

# 大黃甘草湯と腸内細菌叢のクロストークに着目した 漢方薬の有用性の解明

高山 健人

## **Demonstration of usefulness of Kampo medicine focuses on the crosstalk between daiokanzoto and intestinal microbiota**

Kento Takayama

### **ABSTRACT**

Recently, many reports have suggested relationships between the intestinal microbiota and various diseases. The characteristic efficacy of Kampo medicine is predicted to involve not only the metabolism of the constituents of Kampo medicines by intestinal microbiota but also changes in the diversity and/or functions of intestinal microbiota caused by the Kampo constituents. Namely, the characteristic efficacy of Kampo medicines is a result of the crosstalk between their constituents and the intestinal microbiota. We designed to demonstrate a working hypothesis of the above-mentioned. We demonstrated daiokanzoto (DKT), is clinically effective for constipation, that the metabolic activity of Sennoside A (SA), the main purgative constituent of DKT, on gut microbiota was significantly accelerated when rhein 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) in rhubarb or liquiritin (LQ) in glycyrrhiza were co-administered with SA in these studies. Moreover, the purgative action of SA was significantly intensified when RG and LQ were co-administered orally to mice. These studies have revealed the useful interactions between the multiple constituents of DKT. In addition, these studies demonstrated that the RG in DKT changed the diversity and/or function of intestinal microbiota and thereby allowed DKT to metabolize SA. Taken together, our findings shed light on the efficacy of DKT, a Kampo medicine with multiple constituents, and that the crosstalk between Kampo medicine and gut microbiota.

### 1. はじめに

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、2018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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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、治療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。しかし、漢方薬は複数の生薬を組み合わせて処方が構成される複合成分系薬物であることから、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り、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を極めている。

大黃は『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。大黃は大腸刺激性下剤に分類され、西洋医薬品に劣らない強い下剤作用を有する。大黃を含む漢方薬の基本処方である大黃甘草湯は大黃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<sup>3,4)</sup>。大黃の主要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黃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、 $\beta$ 結合のため消化酵素ではほとんど分解されず、消化管下部で腸内細菌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 $\beta$ -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（Fig. 1）<sup>5-7)</sup>。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細菌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。

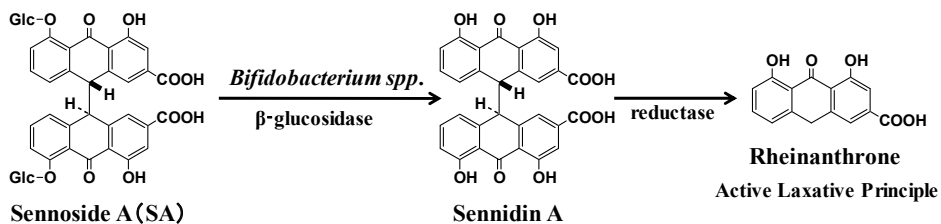


Fig. 1. Metabolism of Sennoside A by Intestinal Microbiota

ヒトの腸管は小腸と大腸からなり、その長さは7～9mで断面積は約200m<sup>2</sup>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細菌叢を形成しており、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、腸内細菌叢は生体を構成する1つの臓器にも例えられている。腸内細菌叢は、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、腸内細菌叢は、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<sup>8,9)</sup>。そのため、腸内細菌叢は生体にとって必要不可欠な存在であり、生体と腸内細菌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細菌叢の構成異常（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関与することが明らかになってきている<sup>10-19)</sup>。

腸内細菌叢はさまざまな疾病の発症との直接的な関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、腸内細菌叢により漢方薬成分が代謝変換されるだけでなく、漢方薬成分が腸内細菌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. 2）。すなわち、漢方薬成分と腸内細菌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。

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、疾病の発症と腸内細菌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細菌叢の構成変化やそれらが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、漢方薬と腸内細菌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。

本総説では、腸内細菌叢の構成や機能変化を介した複合成分系薬物としての大黃甘草湯の有用性および腸内細菌叢の dysbiosis が及ぼす大黃甘草湯と腸内細菌叢のクロストークへの影響について述べる。

