

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02374

研究課題名(和文)漢方用薬「神麹」の薬効成分の同定

研究課題名(英文) Investigations of medicinal properties of "Shinkiku", a fermented herbal drug

研究代表者

神戸 果優(奥津果優)(Kambe, Kayu)

鹿児島大学・農学部・特任助教

研究者番号：60578433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬用の麹である神麹は、日本の医療用漢方製剤に配合されているにも関わらず、入手先によって品質が大きく異なることが問題視されている。そこで、神麹の品質安定化のためには薬効成分を指標とした品質管理が必要であると考え、神麹の特徴である微生物発酵と植物添加に着目した神麹の薬効成分の同定を試みた。その結果、微生物発酵を経ることにより、神麹の消化酵素活性が著しく上昇すると共に香気成分も大きく変化することが明らかとなった。さらに植物を添加することで生理活性を有するセスキテルペン類やフラボノイド類が増加することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神麹は医薬品として利用されているにも関わらず、現在のところ品質管理の指標となる成分等がなく、偽品鑑別ができない深刻な状況である。本研究では微生物発酵並びに植物添加によって神麹中で生成・増加する成分を明らかにしたが、これらは微生物発酵や植物添加といった神麹の特徴的な工程を経ている証明となる成分である。よって本研究成果により得られた知見は、今後神麹の品質管理にすぐにも応用することができ、神麹の品質安定化の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Massa medicata fermentata (MMF) is a traditional crude drug used in Japanese medical Kampo preparations. The quality of MMF varied greatly depending on the manufacturers. To stabilize the quality of MMF, it is necessary to control the quality of MMF using its medicinal properties as an indicator. Thus, I investigated the medicinal components of MMF, focused on the microbial fermentation and herb addition in MMF. As result, the digestive enzyme activities of MMF increased remarkably and the volatiles also changed significantly during microbial fermentation. Furthermore, it was found that the herb addition increased the amount of sesquiterpenes and flavonoids, which have several physiological activities.

研究分野：発酵科学

キーワード：神麹 *Aspergillus oryzae* *Rhizopus oryzae*

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神麹とは、小麦に青蒿(クソニンジン)、蒼茸(オナモミ)、野蔘(タデ)、赤小豆(アズキ)、杏仁(アンズ)を混合し発酵させて作られる薬用の麹であり、古来消化不良の改善や食欲増進等を目的に利用されてきた。神麹は半夏白朮天麻湯、加味平胃酸などの医療用漢方製剤に配合されており、実際に医療に用いられている漢方用薬である。しかし市場に流通する神麹は、入手先によって外観や含有成分が大きく異なることが問題視されている¹⁾。さらに、神麹の具体的な薬効については未だ解明されておらず、作用の根幹を担う薬効成分は同定されていない。よって神麹の品質を医薬品として安定させるために、薬効成分の同定とその含量を指標とした品質管理が強く求められている。

神麹の大きな特徴は、微生物発酵させるという点である。これまでに神麹には *Aspergillus* sp. や *Rhizopus* sp. といった糸状菌が存在することが示されているが、これらの微生物による含有成分の変化や微生物種の違いが神麹の有用性に影響している可能性がある。もう一つの大きな特徴は、植物を添加して発酵させる点である。製造所によって植物の新鮮汁を添加する場合や、乾燥粉末を添加する場合、さらに乾燥させたものを煎じた煎液を添加する場合があるが、植物添加や添加方法の違いによる成分の違いは検討されていない。東アジアや日本の醸造用の麹において、複数の植物が添加されることは非常に稀であり、植物添加が神麹の薬効に影響している可能性がある。本研究ではこれら2つの特徴に着目し、微生物発酵と植物添加が神麹の品質に与える影響を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

