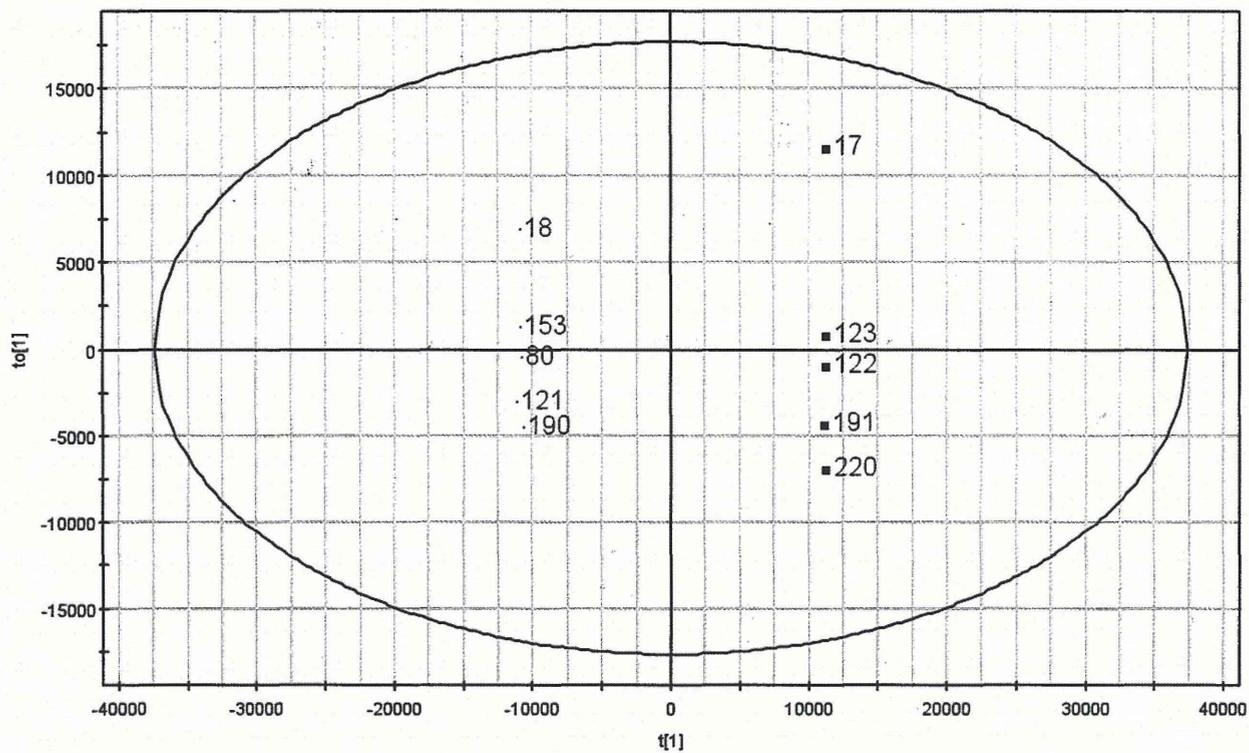


図 5 柴胡 LC/MS 分析データを用いた主成分分析



R2X[1] = 0.394888 R2X[XSide Comp. 1] = 0.177092 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