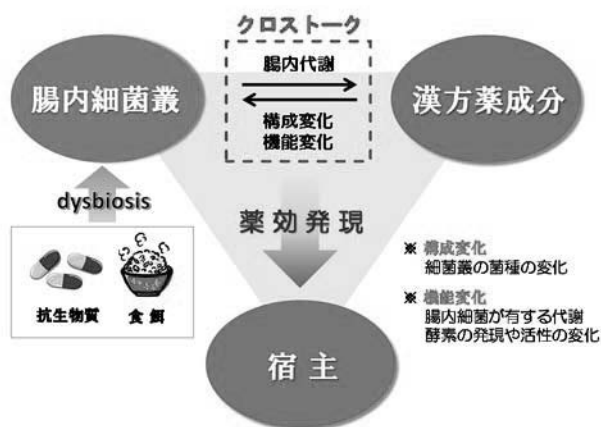
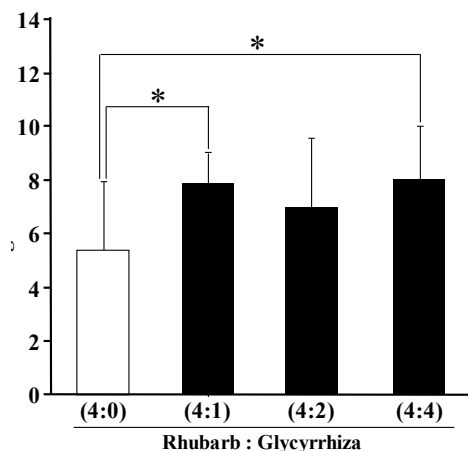


Fig. 2. Working Hypothesis to the Crosstalk between the Constituent of Kampo Medicines and Intestinal Microbiota

## 2. 複合成分系薬物としての大黄甘草湯の有用性の解明

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学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、人体への作用を發揮するにあたり重要な意味を持つと考えられる。2018年現在、148処方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<sup>20)</sup>。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、甘草の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. 3)。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甘草の配合により増強していることが示唆されるが、大黄甘草湯の主要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。

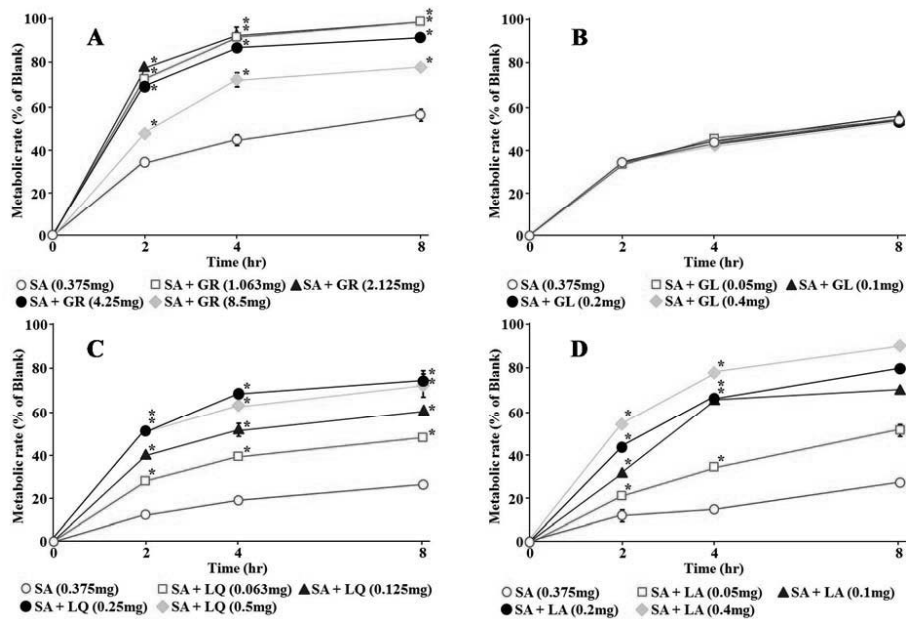


**Fig. 3. Effects of Daiokanzoto and Rhubarb on Purgative Action**

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

センノシドAの腸内代謝における甘草および甘草成分の影響を検討するために、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. 4A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の代謝を促進した。そこで、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、大黃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。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 代謝に有意な変化は認めなかった (Fig. 4B)。一方で、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. 4C)。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. 4D)。

