

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15287

研究課題名（和文）腸管免疫応答から紐解く漢方薬と腸内細菌叢のクロストーク

研究課題名（英文）Study of crosstalk between Kampo medicine and gut microbiota via gut immunity

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）： これまでに、腸内細菌叢の違いが便秘症の治療に汎用される大黄甘草湯のレスポナー・ノンレスポナーを決定づけることを明らかにしてきた。特に便秘症患者の腸内細菌叢と類似している高炭水化物飼料摂取下の腸内細菌叢の状態において大黄のアントラキノン成分により大黄甘草湯の下剤効果は維持され続けた一方で、高繊維飼料摂取下において大黄のタンニン類により下剤効果は反対に抑制され続けた。このメカニズムとして、腸内細菌叢の制御に関わる免疫グロブリンA（IgA）や短鎖脂肪酸などの変化が起因し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のあることが一般的に知られているが、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黄甘草湯の下剤効果と食習慣による腸内細菌叢の違いとの関連性について、腸管免疫応答とそれらを制御する短鎖脂肪酸の解析から一端を明らかにすることができた。また、本研究から漢方薬・腸内細菌叢・腸管免疫応答の3因子による複雑な関連性を紐解くことで、先人達の経験則に基づいた「証」の科学的解明に近づけると確信している。

研究成果の概要（英文）： So far, we clarified that the eating habits may influence the purgative activity of Daiokanzoto (DKT), thereby categorizing individuals as either responders or non-responders to DKT treatment. In this study, mice on the high-carbohydrate diet exhibited significantly high purgative activity with DKT. This correlated with increased Enterobacteriaceae abundance due to reduced immunoglobulin A regulation. However, the high-fiber diet greatly reduced DKT efficacy. Additionally, rhein 8-O-β-D-glucopyranoside, gallate, and tannin, which are DKT constituents, contributed to the difference between responders and non-responders.

The findings of the study may not only provide the scientific evidence regarding the mechanisms in responders and non-responders to Kampo medicines, but also enhance the significance of Kampo medicines as complex-component drugs the effects of which cannot be explained only based on the mechanism of action of the main components.

研究分野：漢方医薬学、生薬学

キーワード：大黄甘草湯 レスポナー・ノンレスポナー 腸内細菌叢 免疫グロブリンA 短鎖脂肪酸

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黄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]。大黄甘草湯は大黄と甘草の2つの生薬から構成される。申請者はこれまでに大黄に含まれる 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黄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

東洋医学では漢方薬の効く人 (レスポonder) と効かない人 (ノンレスポonder) を患者の証を基に見極めているが、その科学的根拠は明らかになっていない。漢方薬には多くの配糖体成分を含み、それらは腸内細菌の代謝変換に依存していることから、腸内細菌叢の違いは漢方薬の薬効発現に影響を及ぼすと考えられる。これまでの研究で、大黄甘草湯のレスポ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、特に大黄甘草湯は RG の作用によりレスポonderに対して下剤効果を高く維持することを明らかにした [11]。この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。

そこで本研究では、大黄甘草湯のレスポonderとなった高炭水化物飼料と、大黄甘草湯のノンレスポonderとなった高食物繊維飼料の飼料組成の異なる2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、大黄甘草湯などを5日間にわたり連日経口投与し、大黄甘草湯などの下剤活性変化と腸内細菌叢に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

本研究では緩下薬のレスポonder・ノンレスポonderを作製するために、高炭水化物飼料をベースに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2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、大黄甘草湯などを5日間にわたり経口投与して下剤活性を評価した。試料投与前後のマウス糞便を懸濁し、セルソーターで免疫グロブリン A (IgA) 結合・非結合細菌を分離後、メタ16S解析を実施した。また、腸管免疫系の制御に関わる腸内代謝産物の短鎖脂肪酸の変化についても分析した。

[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を評価した。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。

[マウス腸内 IgA 結合細菌の選別と定量] Kau らの方法 (Kau AL *et al.*, *Sci Transl Med*, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4877, 2015) を参考に、SYTO9 で細菌叢を染色した上で APC 標識した抗 IgA 抗体を用いて腸管内容物に含まれる IgA を染色し、セルソーターで IgA 結合細菌を選別した。IgA の定量は IgA Mouse ELISA Kit を用いて実施した。