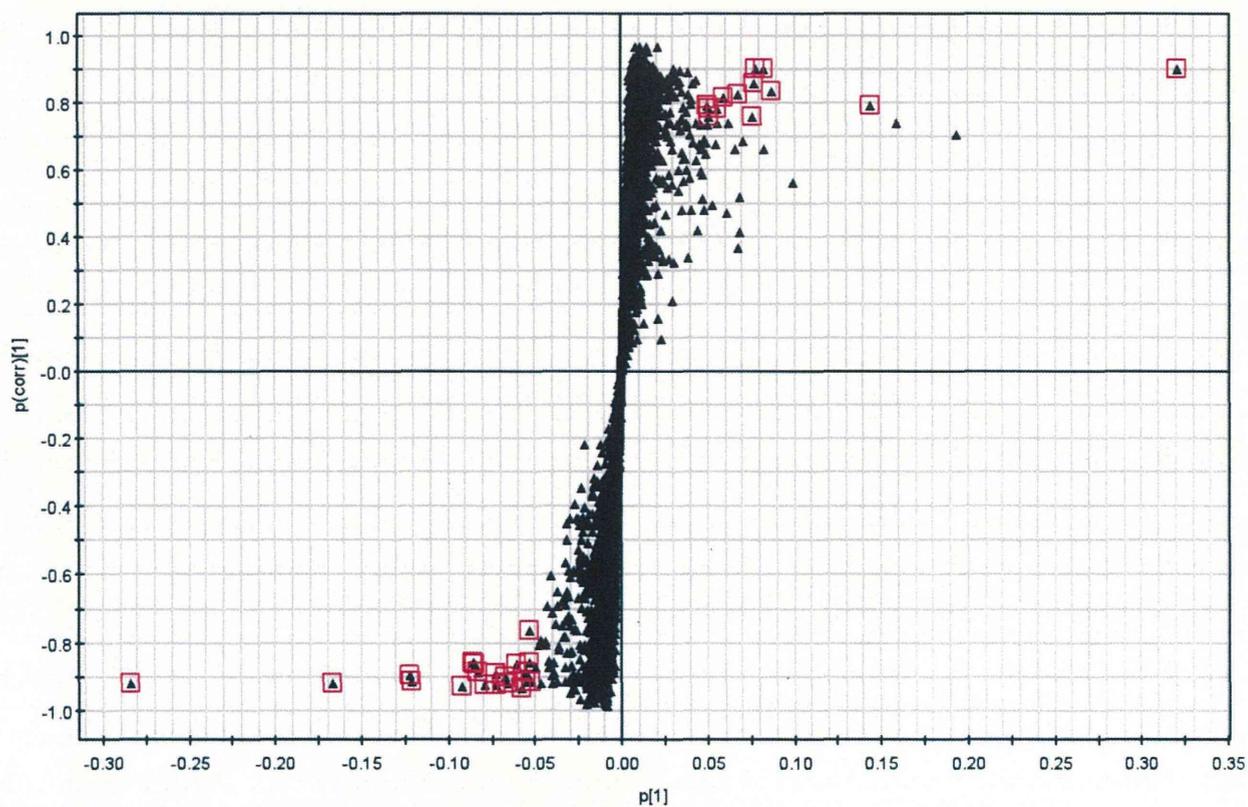


図 6 柴胡 LC/MS 分析データを用いた判別分析

B. falcatum (▲) *B. chinense* (△)

上段: OPLS/OPLS-DA スコアプロット

下段: Sプロット

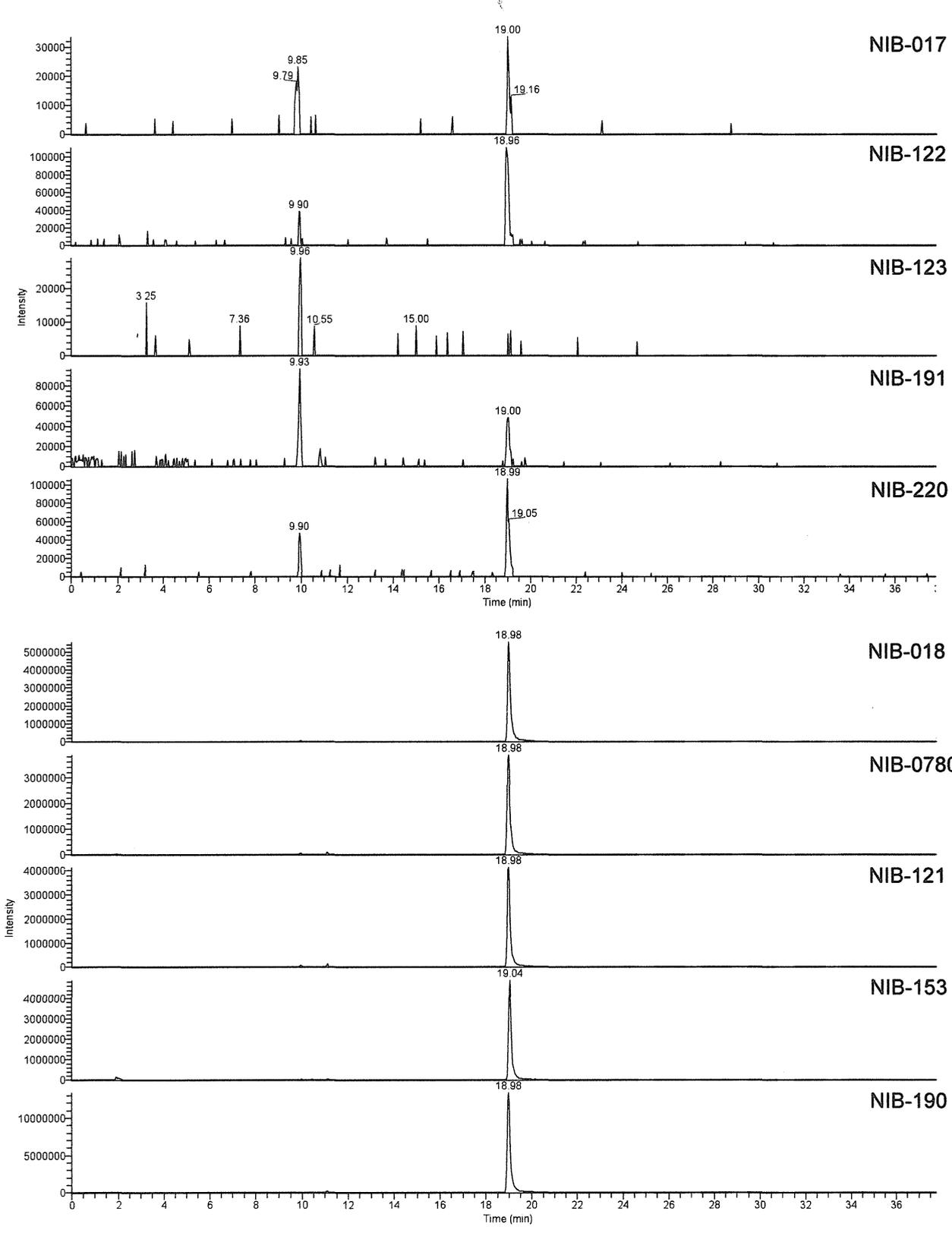


図 7 *B. chinense* に特徴的なピーク (RT 19.0 min, m/z 207.1)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と安全性・有効性等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長
協力研究者 糸田 幸恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

柑橘類生薬の糖含量と腸内細菌増殖活性に関する研究

前年度の研究において腸内細菌 *Lactobacillus reuteri* の増殖促進活性が見出された陳皮の活性成分について検討を進めたところ、活性成分は sucrose であると同定された。陳皮の他、同じ柑橘類生薬である枳実、青皮について sucrose 含量を測定したところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高く、陳皮は青皮より 3~6 倍も糖含量が高いことが確認された。また、これらの生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較したところ、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高かった。以上のことから、柑橘類生薬においては、sucrose 含量と *L. reuteri* 増殖促進活性に相関関係があることが確認された。