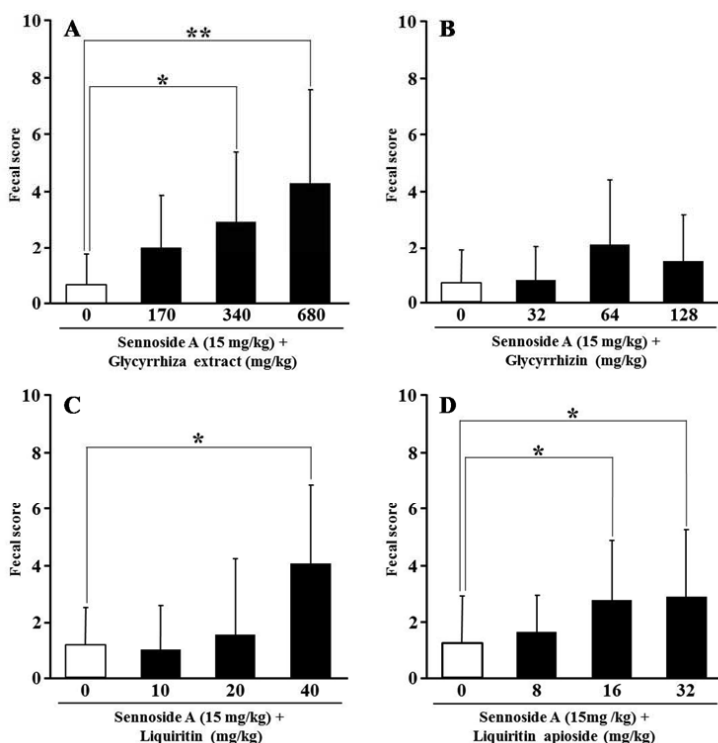


**Fig. 4. Accelerating Effects of Glycyrrhiza (A), Glycyrrhizin (B), Liquilitin (C) and Liquilitin apioside (D) on Metabolism of Sennoside A (SA)**

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

次にセンノシド 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を用いて検討した。下痢の程度は、斉藤らの方法<sup>21)</sup>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、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. 5A)。そこでグリチルリチン、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、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. 5B)。しかし、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) で下痢活性の有意な増強を示した (Fig. 5C)。リクイリチンアピオシドも同様に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) で有意な下剤活性の増強を示した (Fig. 5D)。



**Fig. 5. Effects of Glycyrrhiza (A), Glycyrrhizin (B), Liquiritin (C) and Liquiritin apioside (D) on Purgative Action of Sennoside A**

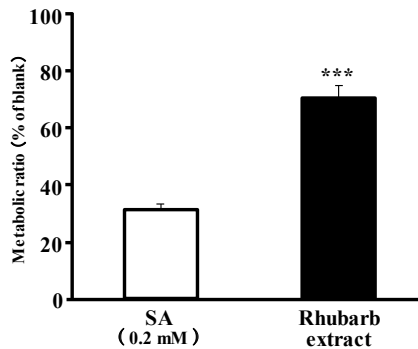
Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 10 – 12 mice. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, significant difference from control (0 mg) (Steel's test).

以上の結果から、大黄甘草湯の下剤活性は、センノシド A が甘草によって腸内代謝が促進されることにより亢進することが明らかとなった。また、その促進作用に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関与していることを解明し、大黄甘草湯における甘草の配合意義を証明した。

大黄に関しては含有する個々の成分の薬理作用は多く解明されており、特に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 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<sup>22)</sup>。また、大



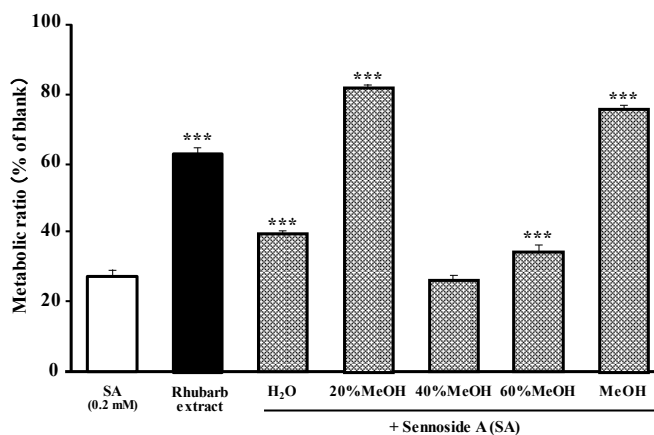
黄にはセンノシド A 以外にも弱いながら下剤活性を示す成分が多く含まれているが<sup>23)</sup>、センノシド A の腸内代謝や下剤活性に与える大黄に含まれる他成分の影響に関しては報告されていない。そこで本研究では、センノシド A の腸内代謝活性ならびに下剤活性に及ぼす大黄成分の影響について検討した。



**Fig. 6. 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).

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. 6)。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、大黄の中にセンノシド 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、大黄 (100g) を熱水抽出し、抽出液を DIAION 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。