[腸内細菌叢および IgA 結合細菌の構成、機能変化の解析] 腸内細菌叢の変化および IgA 結合細菌の解析は次世代シーケンサーを用い、得られたデータについて Qiime2 でメタ16S解析を行った。

[腸内代謝産物の解析] 腸内代謝産物である短鎖脂肪酸については、これまでに構築した14種類の脂肪酸を HPLC 解析できる方法を用いて実施した [12]。

4. 研究成果

(1) 大黄甘草湯のレスポonder・ノンレスポonderに関わる大黄甘草湯成分の同定

大黄甘草湯のレスポonder・ノンレスポonderを作製するため、高炭水化物および高繊維飼料の2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、大黄甘草湯などを5日間にわたり経口投与を行い、下剤効果を評価した。その結果、高炭水化物飼料摂取下において大黄甘草湯の下剤効果は投与5日目においても維持された一方で(図1A)、高繊維飼料摂取下においては大黄甘草湯の下剤効果は投与5日目において有意に抑制された(図1B)。そこで、この相違にどの生薬が関与しているか検討したところ、大黄に起因することを明らかにした。さらに大黄のどの成分が関与しているか検討したところ、レスポonderにおいてはこれまでの報告と同様にアントラキノン成分である RG に起因することが明らかとなり、ノンレスポonderにおいては没食子酸やラタンニン、RG タンニンといったタンニン類が寄与することを同定した。