A. 研究目的

腸内細菌叢の適切なバランスは、宿主の健康を維持する上で極めて重要である。腸内細菌の多くは生育と共に酢酸、乳酸、酪酸等の有機酸を産生し、腸内の pH を下げて腸内環境を整える。また、生産された有機酸は宿主の腸管細胞よりエネルギー源として利用される。このため、腸内細菌叢の組成解明に関する研究やプロバイオティクス、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢や短鎖脂肪酸含量をコントロールする試み等が、ヒトを含む多くの動物を対象として盛んに行われている。漢方処方作用発現における腸内細菌の関与も古くから論じられ、腸内細菌に代謝されることにより漢方処方成分の有効性に変化が生じる例はよく調べられている。一方、漢方処方の服用が腸内細菌叢のバランス、腸内細菌の増殖及び短鎖脂肪酸の生産に与える影響に関しては、十分に検討されているとは言い難い。

さて、社会構造及び疾病構造の変化に加えて、

自らの健康に強い関心を持つ国民が増え、軽度な疾病の予防や生活の質の改善、向上等を目標とした一般用医薬品によるセルフメディケーションの考え方が普及しつつあることを受けて、厚生労働省では、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を平成 14 年に発表している。そして、その具体的な方策の一つとして、一般用漢方処方の見直しとその積極的な活用が提言されている。我々は、これに対して厚生労働科学研究費補助金による研究班報告書として「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」（平成 20 年 3 月）を公表したが、この手引き案（改訂版）を基盤とした厚生労働省一般用医薬品部会において、一般用漢方処方承認内規の約 30 年振りの見直しと新規処方の承認基準収載が検討され、その結果、平成 20 年 9 月 30 日に薬食

審査発第 0930001 号通知、平成 22 年薬食審査発 0401 第 2 号通知、平成 23 年 4 月 15 日薬食審査発 0415 第 1 号通知及び平成 24 年 8 月 30 日薬食審査発第 0830 第 1 号通知として、一般用漢方製剤承認基準が発出されている。「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」において承認基準への追加収載を提案された 85 処方のうち、現時点で 80 処方が収載されている。

一般用漢方処方承認基準に収載された処方は、長年の臨床使用経験により有効性・安全性を担保されているが、この経験的な保証に加え、現代科学的視点による評価を付与することが必要と思われる。我々はこれに対して、漢方処方や構成生薬の腸内環境への関与という新たな視点で考察を進めており、前年度は、茯苓飲にヒト腸内常在菌である *Lactobacillus reuteri* 増殖促進活性があること、及び活性を担う構成生薬が柑橘類生薬の陳皮であることを見出した。更に、陳皮に含まれる活性成分がオリゴ糖であることも明らかにした。本年度は、活性を持つオリゴ糖の同定を行うと共に、柑橘類生薬におけるオリゴ糖含量と *Lactobacillus reuteri* 増殖活性の相関について考察したので報告する。

B. 研究方法

試薬及び器具

生薬はウチダ和漢薬、大晃生薬、ツムラ、栃本天海堂、松浦薬業より購入して用いた。嫌気ジャーは BD の GasPak 100 Holding Jar を、アネロパックは三菱ガスケミカルの製品を用いた。96 穴マイクロプレートは AGC テクノグラス (IWAKI) の製品を用いた。0.45 μm 孔のメンブランフィルターは Millipore 社の Millex (PVDF) を用いた。顕微鏡観察用の細胞計数盤は、ワンセル社のワンセルカウンターを用いた。

固相抽出カラムは Waters 社の Oasis HLB (60 mg/1cc) を用いた。HPLC による分析分離には、ポリマー系アミノカラムとして Asahipak NH2P-50 4E (4.6 \times 250 mm, Shodex) を、配位子交換 + サイ

ズ排除モードのカラムとして SUGAR KS-802 (8.0 \times 300 mm, Shodex) を用いた。

腸内細菌

Lactobacillus reuteri JCM 1112 を理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入して用いた。

設備及び機器

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830 (東京理化学器械) を用いて行った。オートクレーブには MAC-601 (東京理化) を用いた。HPLC-CAD 分析には、HPLC 装置として Shimadzu Prominence、CAD として Corona CAD (ESA Biosciences, Inc) を使用した。菌体の観察・撮影は、Olympus の位相差顕微鏡 IX51 及びデジタルカメラ DP20 を用い、画像処理・画像解析には WinROOF (MITANI) を用いた。NMR スペクトルは、ECA-800 型核磁気共鳴装置 (Jeol) で測定した。

生薬のエキス調製

生薬のエキス調製は、生薬 20 g をポット (らくらく煎) に取り、生薬総重量の 20 倍量の水 (400mL) を入れ、半量になるまで煎じた。この煎出液をナス型フラスコに入れ、 -45°C で予備凍結させた後、凍結乾燥させて生薬エキスを調製した。

腸内細菌の培地調製

MRS broth (Oxoid) を定法の通り 52 g/L で用い、蒸留水で溶解後、L-cysteine を最終濃度 0.05% で加え、pH を 5.5 に合わせた。そして、 121°C 、15 分間オートクレーブ滅菌を施した後に用いた。

腸内細菌の培養

-80°C 凍結保存した *L. reuteri* グリセロールストックを 3 mL MRS 培地に 1 白金耳接種し、アネロパックを入れた嫌気ジャーで 37°C 、15 時間、

静置培養した。

細菌生育試験

試料溶液は、漢方処方エキス及び生薬エキスを滅菌水に 100 mg/mL の濃度で溶解したものとし、0.45 μm 孔のメンブランフィルターでろ過した後、96 穴マイクロプレートの 1 穴に終濃度 OD₆₀₀=0.01 となるよう菌を加えた 90 μL の培地と 10 μL の試料溶液を加え、37°C で 5 時間培養した。