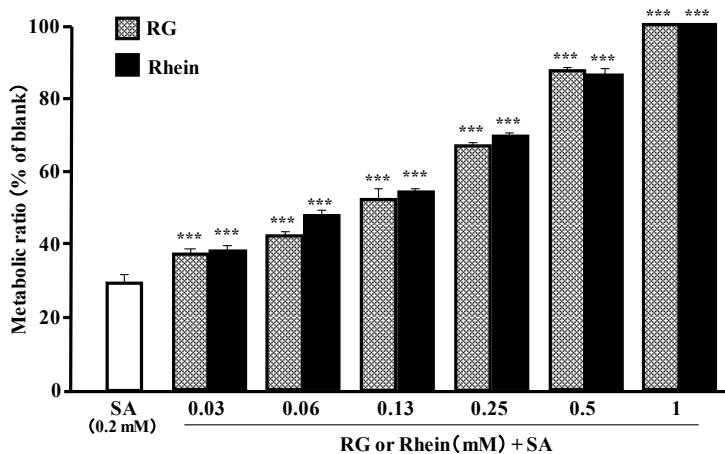


**Fig. 7. Effect of Fractions Eluted from Rhubarb on Metabolism of Sennoside A (SA)**

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

それぞれの大黃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) の添加により強いセンノシド A 代謝活性を示した (Fig. 7)。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 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*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) と同定した。MeOH フラクシヨンの 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。

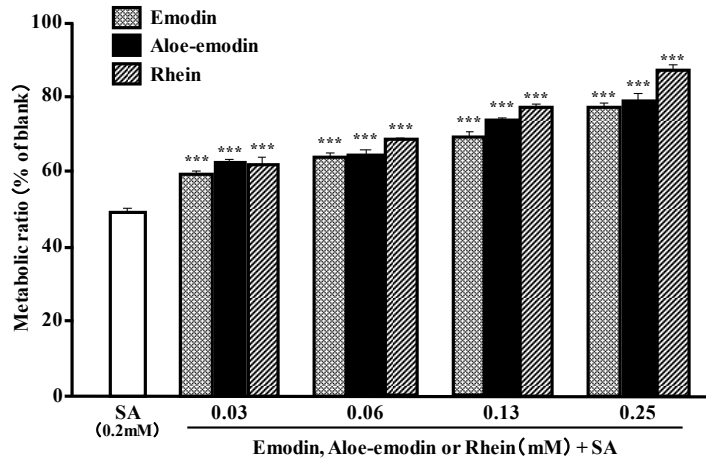
大黃から単離精製した RG がセンノシド A 代謝を促進するか検討したところ、RG はセンノシド A 代謝を濃度依存的に有意な促進を示した (Fig. 8)。RG はレインをアグリコンとするグルコースの配糖体である。そこで、レインについて同様に検討したところ、濃度依存的にセンノシド A 代謝を有意に促進した。この結果から、RG のセンノシド A 代謝促進作用は、RG のアグリコンであるレインに起因することが明らかとなった。また、大黃に含まれる RG およびレインの濃度はセンノシド A (0.2mM) に対してそれぞれ 1mM、0.25mM であり、大黃の薬効発現に強く関与していることが示唆された。



**Fig. 8. Effect of Rhein 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) and Rhein on Metabolism of Senoside 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、アロエエモジン共にセンノシド A 代謝を有意に促進した (Fig. 9)。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物質の関与を証明した。

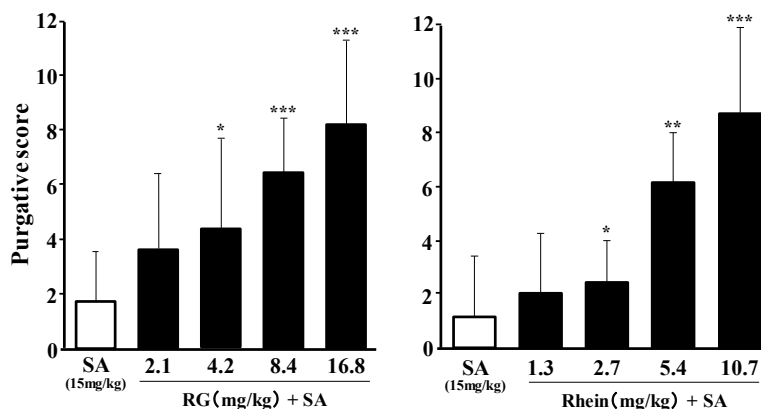




**Fig. 9. Effect of Emodin, Aloe-emodin and Rhein on Metabolism of Sennoside A (SA)**

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

次にRGによるセンノシドAに及ぼす下剤活性変化について検討した。センノシドAと同様にアントラキノン骨格を有しているRGやレインは、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. 10)。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。



**Fig. 10. Effect of Rhein 8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) and Rhein on Purgative Action of Sennoside A (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 (Steel's test).

