

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14942

研究課題名(和文)腸内細菌叢の変化を介した緩下薬の下剤活性制御に関する研究

研究課題名(英文)The state of gut microbiota determines the effect of laxatives

研究代表者

高山 健人(TAKAYAMA, Kento)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：60568559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：大黃甘草湯の下剤効果の個人差は、食事による腸内細菌叢の違いが影響を及ぼすと考えられたことから、下剤効果と腸内細菌叢の変化との関連性について検討を行った。その結果、便秘症患者と腸内細菌叢が類似している高炭水化物および高脂肪飼料摂取下の腸内細菌叢において大黃甘草湯の下剤効果は促進され、その効果に大黃成分である rhein 8-O-β-D-glucopyranoside が関与することを明らかにした。また、高繊維飼料摂取下の腸内細菌叢において大黃甘草湯の下剤効果は反対に抑制された。本研究から、食事による腸内細菌叢の違いが緩下薬のレスポンスとノンレスポンスを生み出す一因になっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬の効果には個人差があることがよく知られているが、腸内細菌叢の違いが薬の効果にどのような影響を及ぼすのか探求する研究はほとんど行われていない。本研究では、腸内細菌との関わりが深い漢方薬について、緩下薬として頻用される大黃甘草湯の下剤効果と食習慣の関連性を明らかにすることができた。また、本研究から食習慣や緩下薬の違いによって便秘症の改善は異なり、それは腸内細菌叢の変化を介することが明らかになったことから、実社会・実臨床に反映できる興味深い知見が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Daiokanzoto (da-huang-gan-cao-tang: DKT) is often used clinically to treat constipation. It is widely accepted that the state of the gut microbiota is influenced by dietary habits. Therefore, it hypothesized that dietary habits may alter gut microbiota, influencing the purgative activity of DKT, and thereby categorizing an individual as a responder or non-responder to DKT treatment. In this study, to assess the relationship between laxatives and gut microbiota, it was monitored the gut microbiota before and after administering laxatives. In the mice fed a high-carbohydrate and high-fat diet, DKT exerted significantly higher purgative activity, and rhein 8-O-β-D-glucopyranoside contributed to this activity. In contrast, DKT effects were significantly suppressed by a high-fiber diet. These results demonstrate that diet-induced differences in gut microbiota determined the effect of DKT.

研究分野：漢方薬物学、生薬学

キーワード：大黃甘草湯 センノシド 腸内細菌叢 大黃 アントラキノン 食習慣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

便秘は極めてありふれた症状のひとつであり、体調変化を最も実感しやすい重要な健康バロメーターである。日本における便秘の有訴者数は男性よりも女性に多く、高齢になるにつれて性差なく有訴者数は増加している [1]。便秘症の治療に頻用される大腸刺激性下剤、特にセンノシド類は強力な下剤効果を有している。その下剤効果はセンノシド類が腸内細菌の有するグルコシダーゼにより代謝変換され効果本体のレインアンスロンになることで発現する [2-4]。センノシド類は漢方薬である大黃甘草湯の主要成分でもあり、その有効性は二重盲検臨床比較試験においても認められている [5, 6]。大黃甘草湯は大黃と甘草の2つの生薬から構成される。申請者はこれまでに大黃に含まれる rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside (RG) や甘草に含まれるリクイリチン (LQ) がセンノシド A (SA) の腸内代謝を促進することで下剤効果を高めることを証明しており、センノシド類のような単一成分にはない大黃甘草湯の複合成分系薬物としての有用性を立証している [7-10]。

2. 研究の目的

ある病気に対して薬剤を投与したときに、効果を示す人(レスポnder)と効果を示さない人(ノンレスポnder)が存在し、患者の応答性は様々である。センノシド類や大黃甘草湯などの緩下薬も同様で、下剤効果が発現しやすいレスポnderと発現しにくいノンレスポnderが存在し、下剤効果に個人差が認められる。一般的に漢方医学において、大黃甘草湯は比較的体力のある食欲旺盛な人の便秘症に適応するとされているが、科学的には主要成分である SA が腸内代謝を介して作用を発現するプロドラッグであることから、その下剤効果の発現において、大黃甘草湯のレスポnderやノンレスポnderと腸内細菌叢の違いに密接な関係性のあることが推測された。