顕微鏡画像解析

培養終了後、培養液の一部を取り、位相差顕微鏡にて観察・撮影した。位相差用対物レンズは UPlanFLN 4×Ph を、位相差用光学素子には PhL を用いた。得られた画像は、WinROOF ソフトにより 2 値化処理を施して細胞と背景に分離し、細胞に相当する部分の面積を計測することにより、細菌増殖度を数値化した。また、得られた数値は検量線グラフを元に OD 値へ変換し、増殖度を求めた。

逆相担体による糖画分の調製

Oasis HLB カラム (60 mg/1cc) に MeOH 1 mL を流してコンディショニングし、水 1 mL を流し平衡化させた。20 mg/mL に調製したエキス水溶液を 1 mL ロードした非保持画分及び水 1 mL で溶出させた水溶出画分を合わせて糖画分とした。また、その後 100% MeOH 1 mL で溶出させた画分を MeOH 溶出画分とした。各画分は凍結乾燥又はエバポレーターで溶媒を完全に飛ばし、保存した。

糖画分の LC-CAD 分析

陳皮オリゴ糖画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分画した Fr.2 及び糖標品の分析は、ポリマー系アミノカラムを用いて以下の条件で行った。なお、Fr.2 及び糖標品は、水/アセトニトリル=50/50 にそれぞれ 2.5 mg/mL 及び 5 mg/mL となるよう調製し、10 μL を分析に供した。カラム：Asahipak NH2P-50 4E (Shodex) カラム温度：30°C

移動相：水/アセトニトリル=25/75

流速：0.6 mL/min

柑橘類生薬の糖画分の分析は、配位子交換+サイズ排除モードのカラムを用いて以下の条件で行った。なお、各糖画分は、5 mg/mL となるよう調製し、5 μL を分析に供した。

カラム：SUGAR KS-802 (Shodex)

カラム温度：60°C

移動相：水(isocratic)

流速：0.4 mL/min

統計解析

全てのデータは平均値±S.D. で表した。また、統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA)、次いで Tukey の多重比較検定により行った。P<0.05, P<0.01 を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用していない。

C. 研究結果

陳皮中の *L. reuteri* 増殖促進活性成分の同定

前年度の研究では、陳皮に含有される *L. reuteri* 増殖促進活性成分の分離を進め、エタノール沈殿により得られた陳皮オリゴ糖画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィーより更に分離した Fr.2 に活性が見られることを見出した (Figure 1)。本年度は、Fr.2 の同定を試みた。まず、単糖や二糖の分析に適したポリマー系アミノカラムを用いて、Fr.2 及び複数の単糖・二糖の標品を分析したところ、Fr.2 の保持時間は、sucrose の保持時間と一致した (Figure 2)。また、Fr.2 について NMR 測定を行った結果、¹H-, ¹³C-NMR ともに、sucrose 標品とスペクトルが一致したのを確認した (データ示さず)。以上の結果から、陳皮に含有される *L. reuteri* 増殖促進活性成分は sucrose であることが明らかとなった。

柑橘類生薬の糖含量と *L. reuteri* 増殖促進活性

Sucrose は植物に広く含有される糖であるが、前年度の研究では、陳皮 (*Citrus unshiu* Markowicz または *C. reticulata* Blanco の成熟した果皮) には活性がみられたものの、同じ柑橘類生薬である枳実 (*Citrus aurantium* Linne ver. *daidai* Makino または *C. natsudaidai* Hayata の未熟果実) には活性がみられなかったことから、同じ柑橘類生薬でも両者の sucrose 含量は大きく異なることが予想された。そこで、これらの生薬中の sucrose 含量を測定することとした。また、陳皮の類似生薬として、基原植物が同じであるが採取時期が異なる青皮 (*C. unshiu* Markowicz または *C. reticulata* Blanco の未熟果皮) についても同様に検討を行った。それぞれの試料について、逆相固相カートリッジ処理により得られた糖画分を分析した結果が Figure 3 及び Table 1 である。Sucrose (保持時間 20.7 分のピーク) の含量は枳実が最も低く、0.75~6.45 mg/g であり、青皮は 9.43~11.75 mg/g、そして陳皮は最も高く 36.72~63.76 mg/g であった。

また、これら 3 種の柑橘類生薬のエキス (終濃度 10 mg/mL) の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較した結果が Figure 4 である。青皮にも増殖促進活性がみられたが、陳皮ほどは活性が強くなかった。また、枳実と青皮、青皮と陳皮の活性にはいずれも有意に差がみられた。以上のことから、柑橘類生薬においては、sucrose 含量と *L. reuteri* 増殖促進活性に正の相関関係があることが確認された。

D. 考察

乳酸菌 *L. reuteri* の増殖を促進させる成分であることが判明した sucrose について、柑橘類生薬である陳皮、枳実、青皮における含量の測定を行ったところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高いことが明らかとなった。柑橘類果実や果皮の生育に伴う糖含量の経時変化については複数の報告があり、成熟

に伴い sucrose をはじめとした糖の含量が高くなることがわかっている¹⁾。よって、基原植物が同じで採取時期のみが異なる生薬青皮と陳皮においても、未熟果皮である青皮より、成熟果皮である陳皮の方が sucrose 含量が高いことが予想されたが、本研究結果により、市場に流通している陳皮は青皮よりも 3~6 倍も sucrose 含量が高いことが確認された。

また、これら柑橘類生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較した結果、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高く、両者に差がみられた。青皮と陳皮は、ほぼ同じ効能効果を持つが、陳皮の方が性質が穏やかで、行気・化滯の効能が弱いとされ、使い分けられる場合もある²⁾。同じ植物の同じ部位でも、未熟品か成熟品かの違いで薬効に違いが生じることについて、科学的な議論はこれまでにほとんどなされていないが、本研究結果により、糖含量の違いが、青皮と陳皮の薬効の違いに関与している可能性が考えられた。

E. 結論

昨年度に引き続き、陳皮中の *L. reuteri* 増殖促進活性成分の同定を試み、活性成分が sucrose であることを明らかにした。また、陳皮の他、同じ柑橘類生薬である枳実、青皮について sucrose 含量を測定したところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高く、陳皮は青皮より 3~6 倍も糖含量が高いことが確認された。更に、これらの生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較したところ、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高かったことから、柑橘類生薬においては、sucrose 含量と *L. reuteri* 増殖促進活性に正の相関関係があることが確認された。

F. 研究発表

1. 学会発表

該当無し

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) Daito, H., Sato, Y.: Changes of sugar and organic acid components of satsuma mandarin fruit during maturation. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 54, 155-162 (1985)
- 2) 神戸中医学研究会, 漢薬の臨床応用, 医歯薬出版, 1979.