以上のことから、大黃に含まれるRGやレインなどアントラキノン骨格を有する物質がセンノシド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。

### 3. 抗菌薬が及ぼす腸内細菌叢とのクロストークの変化に適應する大黃甘草湯の有用性の解明

現代医療において、漢方薬は単独で使用されることよりも西洋医薬品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<sup>24-28</sup>。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、腸内細菌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細菌叢を破綻 (dysbiosis) させる薬物との併用が問題視されている<sup>24, 25</sup>。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. 1)、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及びセンノシド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. 1. Combination Use of Kampo medicine and Antibiotics

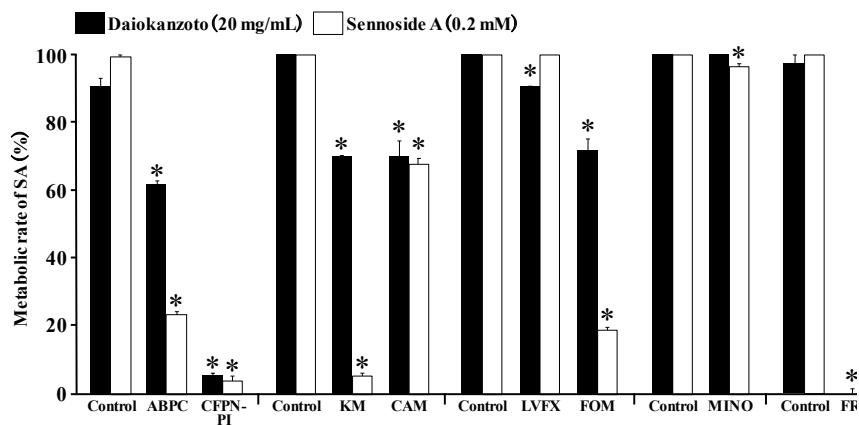
	Peni	Ceph	Amin	Macr	Pyri	Tetr	Fosf	Pene
Senoside-drugs	○	○	○	○	○	○	○	
Daiokanzoto		○		○	○			
Tokakujokito	○			○	○		○	
Bofutsushosan					○			
Other daio-drugs	○	○		○	○		○	

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

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. 11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。

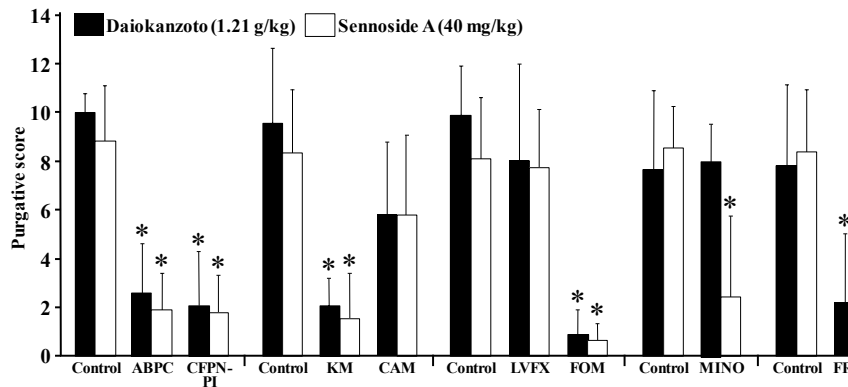
大黃甘草湯の下剤活性に及ぼす各種抗菌薬の影響を評価するため、前述の抗菌薬を単回経口投与した 19 時間後に同程度の下痢スコアを示す大黃甘草湯 (1.21g/kg) ならびにセンノシド A (40mg/kg) を単回経口投与した。



**Fig. 11. Influence of Co-administered Antibiotics on Metabolism of Sennoside A**

ABPC: ampicillin, CFPN-PI: cefcapene pivoxil, KM: kanamycin, CAM: clarithromycin, LVFX: levofloxacin, FOM: fosfomicin, MINO: minocycline, FRPM: faropenem. Data are expressed as the  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$ , significant vs. control (non-antibiotics) by Dunnett's test ( $n = 3-6$ )