また、Lawrence らは腸内細菌叢の多様性や腸内細菌叢の有する代謝酵素の遺伝子発現が食餌の内容により変化することを明らかにしていることから [11]、薬効発現の個人差を生む原因の1つとして、食餌の違いによる腸内細菌叢の構造変化が起因しているのではないかと申請者は考えた。

そこで本研究では、飼料組成の異なる3種の食餌をマウスに給餌して腸内細菌叢を変化させた上で、大黃甘草湯や SA を5日間にわたり連日経口投与し、下剤効果の変化と投与前後の腸内細菌叢の菌種や菌叢構造など多様性変化を解析することで、食餌による腸内細菌叢の変化が及ぼす緩下薬の下剤効果への影響について検討を行った。

3. 研究の方法

本研究では緩下薬のレスポnder、ノンレスポnderを作製するために、高炭水化物飼料をベースに 45kcal%動物性脂肪を添加した高脂肪飼料、水溶性食物繊維であるイヌリンを 10%添加した高繊維飼料の3種の飼料を C57BL/6N マウス(4週齢)に4週間給餌させることで腸内細菌叢を変化させた。その上で、大黃甘草湯や SA などを5日間にわたり経口投与し、下記に記す下剤効果の評価および投与前後の腸内細菌叢の変化についてメタ 16S 解析を行った。

[下剤効果の評価] C57BL/6N 雄性マウスに経口投与後1時間毎に10時間にわたり下剤効果の評価した。下痢の程度は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、糞便の状態を3段階にスコア化して各個体での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。

[腸内細菌叢のメタ 16S 解析] 腸内細菌叢の解析は、(株)生物技研による次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析で評価した。本方法で得られたデータから投与前後の菌種の変化や腸内細菌叢の菌叢構造解析を行うことで解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 食餌の違いは緩下薬の下剤効果に影響を及ぼす

緩下薬のレスポnder、ノンレスポnderを作製するため、高炭水化物、高脂肪および高繊維飼料の3種の飼料をマウスに給餌して腸内細菌叢を変化させた。その上で、大黃甘草湯や SA などを5日間にわたり経口投与を行い、下剤効果の評価した。その結果、高炭水化物飼料摂取下において SA 単独の下剤効果は有意に抑制された一方で、大黃甘草湯の下剤効果は有意に促進した(図 1A)。そこで、この相違に關与する大黃甘草湯成分を明らかにするために、大黃甘草湯の下剤効果促進成分である RG および LQ について SA に添加して下剤効果の評価した。その結果、RG は大黃甘草湯と同様に SA の下剤効果を有意に促進したことから、大黃甘草湯の下剤効果促進作用に RG が關与することが明らかとなった(図 1A)。

高脂肪飼料摂取下においては、SA 単独の下剤効果は変化を認めなかったものの、大黃甘草湯の下剤効果は高炭水化物飼料摂取下と同様に有意な下剤効果の促進を認め、この作用にも RG の關与が認められた(図 1B)。

高繊維飼料摂取下においては、SA 単独の下剤効果は5日間を通して高い下剤効果が維持された一方で、大黃甘草湯の下剤効果は有意に抑制された(図 1C)。この抑制作用に RG や LQ は關与しておらず、他の大黃甘草湯成分の關与が推察された。一般的に食物繊維の摂取により、腸内環境は整えられ便通は改善することから、そのような状態下で大黃甘草湯の下剤効果が抑制される現象は漢方医学的に考えて大変興味深い結果である。この抑制作用は大黃に起因する作