Table 1. Extract yield and sucrose content of crude drugs

	Extract yield (mg/g)	Sugar fraction content (mg/g)	Sucrose content (mg/g)
Aurantii Fructus Immaturus (枳实)			
Sample 1	205.5	109.6	6.14
Sample 2	236.0	121.7	1.29
Sample 3	176.5	93.8	0.75
Sample 4	194.5	106.8	1.03
Sample 5	180.0	101.2	6.45
Citri Unshiu Pericarpium (青皮)			
Sample 6	153.5	104.4	11.75
Sample 7	147.0	103.9	9.43
Aurantii Nobilis Pericarpium (陳皮)			
Sample 8	264.5	212.7	46.78
Sample 9	269.0	220.0	44.45
Sample 10	229.5	187.7	36.72
Sample 11	289.5	252.0	63.76
Sample 12	291.0	242.1	50.36

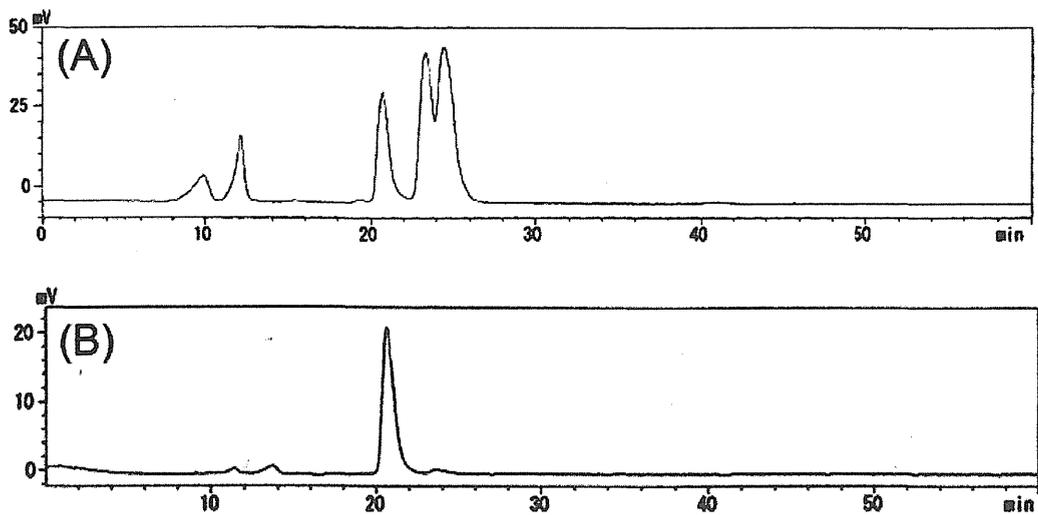


Figure 1 LC-CAD chromatograms of (A) the sugar fraction of *Aurantii Nobilis Pericarpium* and (B) fraction No. 2 separated by gel filtration chromatography (GFC) in our previous study. LC analysis was done using the GFC and ligand exchange column (SUGAR KS-802).

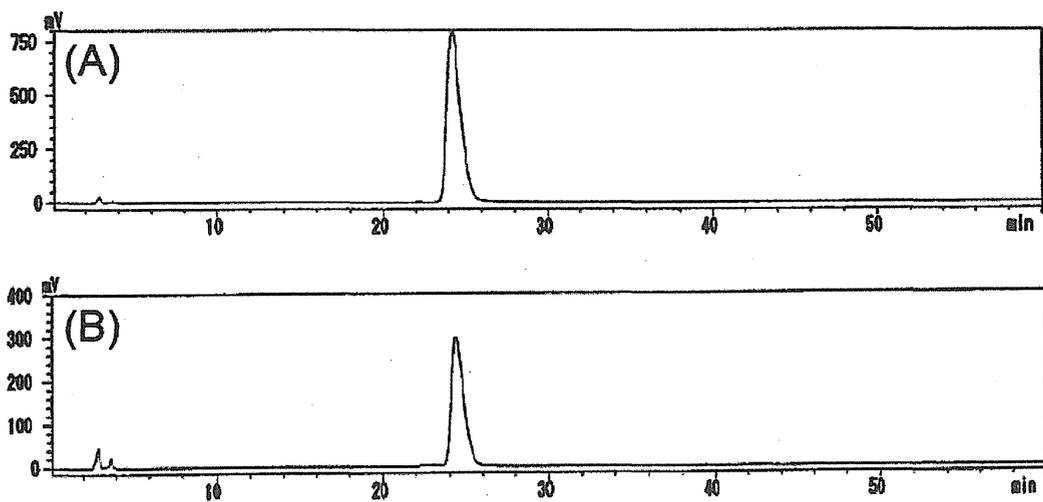


Figure 2 LC-CAD chromatograms of (A) sucrose and (B) fraction No. 2 separated by gel filtration chromatography in our previous study. LC analysis was done using the polymer-based amino column (Asahipak NH2P-50).