本研究では、微生物発酵ならびに植物添加が神麹の品質に与える影響を明らかにし、神麹の品質管理の指標となる薬効成分を見出す。

3. 研究の方法

【実験室における神麹製造】

(1) 微生物が異なる神麹の製造

小麦ふすま(50g)、小麦粉(25g)、クソニンジン(5g)、オナモミ(5g)、ヤナギタデ(5g)、杏仁(1g)、赤小豆(1g)を混合し、分生子(9.2×10^7 cells)を含む滅菌水52ml添加し、35°C、相対湿度98%にて48時間培養した。培養後55°Cで15時間加熱乾燥し、神麹を得た。分生子は *Aspergillus oryzae* (スーパー紫, bioc 社)、もしくは *Rhizopus oryzae* (NBRC4706) を用い、製造した神麹はそれぞれ *Aspergillus* 神麹、*Rhizopus* 神麹とした。

(2) 植物の添加形態が異なる神麹の製造

小麦ふすま(50g)、小麦粉(25g)、赤小豆(1g)、杏仁(1g)を混合後、*Aspergillus oryzae* の孢子懸濁液を分生子が原料1gあたり 10^6 cellsになるように混合した。それぞれ水分が約40%になるよう散水し、35°C、相対湿度95%で48時間培養後、55°Cで15時間乾燥した。植物を添加する場合は、孢子懸濁液と共にヤナギタデ、クソニンジン、オオオナモミを新鮮汁、乾燥粉末、及び煎じ液の状態に添加した。添加量はそれぞれ各新鮮汁15ml、各乾燥粉末5g、煎じ液15ml(乾燥粉末各5g相当)とした。なお、新鮮汁は新鮮植物をスロージューサーにて摩砕し、植物体ごと用いた。乾燥粉末は植物を天日乾燥後、粉砕し、植物体ごと用いた。煎じ液は上述3種類の各乾燥粉末5gを混ぜ合わせ、600mlの水を加え、30分間沸騰させたものをろ過したのち、90mlに減圧濃縮したものを使用した。

【成分分析】

本研究では神麹の有用成分として、消化促進作用に寄与すると考えられる酵素活性、抗炎症作用を有するフェルラ酸、健胃作用に寄与する香り成分に着目した。さらにヤナギタデに含まれる Rhamnazin (抗炎症、神経保護作用)、クソニンジンに含まれる Artemisinin (抗マラリア、抗がん)、オナモミに含まれる Xanthatin (抗がん、抗炎症) についても測定した。酵素活性(α -アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ)は測定キットにより測定し、フェルラ酸は HPLC-UV により定量した。また香り成分については TDS-GC-MS により定量した。Rhamnazin、Artemisinin、Xanthatin については LC-MS により定量した。

4. 研究成果

(1) 微生物発酵が神麹の品質に与える影響

まず、神麹製造過程における *Aspergillus* もしくは *Rhizopus* 糸状菌の増殖の確認を行なった。Real-time PCR の結果、両糸状菌は基質上で急激に増殖し、発酵24時間で 10^3 倍に増加することが確認された。目的糸状菌の急速な増殖は、雑菌汚染防止の観点において重要であることから、神麹の安定製造には、純粋培養した糸状菌の接種が有効であると考えられた。

糸状菌発酵によってほとんどの酵素活性が増加傾向を示したが、*Aspergillus* 神麹は *Rhizopus* 神麹に比べ、高い α -アミラーゼ活性及びリパーゼ活性を示した (Table 1)。一方 *Rhizopus* 神麹は

Aspergillus 神麴よりも僅かに高いプロテアーゼ活性を示した。よって微生物の違いは、神麴の酵素活性に影響を与える可能性が示された。

糸状菌発酵により、香氣成分が大きく変化した (Table 2)。テルペノイドとベンズアルデヒドは、神麴よりも未発酵の原料の方が高かった。クソニンジンはカンファーや 1,8-シネオールなどの精油を含み、杏仁はベンズアルデヒドを含むことが知られている^{2, 3)}。したがって、これらの化合物は植物原料に由来し、発酵と乾燥の過程で代謝または蒸発すると考えられた。一方、どちらのタイプの神麴にも、未発酵物には検出されない 2,3-ブタンジオールとアセトインが含まれていた。これらの化合物は、*Aspergillus* sp. や *Rhizopus* sp. によって生合成されることが報告されている^{4, 5)}。2,3-ブタンジオールとアセトインの含有量は 100 g あたり数 mg-100 mg と高かったことから、これらの化合物は神麴市場品の微生物発酵の指標となる可能性がある。