用であることが明らかとなり、現在、どの大黄成分による作用なのか成分分画を進め詳細な検討を行っている。

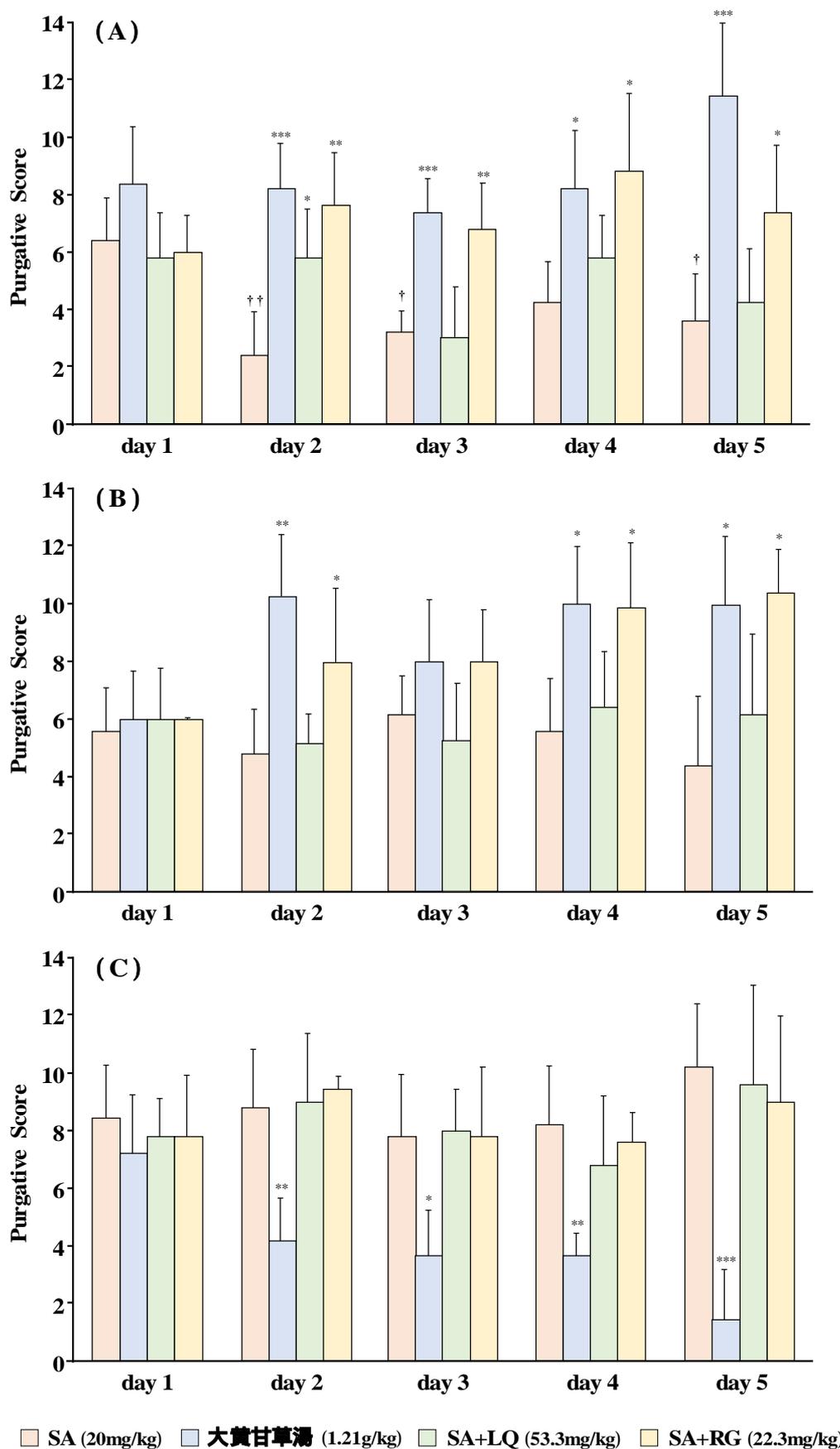


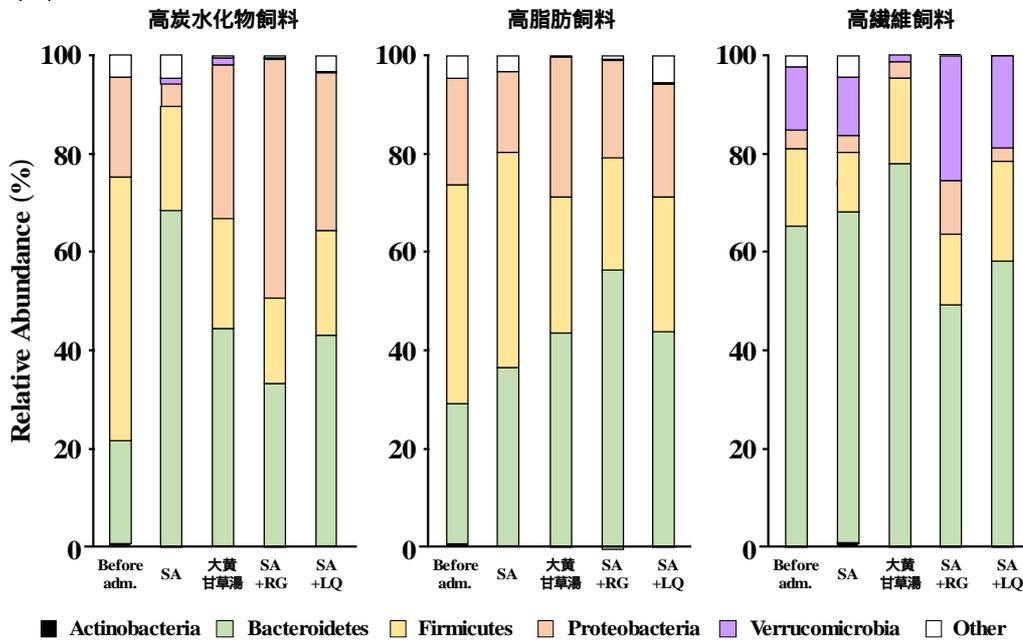
図1 . 食餌の違いが及ぼす緩下薬の下剤効果に与える影響

Data points are presented as the mean \pm standard deviation (SD) derived from five mice; * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, a statistically significant difference in relation to sennoside A (SA) using Bonferroni's multiple comparison test; † p < 0.05 and †† p < 0.01, significantly different from SA on day 1 using Bonferroni's multiple comparison test.

(2) 大黄甘草湯は便秘症の腸内細菌叢の状態下で下剤効果を発揮する