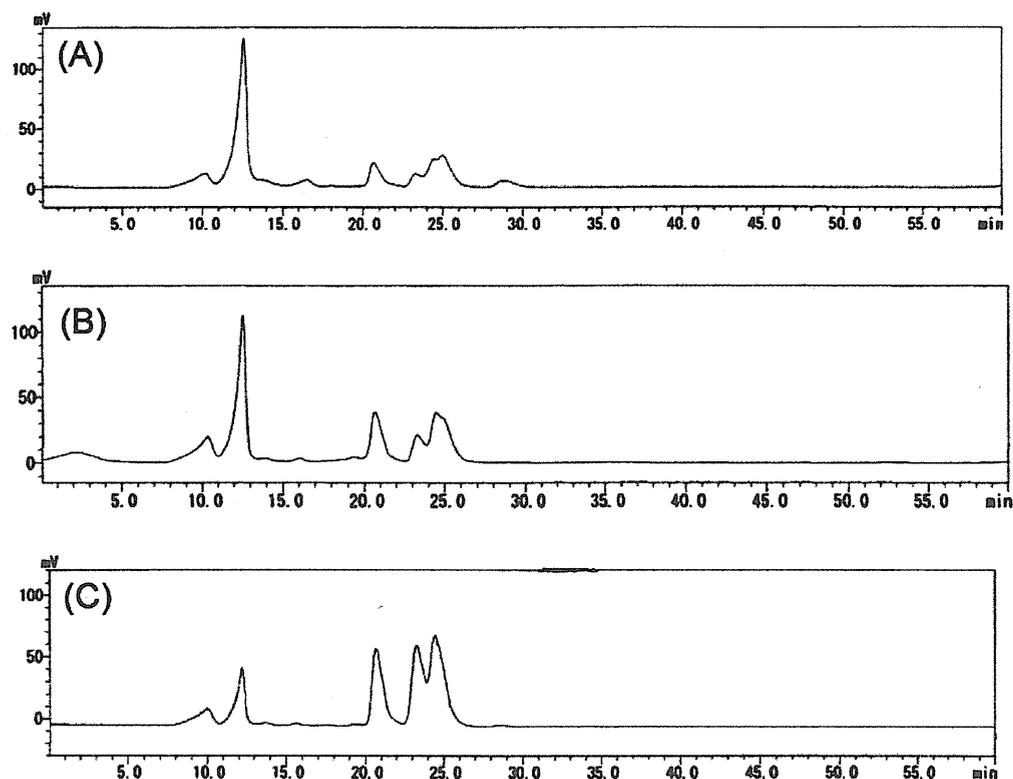


Figure 3 LC-CAD chromatograms of the sugar fraction of (A) Aurantii Fructus Immaturus (sample 1), (B) Citri Unshiu Pericarpium (sample 6) and (C) Aurantii Nobilis Pericarpium (sample 8). LC analysis was done using the GFC and ligand exchange column (SUGAR KS-802).

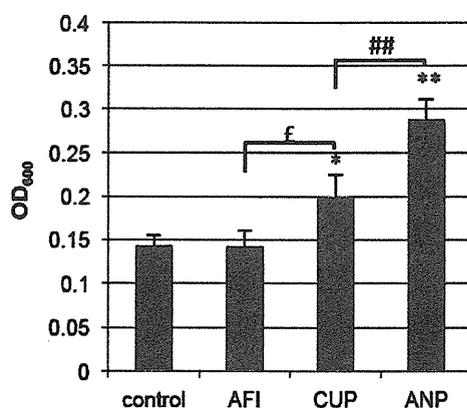


Figure 4 Effects of Aurantii Fructus Immaturus (AFI), Citri Unshiu Pericarpium (CUP) and Aurantii Nobilis Pericarpium (ANP) on the growth of *Lactobacillus reuteri*.

Each value represents the means \pm SD (n=4). The statistical significance was determined by Tukey's test. * P <0.05 and ** P <0.01 versus control cells. ‡ P <0.05 and †† P <0.01 versus AFI-, and CUP-treated cells, respectively.

分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と安全性・有効性等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長
協力研究者 桑田 幸恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

乙字湯の *Clostridium difficile* 増殖抑制活性について

乙字湯が7種の腸内細菌(*Clostridium*属2種、*Lactobacillus*属2種、*Bifidobacterium*属3種)の増殖に与える影響を調べた結果、乙字湯は、*Clostridium*属、特に *C. difficile* (抗生物質投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属及び *Bifidobacterium* 属の一部に対しては増殖促進活性を示すことが明らかとなった。このことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。また、*C. difficile* に対する増殖抑制活性を担う構成生薬は、大黄、黄芩、甘草であり、これらは大黄を中心として協調して活性を示すことが判明した。

A. 研究目的

漢方処方の有効性に関する研究の一環として、我々は漢方処方が腸内細菌の増殖に与える影響を調べている。これまでに、有害菌として知られる *Clostridium* 属についてスクリーニングを行い、増殖抑制活性がみられた漢方処方の一つとして乙字湯を見出した。そこで本研究では、乙字湯が *Clostridium* 属の他、有用菌として知られる *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* 属に与える影響について更に検討を行い、乙字湯は *Clostridium* 属、特に *C. difficile* (抗生物質投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対する強い抑制活性をもち、かつ、他の有用菌の増殖には影響しない、もしくは増殖を促進する活性をもつことを見出したので報告する。

B. 研究方法

試薬及び器具

生薬はウチダ和漢薬より日本薬局方規格品を購入して用いた。嫌気ジャーは BD の GasPak 100

Holding Jar を、アネロパックは三菱ガスケミカルの製品を用いた。96 穴マイクロプレートは AGC テクノグラス (IWAKI) の製品を用いた。0.45 μm 孔のメンブランフィルターは Millipore 社の Millex (PVDF) を用いた。顕微鏡観察用の細胞計数盤は、ワンセル社のワンセルカウンターを用いた。