C8 化合物は、*Aspergillus* 神麴において圧倒的に多かった。特に、1-オクテン-3-オール量は、発酵前および *Rhizopus* 神麴の 90 倍であった。1-オクテン-3-オールは *Aspergillus* 属が生産する特徴的な揮発性化合物で、リノール酸から脂肪酸オキシゲナーゼによって合成される⁶⁾。したがって、*A. oryzae* の脂肪酸オキシゲナーゼ活性が高いことが、*Aspergillus* 神麴中の 1-オクテン-3-オールを増加させる一因と考えられる。

一方、芳香族化合物は *Rhizopus* 神麴の方が *Aspergillus* 神麴よりも多く含まれていた。*Rhizopus* 神麴で多く含まれていたグアイアコールや 4-ビニルグアイアコールなどのフェノール類は、フェルラ酸から脱炭酸反応によって得られると報告されている⁷⁾。*Rhizopus* 神麴は *Aspergillus* 神麴よりもフェルラ酸を多く含んでいたため、グアイアコールと 4-ビニルグアイアコールの生成が促進されたと考えられる。フェルラ酸と 4-ビニルグアイアコールは抗炎症作用があることが報告されており、これらの化合物は神麴の薬効に寄与する可能性がある。

β -フェニルエチルアルコール、イソアミルアルコール、ピラジン類などのアミノ酸関連化合物も *Rhizopus* 神麴の方が *Aspergillus* 神麴より高かった。フェニルアラニン、ロイシン、スレオニン等のアミノ酸が上記化合物の前駆体であることが報告されており⁸⁾、*Rhizopus* 神麴の高いプロテアーゼ活性が、生成促進に寄与している可能性がある。

(2) 植物添加が神麴の品質に与える影響

神麴の製造時に植物を添加することにより、発酵初期における麴菌や細菌類の増殖抑制が見られた。また麴菌の増殖抑制に伴い消化酵素活性の低下が見られた。よって本研究段階においては、麴菌発酵に対する植物添加の有効性は見出せなかった。

一方フェルラ酸は、植物添加により 2.5 倍程度増加していた。植物原料中のフェルラ酸含量を測定したところ、クソニンジンに 684 nmol/g、オオオナモミに 6 nmol/g 含まれていたことから、植物に含まれるフェルラ酸が神麴に持ち込まれたと考えられた。当初神麴の遊離フェルラ酸は小麦等穀物由来であると考えていたが、植物にも一定量のフェルラ酸が含まれることが明らかになった。

テルペノイド等植物由来の精油成分についても、植物添加によって大きく増加していた

Table 1 神麴の消化酵素活性に対する糸状菌種の影響

	酵素活性 (Unit/g DW)			
	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	発酵前	神麴	発酵前	神麴
α -Amylase	0.67	138.68	0.54	9.79
Protease	358	31,795	741	40,301
Lipase	741	6,835	793	509

Table 2 神麴の揮発性成分に対する糸状菌種の影響

Name	$\mu\text{g}/100\text{g DW}$			
	<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	発酵前	神麴	発酵前	神麴
Alcohols				
1,8-Cineole	5.48	0.24	4.82	0.23
2,3-Butanediol	ND	115,835	ND	118,167
Isoamyl alcohol	20.03	14.55	20.09	42.88
1-Hexanol	9.80	2.85	14.21	4.86
1-Octanol	0.30	0.36	0.38	0.19
1-Octen-3-ol	1.60	97.75	1.11	1.17
2-Ethylhexanol	2.63	0.49	1.99	0.33
β -Phenylethyl alcohol	64.17	71.05	59.12	150.68
Benzyl alcohol	866.89	17.54	820.49	1,969
Aldehydes				
Hexanal	34.62	8.65	35.41	2.34
(E)-2-Octenal	1.54	5.59	1.83	1.08
(E)-2-Nonenal	1.70	2.03	2.26	2.69
Benzaldehyde	86.95	19.87	223.32	25.81
Amines				
2,6-Dimethylpyrazine	ND	ND	ND	33.31
2,3-Dimethylpyrazine	ND	ND	ND	14.48
Trimethylpyrazine	ND	ND	ND	43.27
Tetramethylpyrazine	ND	ND	ND	14.06
Ketones				
Acetoin	ND	3,035	ND	6,813
3-Octanone	0.22	0.42	0.15	0.15
Geranylacetone	8.46	1.86	9.82	2.23
γ -Nonalactone	22.46	3.19	24.32	2.49
Camphor	62.71	4.70	58.71	7.34
δ -Decalactone	0.19	0.74	0.21	0.79
Phenols				
Phenol	256.62	102.68	223.44	270.42
Guaiacol	ND	21.48	ND	115.09
4-Vinylguaiacol	6.47	197.32	6.69	389.11
Butylated hydroxytoluene	0.07	1.32	0.07	1.58
Others				
d-Limonene	1.24	1.02	1.48	0.93
2-Pentylfuran	0.82	1.42	0.79	1.29
Ethyl palmitate	0.87	4.28	0.68	6.61
Caryophyllene	1.13	0.83	1.51	1.96
Naphthalene	0.05	0.03	0.06	0.03