3種の飼料を給餌させた緩下薬投与前の腸内細菌叢を比較した結果、高炭水化物および高脂肪飼料摂取下における腸内細菌叢は、高繊維飼料摂取下と比較して Firmicutes の存在比が多数を占めた(図2A)。Zhuらの報告[12]によると、便秘症患者の腸内細菌叢は非便秘症患者と比較して、Bacteroidetes は有意に減少し Firmicutes は増加傾向にあることを報告していることから、本研究における高炭水化物および高脂肪飼料摂取下の腸内細菌叢は、便秘症患者の腸内細菌叢と類似していると考えられた。大黄甘草湯やSAを投与した後の腸内細菌叢の変化を解析したところ、いずれの投与においても Bacteroidetes の存在比は増加した(図2A)。ファミリーレベルにおける解析では、硬い便で多いとされる Ruminococcaceae [13]はSA投与ではほとんど変化しなかったが、大黄甘草湯投与により大きく減少した(図2B)。また、Enterobacteriaceae は、高炭水化物飼料摂取下において下剤効果が抑制されたSA単独投与ではほとんど変化を認めなかったが、大黄甘草湯投与により100倍近く増加した(図2B)。一般的に Enterobacteriaceae には下痢や炎症を引き起こす代表的な病原微生物も含まれるが、本研究ではそのような菌種の存在は確認されず、unclassified Enterobacteriaceae などが増加していた。以上の結果から、SAや大黄甘草湯の下剤効果は食餌による腸内細菌叢の変化に左右され、特に大黄甘草湯は便秘症の腸内細菌叢に類似した状態下において下剤効果を発揮することが明らかとなった。

(A)



(B)