腸内細菌

Clostridium difficile JCM1296, *C. perfringens* JCM1290, *Lactobacillus acidophilus* JCM1132, *L. reuteri* JCM1112, *Bifidobacterium adolescentis* JCM1275, *B. longum* JCM1217, *B. catenulatum* JCM1196 は、理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入して用いた。

設備及び機器

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830 (東京理化学器械) を用いて行った。オート

クレーブには MAC-601 (東京理化) を用いた。菌体の観察・撮影は、Olympus の位相差顕微鏡 IX51 及びデジタルカメラ DP20 を用い、画像処理・画像解析には WinROOF (MITANI) を用いた。

漢方処方及び生薬のエキス調製

乙字湯のエキス調製は、当帰(6)、柴胡(5)、黄芩(3)、甘草(2)、升麻(1.5)、大黄(1)の配合比で構成生薬をポット(らくらく煎)に取り、生薬総重量の20倍量の水を入れ、半量になるまで煎じた。この煎出液をナス型フラスコに入れ、-45°Cで予備凍結させた後、凍結乾燥させて漢方処方エキスを調製した。単味生薬エキスは生薬 20g に関して上記と同様の方法で調製した。

腸内細菌の培養

Clostridium 属と *Bifidobacterium* 属は、0.5% の glucose を添加した GAM 培地(日水製薬)中、無酸素混合ガス(N₂/CO₂/H₂=80/10/10)で置換した嫌気グローブボックス(COY社)内で培養した。*Lactobacillus* 属は、0.05%の L-cysteine を添加した MRS 培地(Oxoid)中、アネロパック(三菱ガス化学)を入れた角型ジャー(三菱ガス化学)内で培養した。

細菌生育試験

試料溶液は、漢方処方エキス及び生薬エキスを滅菌水に 100 mg/mL の濃度で溶解し 0.45 μm 孔のメンブランフィルターでろ過した後、目的の濃度に希釈して用いた。96 穴マイクロプレート(1 穴に終濃度 OD₆₀₀=0.01 となるよう菌を加えた 90 μL の培地と 10 μL の試料溶液を加え、37°C で 5 時間培養した。

顕微鏡画像解析

培養終了後、培養液の一部を取り、位相差顕微鏡にて観察・撮影した。位相差用対物レンズは UPlanFLN 4×Ph を、位相差用光学素子には PhL を用いた。得られた画像は、WinROOF ソフトにより 2

値化処理を施して細胞と背景に分離し、細胞に相当する部分の面積を計測することにより、細菌増殖度を数値化した。また、得られた数値は検量線グラフを元に OD 値へ変換し、増殖度を求めた。

統計解析

全てのデータは平均値±S.D. で表した。また、統計解析は、一元配置分散分析(ANOVA)、次いで Dunnett または Tukey の多重比較検定により行った。P<0.05, P<0.01 を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用していない。

C. 研究結果

乙字湯が腸内細菌の増殖に与える影響

7 種の菌の増殖に与える乙字湯(終濃度 1-20 mg/mL)の影響について調べたところ、*Clostridium* 属 2 種に対して濃度依存的な増殖抑制活性がみられた(Figure 1A)。特に *C. difficile* に対して抑制活性が強く、10 mg/mL での増殖度は control と比較して約 15.9%、20 mg/mL では約 7.4%の値であった(*C. perfringens* ではそれぞれ 75.5%、41.4%)。一方、*Lactobacillus* 属 2 種及び *Bifidobacterium catenulatum* には増殖促進活性がみられ、特に 5-10 mg/mL では、control と比較して約 2 倍の増殖度であった(Figure 1B, 1C)。また、*B. adolescentis*, *B. longum* に対しては、1-10 mg/mL ではほとんど増殖に影響を与えなかったが、20 mg/mL では、増殖抑制活性を示した。以上より、乙字湯は、終濃度 5-10 mg/mL 付近において、*Clostridium* 属 2 種、特に *C. difficile* に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属 2 種及び *B. catenulatum* に対しては増殖促進活性を示し、その他の菌の増殖には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

乙字湯構成生薬が腸内細菌の増殖に及ぼす影響

乙字湯の上記に示した活性に、構成生薬(当帰、

柴胡、黄芩、甘草、升麻、大黄) がどのように寄与しているのかを調べるため、各生薬エキス試料を添加した腸内細菌の増殖度を測定した。各構成生薬は、配合量及びエキス収量から求めた、乙字湯 10 mg/mL における推定濃度 (Table 1) で添加した。その結果、黄芩、甘草、大黄に *Clostridium* 属 2 種の増殖抑制活性があることがわかった (Figure 2A)。しかし、これらの中で一番強い抑制活性がみられた大黄においても、単独では乙字湯ほどの増殖抑制活性を示さなかったことから、これらの生薬は協調して抑制活性を示すと考えられた。一方、*Lactobacillus* 属と *B. catenulatum* に対しては、多くの生薬に増殖を促進させる傾向が見られたが、特に当帰と黄芩に高い増殖促進活性があることが明らかとなった (Figure 2B, 2C)。

C. difficile に対する各生薬の影響については、単味生薬エキスだけではなく、乙字湯一味欠処方エキスを試料とすることによっても評価した。上述の通り、単味生薬エキスを試料としたアッセイでは、黄芩、甘草、大黄に *C. difficile* 増殖抑制活性がみられたが、乙字湯一味欠処方エキスを試料としたアッセイにおいては、去黄芩、去甘草処方も乙字湯とほぼ同等の増殖抑制活性を示し、去大黄でのみ増殖抑制活性が減弱した (Figure 3)。以上のことから、乙字湯の *C. difficile* 増殖抑制活性には、主に大黄が寄与していることが示唆された。