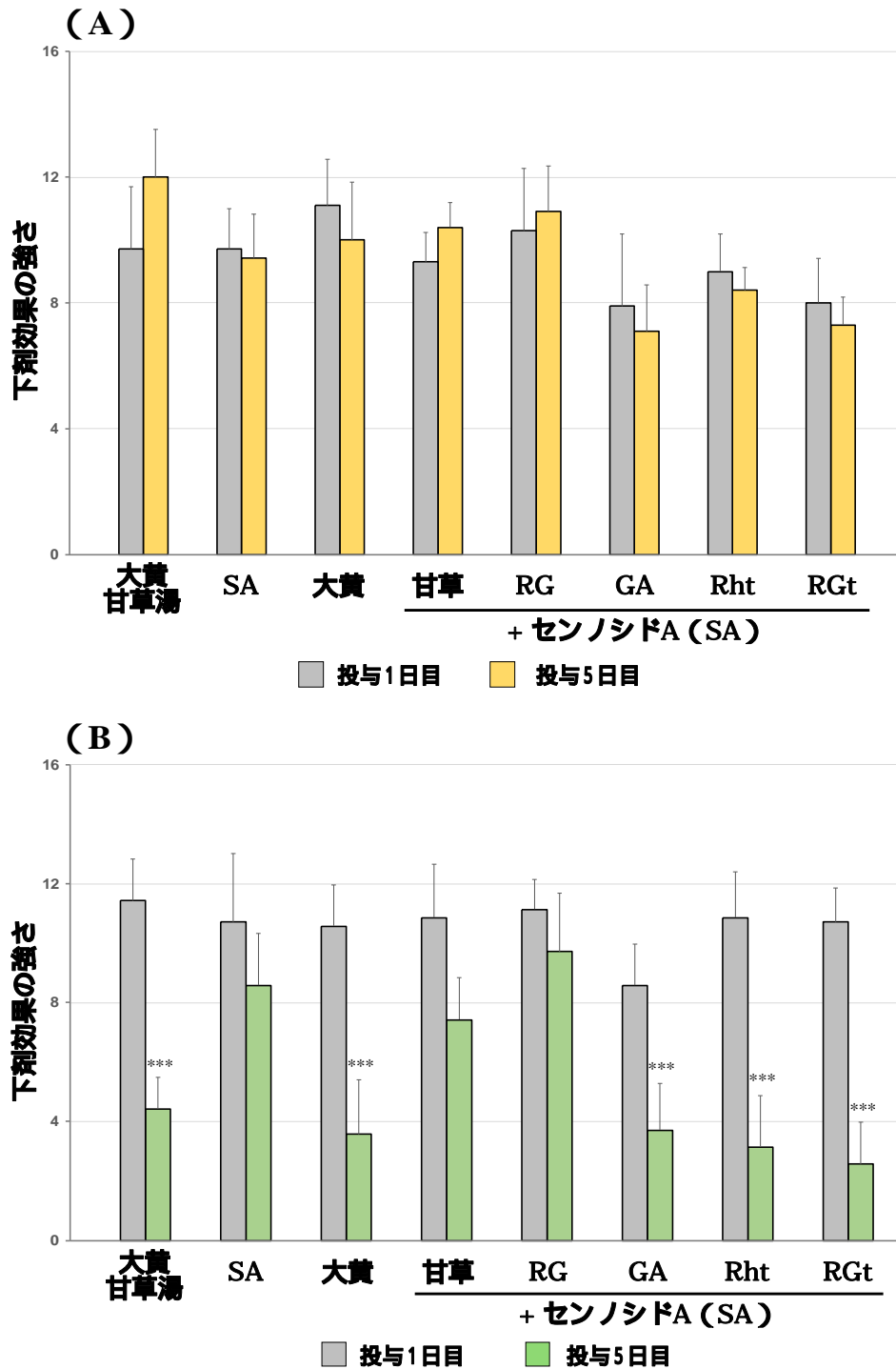


図1. 大黄甘草湯のレスポナー・ノンレスポナーに寄与する大黄甘草湯成分

(A) 高炭水化物飼料摂取下 (B) 高繊維飼料摂取下

SA : Senoside A, RG : rhein 8-O-β-D-glucopyranoside, GA : galic acid, Rht : Rhatannin, RGt : RG-tannin

Data points are presented as the mean ± standard deviation (SD) derived from seven mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, a statistically significantly different from each diet on day1 using Mann-Whitney U test.

(2) 大黄甘草湯成分によるレインアンスロン産生量に及ぼす影響

大黄甘草湯の主有効成分である SA は腸内細菌による代謝変換で活性本体であるレインアンスロンとなり下剤効果を示す。そこで、大黄甘草湯のレスポナー・ノンレスポナーに寄与する大黄甘草湯成分によるレインアンスロンの産生量への影響を検討した。その結果、高炭水化物飼料摂取下において、RG 添加によりレインアンスロンの産生量は有意に増加し、大黄甘草湯のレスポナー化に RG の SA 代謝促進作用が寄与していることが明らかとなった (図 2A)。

一方で、高繊維飼料摂取下においては、RG はレスポナーと同様にレインアンスロンの産生量を増加させるものの、没食子酸やタンニン類はレインアンスロンの産生量を有意に減少させ