(Table 3) . 特に新鮮汁や乾燥粉末を添加した場合は、煎液を添加した場合に比べて精油成分を多く含んでおり、スパツレノールやカリオフィレン等のセスキテルペン類は、新鮮汁もしくは粉末を添加した場合にのみ大幅に増加していた。煎液調製の際は、植物を 30 分熱水抽出するため、加熱により多くの精油成分が揮発し、煎液中の香気成分が減少してしまうと考えられた。植物添加により増加した成分の中には、ボルネオール等抗炎症作用を有する成分⁹⁾ も見られた。

植物由来の有用成分である Rhamnazin, Artemisinin, Xanthatin についても植物を添加することにより大幅に増加することが分かった (Fig. 1) . Rhamnazin は発酵することにより大きく増加している一方, Xanthatin や Artemisinin は発酵により減少傾向が見られた。よって, これらの化合物や類縁化合物が麹菌により代謝を受けることが予想された。以上の結果より, 神麹への植物添加は, 植物由来の機能性成分を付与するという点で有用であると考えられた。

Table 3 植物添加によって増加した揮発性成分				
	非添加	煎液	新鮮汁	粉末
Alcohols				
Eucalyptol	-	-	+	++
Terpinen-4-ol	-	+	-	++
Alpha-terpineol	-	+	-	++
Borneol	+	++	++	+++
cis-Carveol	-	-	++	++
Nerolidol	-	-	++	+++
Spathulenol	-	-	++	+++
Eugenol	-	+++	++	+++
Aldehydes				
Phenylacetaldehyde	-	-	+++	+++
Ketones	-	-	-	-
Camphor	+	+	+	+++
Pinocavone	-	-	++	++
Beta-ionone	++	++	+++	+++
Others				
Bonyl acetate	-	-	+	+
Caryophyllene	-	-	++	++
Alpha-humulene	-	-	+++	+++
Caryophyllene oxide	-	-	+++	+++
Humulene esoxide	-	-	+++	+++
Dihydroactinidiolide	-	+	-	+++
Conmarin	-	+++	+++	+++