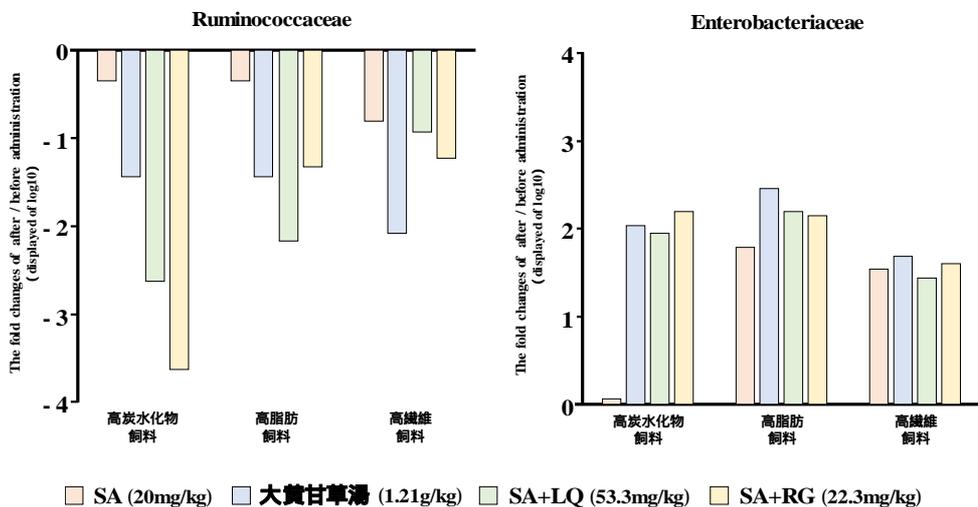


図2. 緩下薬投与による腸内細菌叢の変化

(A) 腸内細菌叢の門レベルの変化 (B) Ruminococcaceae および Enterobacteriaceae の変化

本研究から SA や大黃甘草湯のレスポonder、ノンレスポonderは食餌による腸内細菌叢の状態により決定づけられ、特に大黃甘草湯は RG の作用によりレスポonderに対して下剤効果をより高めることが明らかとなった。臨床では、SA は西洋医学的な診断基準に基づいて処方される。しかし、大黃甘草湯は漢方医学的な診断基準、すなわち漢方薬の適応となる症状(証)に基づいて処方が決定される。本研究から食餌による腸内細菌叢の違いは漢方薬の適応となる証を決める一因になっている可能性を強く示唆した。漢方医学において、治癒は漢方薬など医術だけで臨むものではなく、普段の食習慣など生活習慣、すなわち「養生」が重要であるとされる。これにより腸内細菌叢は決定づけられ、体質だけではなく薬の効き方まで左右している可能性が本研究から明らかとなった。

<引用文献>

1. Ministry of Health, Labor and Welfare. 2016 Comprehensive Survey of Living Conditions. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa16/index.html> (2017).
2. 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).
3. Hattori M., Namba T., Akao T., Kobashi, K. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Pharmacol.* **36**, 172-179 (1988).
4. Kobashi K., Nishimura T., Kusaka M., Hattori M., Namba, T. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Med.* **40**, 225-236 (1980).
5. Miyoshi A., Masamune O., Fukutomi H., Mori H., Miwa T., Kojima K., Aono M., Nakajima M. The clinical effect of TSUMURA Daio-kanzo-to extract granules for ethical use (TJ-84) by double blind test against the constipation. *Gastroenterol.* **18**, 299-312 (1994).
6. Miyoshi A., Masamune O., Fukutomi H., Mori H., Miwa T., Kojima K., Aono M., Nakajima M. The clinical effect of TSUMURA Daio-kanzo-to extract granules for ethical use (TJ-84) against the constipation based on the new standard. *Syokkakika.* **22**, 314-328 (1996).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. David LA., Maurice CF., Carmody RN., Gootenberg DB., Button JE., Wolfe BE., Ling AV., Devlin AS., Varma Y., Fischbach MA., Biddinger SB., Dutton RJ., Turnbaugh PJ., *Nature*, **505**, 559-563 (2014).
12. Zhu L., Liu W., Alkhouri R., Baker RD., Bard JE., Quigley EM., Baker SS. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiol. Genomics.* **46**, 679-686 (2014).
13. Vandeputte D., Falony G., Vieira-Silva S., Tito RY., Joossens M., Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut.* **65**, 57-62 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayama Kento, Takahara Chiho, Tabuchi Norihiko, Okamura Nobuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Daiokanzoto (Da-Huang-Gan-Cao-Tang) is an effective laxative in gut microbiota associated with constipation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40278-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高山 健人
2. 発表標題 生体のバランスに寄与する漢方薬と腸内細菌叢のクロストーク
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 健人、篠原 沙緒里、高原 千穂、宗廣 春香、山中 清平、田淵 紀彦、岡村 信幸
2. 発表標題 大黃甘草湯のrhein 8-O-β-D-glucopyranosideは腸内細菌叢の変化を介して下剤活性を制御する
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 健人、川村 彩佳、福島 悠介、高原 千穂、田淵 紀彦、岡村 信幸
2. 発表標題 食物繊維摂取下における大黃甘草湯の下剤活性抑制に関わる成分の探索
3. 学会等名 第53回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高原 千穂、高山 健人、手嶋 美緒、小早川 玲奈、桑田 侑佳、川小根 駿、田淵 紀彦、岡村 信幸
2. 発表標題 食餌の違いはセンノシドAの腸内代謝に影響を及ぼす
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福山大学薬学部 漢方薬物解析学研究室ホームページ http://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/KAMPO/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考