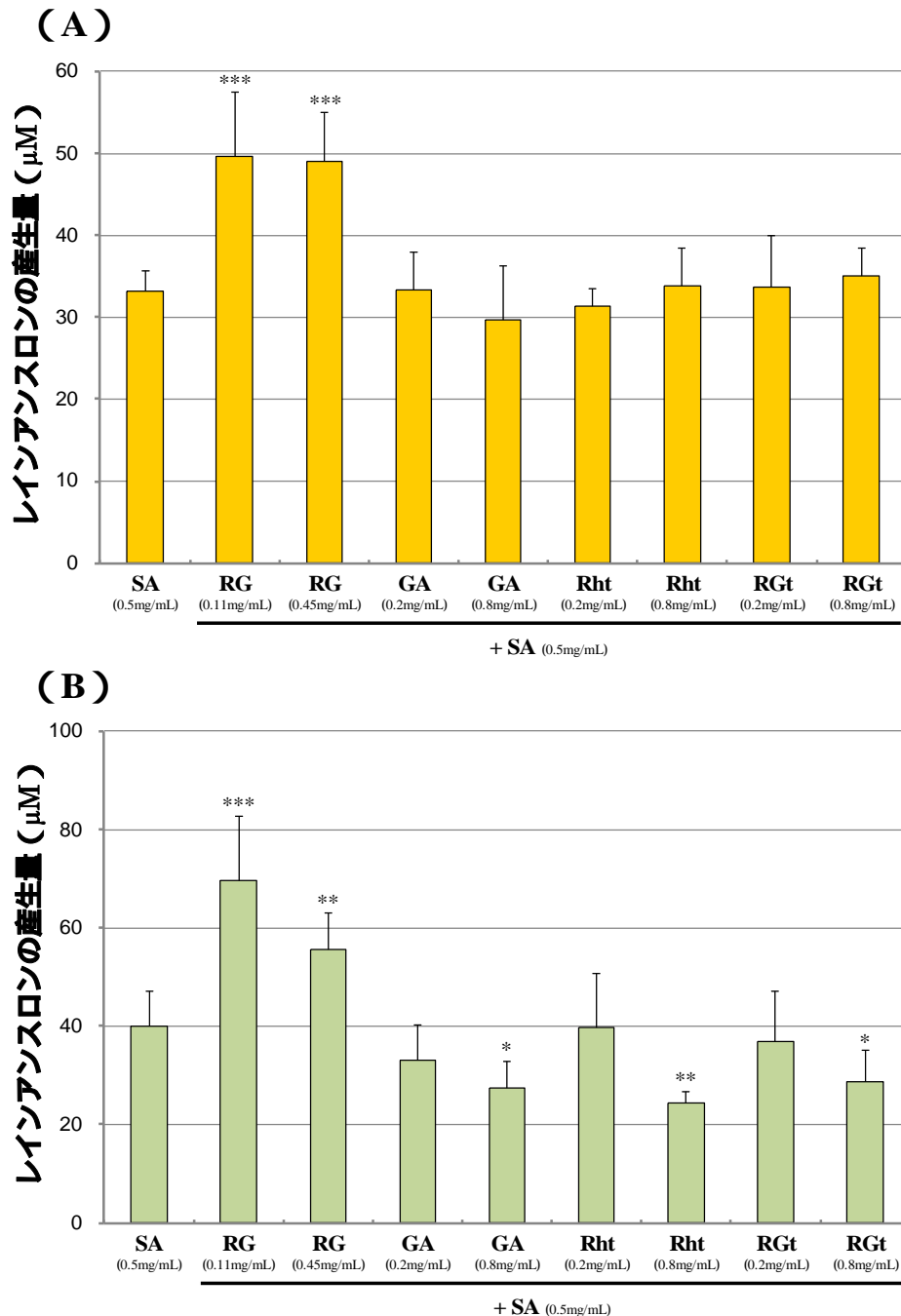


図2. 緩下薬投与による腸内細菌叢の変化

(A) 高炭水化物飼料摂取下 (B) 高繊維飼料摂取下

SA : Sennoside A, RG : rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside, GA : galic acid,
Rht : Rhatannin, RGt : RG-tannin

Data points are presented as the mean \pm standard error (SE) derived from 8-9 mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, a statistically significantly different from Sennoside A (SA) by Dunnett's test.

た(図2B) このことから、没食子酸やタンニン類はSA代謝を抑制しレインアンスロンの産生量を低下させる作用の他に、別のメカニズムで大黃甘草湯のノンレスポonder化に寄与する可能性も示唆された。

(3) 大黃甘草湯が及ぼす腸内細菌に対するIgAの変化

これまでの研究 [11]で、大黃甘草湯のレスポonder・ノンレスポonderにおいて腸内細菌叢の関与を検討したところ、腸管炎症を惹起する Enterobacteriaceae 科細菌が大黃甘草湯の投与でレスポonderでは有意に増加し、ノンレスポonderではほとんど変化を認めなかったことから、このような腸管炎症の惹起に関わる細菌群の増加による下痢症状が大黃甘草湯の下剤効果として現れている可能性も考えられた。そこで、Enterobacteriaceae 科細菌の制御に関わることが知られているIgAに着目し、IgAの腸内細菌に対する反応性や、IgAの産生量の変化について

て検討を進めている。本研究項目は現在もデータ取得中のため詳細は述べられないが、レスポonderでは大黃甘草湯の投与によって IgA の反応性および産生量は低下する傾向にあり、一方でノンレスポonderでは IgA の反応性は維持される傾向を捉えている。