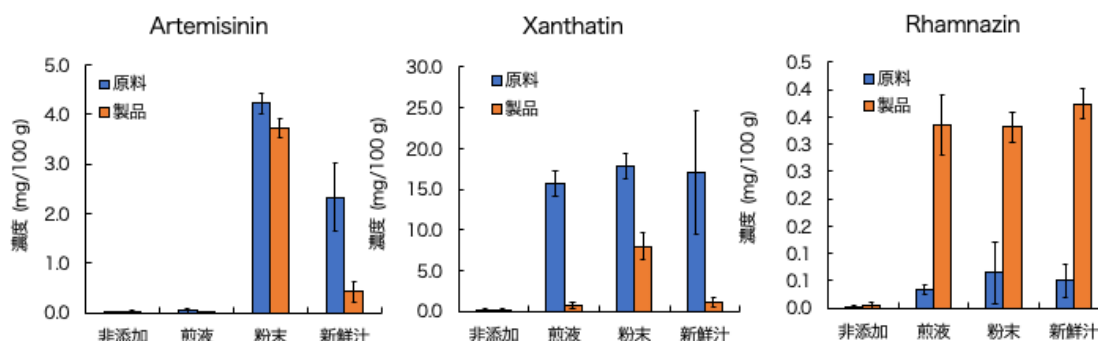


Fig. 1 神麹に含まれる植物由来成分

- 1) 奥津 果優, 門岡 千尋, 小城 章裕, 吉崎 由美子, 二神 泰基, 玉置 尚徳, 高峯 和則, 中国及び韓国の市場品「神麹」における菌叢と含有成分の実態調査, 生薬学雑誌, 71, 41-48, 2017.
- 2) Zhang N, Tang L, Hu Wet al. Insecticidal, fumigant, and repellent activities of sweet wormwood oil and its individual components against red imported fire antworkers (hymenoptera: Formicidae), J. Insect Sci. 14, 241, 2014.
- 3) Lee H, Ahn J, Kwon A, Lee E, Kwak J, Min Y. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of apricot seed, Phytother. Res. 28, 1867-1872, 2014.
- 4) Ito K, Yoshida K, Ishikawa T, Kobayashi S. Volatile compounds produced by the fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation, J. Ferment. Bioeng. 70, 169-172, 1990.
- 5) Lee L, Cheong M, Curran P, Yu B, Liu S. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee, Food Chem. 211, 916-924, 2016.
- 6) Kataoka R, Watanabe T, Yano Set al. *Aspergillus luchuensis* fatty acid oxygenase ppoC is necessary for 1-octen-3-olbiosynthesis in rice koji, J. Biosci. Bioeng. 192-198, 129, 2020.
- 7) Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinylguaiaicol, Food Funct. 6, 887-893, 2015.
- 8) Guneser O, Demirkol A, Yuceer YK, Togay SO, Hosoglu MI, Elibold M. Production offlavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*, Braz. J. Microbiol. 48, 275-285, 2017.
- 9) Ji J, Zhang R, Li H, Zhu J, Pan Y, Guo Q. Analgesic and anti-inflammatory effects and mechanism of action of borneol on photodynamic therapy of acne, Environ. Toxicol. Pharmacol. 75, 103329, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zitai Wang, Kayu Okutsu, Taiki Futagami, Yumiko Yoshizaki, Hisanori Tamaki, Takuro Maruyama, Kazufumi Toume, Katsuko Komatsu, Fumio Hashimoto, and Kazunori Takamine	4. 巻 7
2. 論文標題 Microbial Community Structure and Chemical Constituents in Shinkiku, a Fermented Crude Drug Used in Kampo Medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in nutritions	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnut.2020.00115	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 -
1. 著者名 Wang Zitai, Okutsu Kayu, Yoshizaki Yumiko, Futagami Taiki, Tamaki Hisanori, Maruyama Takuro, Toume Kazufumi, Komatsu Katsuko, Hashimoto Fumio, Takamine Kazunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of microbial fermentation on enzyme activity and volatile properties of Massa Medicata Fermentata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 10~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1303	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 -
1. 著者名 奥津果優	4. 巻 5
2. 論文標題 発酵性の漢方用薬「神麹」の多様性と標準化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 奥津果優	4. 巻 56
2. 論文標題 知られざる麹の薬「神麹」	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 温故知新	6. 最初と最後の頁 33-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王子泰, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 小松かつ子, 高峯和則
2. 発表標題 発酵時の微生物の違いが「神麹」の品質に与える影響
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王子泰, 奥津果優, 二神泰基, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 當銘一文, 小松かつ子, 高峯和則
2. 発表標題 糸状菌による発酵が漢方用薬「神麹」の品質に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中光 はるの, 王子泰, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 丸山卓郎, 河野徳昭, 當銘一文, 小松かつ子, 高峯和則
2. 発表標題 漢方用薬「神麹」の製造時における植物添加の影響
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	安宅 弘司 (Ataka Koji) (30563358)	神戸薬科大学・薬学部・特任助教 (34512)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	神戸 悠輝 (Kambe Yuki) (60549913)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関