Shibata S., Studies on the evaluation of Chinese drug preparations -Determination of sennosides in the drug preparation containing

- rhubarb-. *Shoyakugaku Zasshi*, **37**, 217-222 (1983).
- 37) Sagara K., Oshima T., Yoshida T., Rapid and simple determination of sennoside A and B in Rhei Rhizoma by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **403**, 253-261 (1987).
 - 38) Momma N., Ueda J., Osawa K., Determination of sennoside A in oriental pharmaceutical decoctions containing Rhei Rhizoma by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi*, **112**, 272-275 (1992).
 - 39) Kobayashi T., Kohata M., Takemura N., Okamura N., Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of sennoside A metabolites in rat and mouse feces. *J.Trad.Med.*, **26**, 80-85 (2009).
 - 40) Okamura N., Abo N., Aono M., Eguchi T., Yoshi H., Ono Y., Yagi A., Variation of sennoside A content and purgative activity during preparation of rhubarb decoction. *J. Trad. Med.* **19**, 114-118 (2002).
 - 41) Miyawaki Y., Chin M., Yagi T., Yamauchi K., Kuwano S.: Purgative activity of Daio-kanzo-to in rats – Potentiating effect of glycyrrhiza on the purgative action of rhubarb. *J. Trad. Med.*, **10**, 97-103 (1993).
 - 42) Saito T., Mizutani F., Iwanaga Y., Morikawa K., Kato H. Laxative and anti-diarrheal activity of polycarbophil in mice and rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **89**, 133-141 (2002).
 - 43) Kisa K., Sasaki K., Yamauchi K., Kuwano S., *Planta Med.*, **42**, 302—303 (1981).
 - 44) Oshio H., Naruse Y., Tsukui M., *Chem.Pharm.Bull.*, **26**, 2458—2464 (1978).
 - 45) Nagashima K., Hisada T., Sato M., Mochizuki J. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1251-1262 (2003).
 - 46) Nagashima K., Hisada T., Mochizuki J. Analysis of intestinal microbiota using T-RFLP. *Journal of Intestinal Microbiology*, **28**, 155-164 (2014).
 - 47) Pérez-Cobas AE., Gosalbes MJ., Friedrichs A., Knecht H., Artacho A., Eismann K., Otto W., Rojo D., Bargiela R., von Bergen M., Neulinger SC., Däumer C., Heinsen FA., Latorre A., Barbas C., Seifert J., dos Santos VM., Ott SJ, Ferrer M., Moya A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*, **62**, 1591-1601 (2013).
 - 48) Panda S., El khader I., Casellas F., López Vivancos J., García Cors M., Santiago A., Cuenca S., Guarner F., Manichanh C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS ONE*, **9**, e95476 (2014).
 - 49) Ulger Toprak N., Celik C., Cakici O., Soyletir G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe*, **10**, 255-259 (2004).
 - 50) David LA., Maurice CF., Carmody RN., Gootenberg DB., Button JE., Wolfe BE., Ling