(4) 大黃甘草湯が及ぼす短鎖脂肪酸の産生量の変化

これまでに食習慣による腸内細菌叢の違いが、腸内代謝産物である短鎖脂肪酸の産生量の違いに影響を及ぼすことを報告している [12]。また、短鎖脂肪酸は腸管免疫応答の調節にも関わる重要な代謝物群として数多くの報告がなされている。そこで、大黃甘草湯のレスポonder・ノンレスポonderにおいても短鎖脂肪酸の産生量に変化を認めるか検討を行った。本研究項目についても現在もデータ取得中のため詳細は述べられないが、レスポonderとノンレスポonderでは異なる傾向を捉えており、興味深いデータが得られるか鋭意解析を進めている状況である。

本研究では、高炭水化物飼料で大黃甘草湯の下剤活性は維持され続けた一方で、高繊維飼料ではその下剤効果は有意に抑制され、この違いに寄与する大黃甘草湯成分として RG や没食子酸、タンニン類を同定した。この成分群のメカニズムとして、SA 代謝に影響を及ぼしレインアンスロンの産生量に違いをもたらすだけでなく、腸管免疫系、特に IgA の反応性や産生量、それらの調節にも関わる短鎖脂肪酸に影響を及ぼすことによってレスポonder・ノンレスポonderを生じさせている可能性が示唆された。

本研究の結果から、漢方薬の効果発現と食習慣による腸内細菌叢の違いとの関係性について、腸管免疫応答の変化にも着目して検討することで、漢方薬のレスポonderとノンレスポonderを見極める上で重要な「証」を科学的に解明できるのではないかと考えられた。

<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. *Syokakika.* **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. Takayama K., Takahara C., Tabuchi N., Okamura N. Daiokanzoto (Da-Huang-Gan-Cao-Tang) is an effective laxative in gut microbiota associated with constipation. *Sci. Rep.*, doi:10.1038/s41598-019-40278-2 (2019).
12. Inoue H., Takayama K., Takahara C., Tabuchi N., Okamura N., Narahara N., Kojima E., Date Y., Tsuruta Y. Determination of short-chain fatty acids in mouse feces by high-performance liquid chromatography using 2-nitrophenylhydrazine as a labeling reagent. *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 845-849 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kento Takayama, Chiho Takahara, Ayano Yahagi, Masanori Iseki, Katsuhiko Ishihara, Takashi Tanaka, Gen-ichiro Nonaka, Hirofumi Inoue
2. 発表標題 The diet-induced differences in gut microbiota determines the responder / non-responder of Daiokanzoto (Da-Huang-Gan-Cao-Tang)
3. 学会等名 2nd World Congress of Integrative Medicine and Health (ICCMR) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三谷 竜也, 竹本 菜緒, 高原 千穂, 井関 将典, 矢作 綾野, 石原 克彦, 田中 隆, 野中 源一郎, 井上 裕文, 高山 健人
2. 発表標題 大黄甘草湯の下剤効果に及ぼす腸管免疫系の影響
3. 学会等名 第40回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山健人, 石川風花, 生田淳志, 矢作綾野, 井関将典, 高原千穂, 石原克彦, 井上裕文
2. 発表標題 漢方薬のレスポナー・ノンレスポナーを制御する腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第26回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷 竜也, 竹本 菜緒, 高原 千穂, 井関 将典, 矢作 綾野, 石原 克彦, 井上 裕文, 田中 隆, 野中 源一郎, 高山 健人
2. 発表標題 大黄甘草湯のレスポナー・ノンレスポナーを制御する腸内細菌叢と免疫グロブリンAの関連性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 蒼真, 松田 大輔, 大西 彩音, 植木 勇百, 高原 千穂, 高山 健人
2. 発表標題 大黄甘草湯が及ぼす腸管上皮バリア機能と腸管免疫応答への影響
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山 健人
2. 発表標題 腸内細菌は漢方薬の有用性を紐解く端緒となる 漢方薬と腸内細菌叢のクロストークの解明 -
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会（招待講演）
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

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