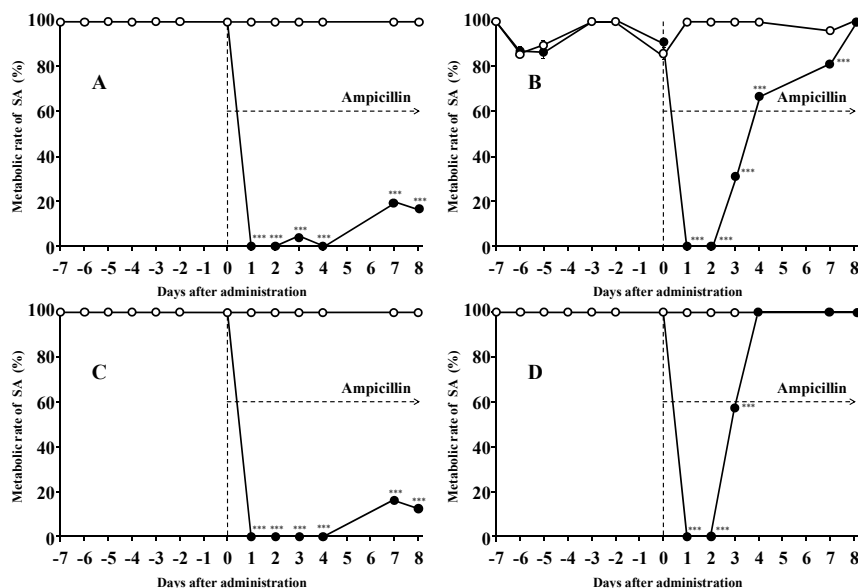
下剤活性評価は、試料溶液投与後、1 時間毎 8 時間にわたり便の状態を観察し、各個体における 8 時間の糞便スコアの合計の平均値及び標準偏差を算出し各群の下痢スコアとした。結果を Fig. 12 に示す。アンピシリン、セフカペンピボキシル、カナマイシン、ホスホマイシン、ファロペネムは大黃甘草湯とセンノシド A のいずれにおいても有意に下痢スコアが低下しており、これらの抗菌薬は大黃甘草湯とセンノシド A の下剤活性を顕著に抑制した。一方、クラリスロマイシン、レボフロキサシンは下剤活性にほとんど影響を与えなかった。ミノサイクリンはセンノシド A 単独では顕著に下剤活性を抑制したが、大黃甘草湯では抑制を示さず、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. 12. 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: fosfomicin, MINO: minocycline, FRPM: faropenem. Data are expressed as the  $\pm$  S.D.. \* $p < 0.05$ , significant vs. control (non-antibiotics) by Steel's test ( $n = 6-14$ ).

次にアンピシリン継続投与下における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への影響を評価し、アンピシリンの投与により破綻した腸内細菌叢の変化を terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) を用いて解析した。

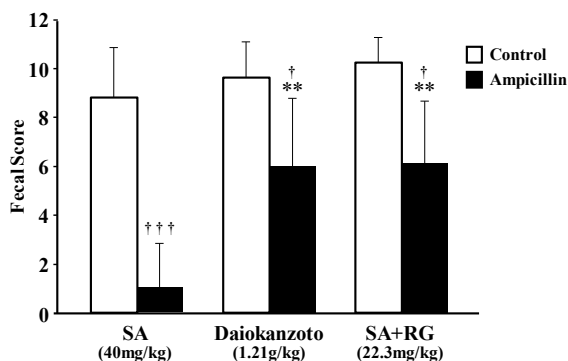
アンピシリン継続投与下における大黄甘草湯などのセンノシド A 腸内代謝変化を検討するために、マウス糞便を採取して腸内代謝実験を実施した。代謝時間を 4 時間に設定し、大黄甘草湯 (20mg/mL) やセンノシド A 単独 (0.2mM)、RG (1mM) および LQ (1mM) をセンノシド A に添加した、それぞれのセンノシド A 代謝変化の安定性を確認した。その後、アンピシリン (25mg/kg/day) を 8 日間投与して、その間のセンノシド A 代謝変化を観察した。センノシド A 単独のセンノシド A 代謝はアンピシリン投与翌日からアンピシリン無処置の群と比較して有意に抑制され続けた (Fig. 13A)。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. 13B)。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細菌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. 13C)。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. 13D)。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細菌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。



**Fig. 13. Activating Effect of Rhein 8-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside (RG) on Metabolism of Sennoside A Inhibited by Ampicillin**

(A) Sennoside A ; (B) Daiokanzoto ; (C) Sennoside A + Liquiritin ; (D) Sennoside A + Rhein 8-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 samples with (●) or without (○) Ampicillin. Statistical significance (\*\* $p < 0.001$ ) was examined by Student's *t*-test. minocycline, FRPM: faropenem. Data are expressed as the  $\pm$  S.D.. \* $p < 0.05$ , significant vs. control (non-antibiotics) by Steel's test ( $n = 6-14$ ).