- AV., Devlin S., Varma Y., Fischbach MA., Biddinger SB., Dutton RJ., Turnbaugh PJ., Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, **505**, 559-563 (2014).
- 51) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031 (2006)
- 52) Ridaura VK., Faith JJ., Rey FE., Cheng J., Duncan AE., Kau AL., Griffin NW., Lombard V., Henrissat B., Bain JR., Muehlbauer MJ., Ilkayeva O., Semenkovich CF., Funai K., Hayashi DK., Lyle BJ., Martini MC., Ursell LK., Clemente JC., Treuren WV., Walters WA., Knight R., Newgard CB., Heath AC., Gordon JI., Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, **341**, 1241214 (2013)
- 53) Schulz MD., Atay C., Heringer J., Romrig FK., Schwitalla S., Aydin B., Ziegler PK., Varga J., Reindl W., Pommerenke C., Salinas-Riester G., Böck A., Alpert C., Blaut M., Polson SC., Brandl L., Kirchner T., Greten FR., Polson SW., Arkan MC., High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature*, **514**, 508-512 (2014).
- 54) Ramirez-Farias C., Slezak K., Fuller Z., Duncan A., Holtrop G., Louis P., Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.*, **101**, 541-550 (2009).
- 55) Loh G., Eberhard M., Brunner RM., Hennig U., Kuhla S., Kleessen B., Metges CC., Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *J. Nutr.*, **136**, 1198-1202 (2006).
- 56) Kleesen B., Sykura B., Zunft HJ., Blaut M., Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 1397-1402 (1997).
- 57) Cummings JH., Laxative abuse. *Gut*, **15**, 758-766 (1974).
- 58) Mantani N., Kogure T., Comparison of description of functional chronic constipation between kampo and western medicines. *Kampo Med*, **55**, 271-275 (2004).
- 59) Mantani N., Goto H., Fujinaga H., Shimada Y., Terasawa K., Four cases of chronic constipation treated with kami-shoyo-san. *Kampo Med*, **50**, 275-280 (1999).
- 60) Schiller LR., The therapy of constipation. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**, 749-763 (2001).
- 61) 宇野良治：漢方医学、**35**、258-265 (2011).
- 62) Barcenilla A., Pryde SE., Martin JC., Duncan SH., Stewart CS., Henderson C., Flint HJ., Phylogenetic Relationships of Butyrate-Producing Bacteria from the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1654-1661 (2000).
- 63) Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo TA., Nakato G., Takahashi D., Nakanishi Y., Uetake C., Kato K., Kato T., Takahashi M., Fukuda NN., Murakami S., Miyauchi E.,

- Hino S., Atarashi K., Onawa S., Fujimura Y., Lockett T., Clarke JM., Topping DL., Tomita M., Hori S., Ohara O., Morita T., Koseki H., Kikuchi J., Honda K., Hase K., Ohno H., Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. *Nature.*, **504**, 446-450 (2013).
- 64) Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Kurihara S., Sawaki E., Koga Y., Benno Y., Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports*, **2** (2012).
- 65) Yoshimoto S., Loo TM., Atarashi K., Kanda H., Sato S., Oyadomari S., Iwakura Y., Oshima K., Morita H., Hattori M., Honda K., Ishikawa Y., Hara E., Ohtani N., Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, **499**, 97-101 (2013).
- 66) Kasubuchi M., Hasegawa S., Hiramatsu T., Ichimura A., Kimura I., Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation. *Nutrients*, **7**, 2839-2849 (2015).
- 67) Fukuda S., Toh H., Hase K., Oshima K., Nakanishi Y., Yoshimura K., Tobe T., Clarke JM., Topping DL., Suzuki T., Taylor TD., Itoh K., Kikuchi J., Morita H., Hattori M., Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543-547 (2011).

謝 辞

終わりに臨み、本研究をまとめるにあたり終始懇切丁寧な御指導ならびに御鞭撻を賜りました福山大学薬学部 岡村信幸 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、御指導と御協力を賜りました福山大学薬学部 福長将仁 名誉教授、鶴田泰人 教授、森田哲生 教授、石津隆 教授、佐藤英治 教授、井上裕文 教授、田淵紀彦 准教授、松岡浩史 講師、堤広之 講師に心から感謝の意を表します。

そして、本研究に御協力と御援助を頂きました 松井絵未 修士をはじめとする漢方薬物解析学研究室の諸氏に深く感謝致します。

さらに、大黄剤ならびにセンノシド製剤と経口抗菌薬との併用調査にご協力頂きました岡山市立市民病院薬剤部 松山哲史先生、岡山赤十字病院薬剤部 森英樹先生、岡山労災病院薬剤部 徳山ことみ先生、国立病院機構福山医療センター薬剤科 角英先生、東住吉森本病院薬剤科 野村剛久先生、いぐちクリニック 井口敬一先生、藤田小児科内科医院 藤田仁志先生、山本クリニック 山本康博先生に心より感謝致します。