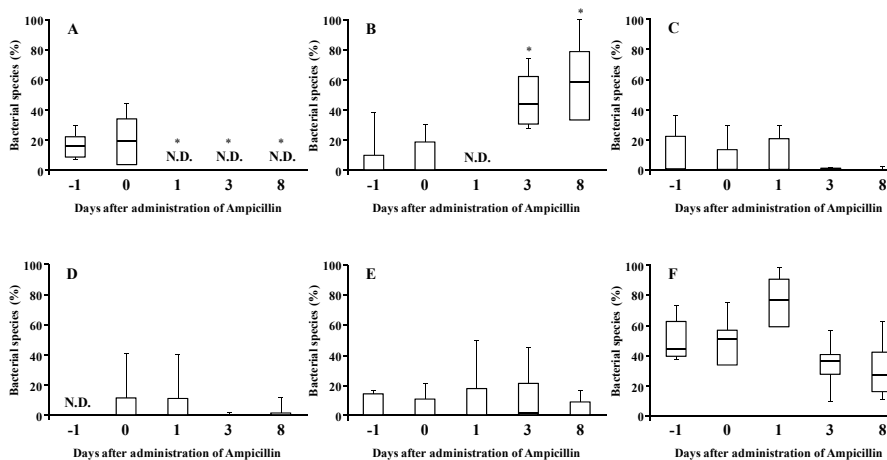
アンピシリン投与8日目にマウスが正常便を排泄していることを確認した上で、同程度の下剤活性を示す大黃甘草湯 (1.21g/kg)、センノシド A (40mg/kg) そしてセンノシド A + RG (22.3mg/kg) を単回経口投与した。ただし、RG は大黃甘草湯に含まれる同量に設定するとそれ単独で弱い下剤活性を有するため、下剤活性を全く示さない RG 濃度を予試験で確認した上で、上記 RG 投与濃度を決定し、センノシド A と同時経口投与した。アンピシリンで処置したマウスは無処置のコントロールと比較して、いずれの投与群もセンノシド A 下剤活性が有意に抑制した (Fig. 14)。しかし、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. 14. Activating Effect of Rhein 8-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside (RG) on Purgative Activity of Sennoside A Inhibited by Ampicillin**

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

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することから、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細菌叢の変化を観察した。既に報告されている長島法<sup>29)</sup>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. 15)、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、大黄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。



**Fig. 15. 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 ( $n = 10$ ).

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、大黄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 で腸内細菌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、大黄甘草湯や 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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>30-32)</sup>。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、大黄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、大黄甘草湯に含まれる 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。現在、バクテロイデスの $\beta$ -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。

#### 4. 食餌が及ぼす腸内細菌叢とのクロストークの変化に適應する大黃甘草湯の有用性の解明

腸内細菌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<sup>33-36</sup>、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. 16 に示す実験計画に基づいて、高炭水化物飼料 (Tab. 2) 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、その間の大黃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、大黃甘草湯に含まれる rhein 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (RG) やリクイリチン (LQ) などのセンノシドA代謝促進物質の作用発現の変化についても検討した。

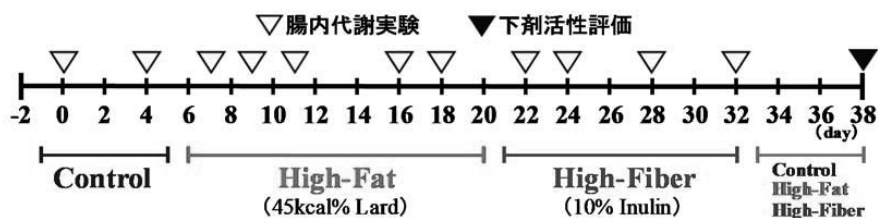


Fig. 16. Experimental Design

Tab. 2. Composition of the Diets

Product	High-Carbohydrate (Control, D12450H)		High-Fat (D12451)		High-Fiber (D14053101)	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%
<b>Carbohydrate</b>						
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
<b>Protein</b>						
Casein	200	800	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12	3	12
<b>Fat</b>						
Soybean Oil	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	177.5	1598	20	180
<b>Fiber</b>						
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).

食餌が及ぼす大黃甘草湯の腸内代謝に与える影響を評価するために、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に添加した、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. 17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)。

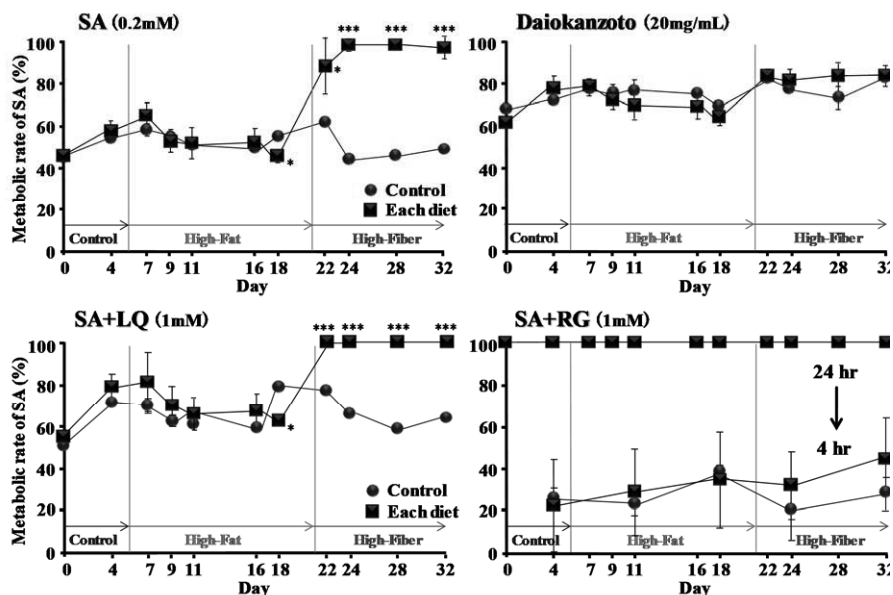


Fig. 17. Influence of Diets on Metabolic Activity of Sennoside A (SA)

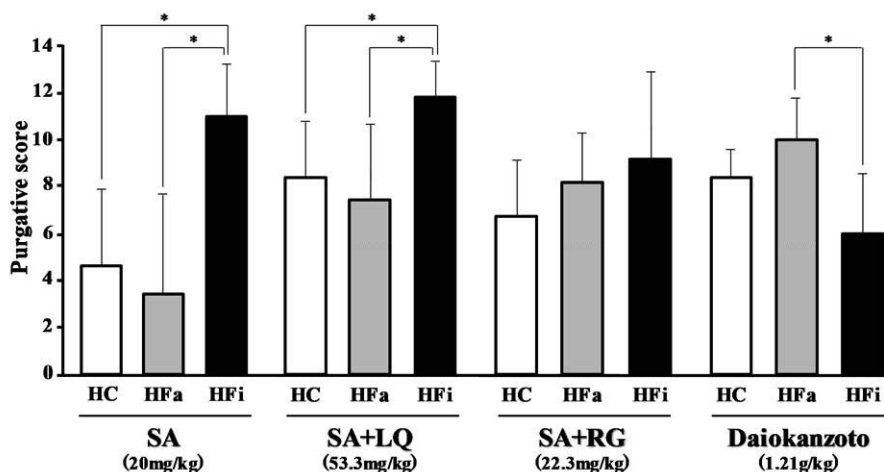
Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 samples. Statistical significance ( $*p<0.05$ ,  $***p<0.001$ ) was examined by Student's *t*-test.

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。

次に食餌が及ぼす大黃甘草湯の下剤活性に与える影響を検討するために、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. 18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<sup>37-39)</sup>、高繊維飼料摂取によりビフィズ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。



**Fig. 18. Influence of Diets on Purgative Action of Senno-side A (SA)**

HC : High-Carbohydrate Diet, HFa : High-Fat Diet, HFi : 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 ( $*p < 0.05$ ).

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通を改善する効果が認められている<sup>37-39)</sup>。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。

腸内細菌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細菌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 日で腸内細菌叢が変化するという報告もなされている<sup>33)</sup>。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。

## 5. まとめ

近年では腸内細菌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<sup>10-19)</sup>、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<sup>40-43)</sup>。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<sup>42)</sup>。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<sup>43)</sup>。

このような報告から、腸内細菌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細菌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、漢方薬成分と腸内細菌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細菌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細菌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 による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が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。

本総説で述べた結果について、今後も科学的に詳細な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。

## 謝辞

本研究を進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。

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) 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).
- 4) 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).
- 5) Hattori M., Namba T., Akao T., Kobashi K., Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Pharmacology*, **36**, 172-179 (1988).
- 6) Kobashi K., Nishimura T., Kusaka M., Hattori M., Namba T.: Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Med.*, **40**, 225-236 (1980).
- 7) 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).
- 8) Mitsuoka, T., Biosci. Microbiota. *Food Health*, **33**, 99-116 (2014).
- 9) 神谷茂、大崎敬子：医学のあゆみ、**251**、5-11 (2014).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Rosenfeldt V., Benfeldt E., Nielsen SD., Michaelsen KF., Jeppesen DL., Valerius NH., Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol*, **111**, 389-395 (2003).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).

- 16) 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).
- 17) Foster JA., McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.*, **36**, 305-312 (2013).
- 18) 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).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) Kisa K., Sasaki K., Yamauchi K., Kuwano S., *Planta Med.*, **42**, 302-303 (1981).
- 23) Oshio H., Naruse Y., Tsukui M., *Chem.Pharm.Bull.*, **26**, 2458-2464 (1978).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) Nagashima K., Hisada T., Mochizuki J. Analysis of intestinal microbiota using T-RFLP. *Journal of Intestinal Microbiology*, **28**, 155-164 (2014).
- 30) 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).
- 31) 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).
  - 32) 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).
  - 33) 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).
  - 34) 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)
  - 35) 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)
  - 36) 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).
  - 37) 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).
  - 38) 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).
  - 39) 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).
  - 40) 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).
  - 41) 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).
- 42) 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).
- 43) 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).