次に *C. difficile* に対して増殖抑制活性がみられた大黄、黄芩、甘草について、濃度依存性を検討した。いずれの生薬も、濃度依存的に *C. difficile* に対して増殖抑制活性を示したが、特に大黄の活性が強く、2 mg/mL の濃度では乙字湯と同等の抑制活性を示した (Figure 4)。また、最も活性の強い大黄に関しては、同様の濃度で他の菌に関しても検討したところ、複数の菌において濃度が高くなるほど増殖抑制傾向がみられ、2 mg/mL の濃度では、*L. acidophilus*, *B. catenulatum* を除く全ての菌に対して増殖抑制活性を示した (Figure 5)。

大黄、黄芩、甘草の *C. difficile* に対する協調的増殖抑制活性

本研究により、大黄、黄芩、甘草は *C. difficile* に対して協調して抑制活性を示すこと、その中心を大黄が担っていることが示唆されたため、これらの生薬の協調作用について確認した。大黄、黄芩、甘草の 3 つの生薬のうち、2 つを組み合わせた試料を Table 1 の濃度で調製し、*C. difficile* に対する影響を調べたところ、大黄、黄芩、甘草は単独ではそれぞれ control と比較して 56.6%、69.8%、72.0% の増殖度であったのに対し、大黄と黄芩、大黄と甘草、黄芩と甘草の組み合わせは、それぞれ 21.4%、28.4%、66.9% の値であった (Figure 6)。これらは、黄芩と甘草の組み合わせは協調的な抑制活性を示さないが、大黄と黄芩、大黄と甘草の組み合わせは、協調的 (相加的) に増殖抑制活性を示す、という Figure 2 の結果から予想される推測を裏付ける結果となった。以上より、乙字湯の *C. difficile* 増殖抑制活性は、大黄を中心として黄芩、甘草が協調することにより発揮されることが示された。

D. 考察

本研究では、乙字湯が腸内細菌 (*C. difficile*, *C. perfringens*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. catenulatum*) の増殖に与える影響を調べた。その結果、乙字湯は *Clostridium* 属、特に *C. difficile* に対する強い抑制活性をもつ一方、*L. reuteri*, *L. acidophilus*, *B. catenulatum* に対しては増殖促進活性をもつことを見出した。下痢や便秘は、腸内細菌叢のバランスの乱れ (有害菌の増加や有用菌の減少) が原因であることが多い^{1,2)}。乙字湯が便秘や痔に対する効能を発揮する機序の一つとして、腸内細菌叢のバランスの乱れを改善することが考えられる。また、*Clostridium* 属の中でも *C. difficile* に対して特に強い増殖抑制活性がみられたことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に

増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。

乙字湯の上記に示した活性に、構成生薬がどのように寄与しているのかを調べたところ、*C. difficile*に対する増殖抑制活性には、大黄、黄芩、甘草が、また *Lactobacillus* 属や *B. catenulatum* の増殖促進活性には、主に当帰や黄芩が寄与していることが明らかとなった。本研究では、*C. difficile* に対する増殖抑制活性について更に検討を行い、活性の中心を大黄が担っていることを示した。大黄は、便秘に対する緩下薬として、東南アジアやヨーロッパ等世界でも幅広く使用されている生薬である。その主な活性成分として、sennoside 類が知られているが、これらはそれ自体では瀉下活性を示さず、*Bifidobacterium* や *Peptostreptococcus* 等の腸内細菌により rhein anthrone に変換されてはじめて活性を示すことが報告されている^{3,4)}。しかし、一方で、大黄の長期服用により有用菌を含む腸内細菌の減少が懸念されており、実際に *in vitro* の実験において、大黄は有用菌である *Bifidobacterium adolescentis* に対して抗菌活性があることが報告されている⁵⁾。我々の実験においても、大黄単独では、*B. adolescentis* を含む複数の菌に対して増殖抑制活性を示した (Figure 5) が、大黄を含む 6 つの生薬からなる乙字湯は、上述の通り、有害菌である *Clostridium* 属に対して強く増殖抑制活性を示す濃度においても、有用菌である *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属に対しては増殖に影響を与えない又は増殖促進活性を示した。この腸内細菌叢のバランスを考える上で優れた活性は、複数の生薬が協調することにより発揮されており、複数の生薬から構成される漢方処方の特徴を表していると考えられる。

大黄を始め、黄芩、甘草にはそれぞれ濃度依存的な *C. difficile* 増殖抑制活性がみられることが明らかとなったが、本研究ではその活性成分については検討をしていない。これまでの報告では、大黄の含有成分のうち、アントラキノン類は複数

の菌に対して増殖を抑制することが知られており⁶⁻⁸⁾、特に腸内細菌に対しては、rhein が *Bacteroides fragilis* に、rhein, emodin, aloe-emodin, chrysophanol, physcion が *Bifidobacterium adolescentis* に対して抗菌作用があることが報告されている^{5,9)}。また、黄芩に関しては、baicalin や baicalein 等のフラボノイド¹⁰⁻¹²⁾、甘草に関しては、glycyrrhizol A や grabrene 等のフラボノイドの他、ベンゾフラン誘導体、カルコノイド等¹³⁻¹⁸⁾の、複数の菌に対する抗菌活性が報告されている。以上のことから、大黄、黄芩、甘草の *C. difficile* に対する増殖抑制活性にも、アントラキノンやフラボノイドが寄与している可能性が考えられ、活性を担う化合物の同定には今後の検討が必要である。

また、興味深いことに、大黄と黄芩、大黄と甘草の組み合わせは、協調的 (相加的) に *C. difficile* に対して増殖抑制活性を示したが、黄芩と甘草の組み合わせは協調的な抑制活性を示さなかった。この選択的な協調作用機構に関しても、それぞれの生薬の活性成分を同定し、更に検討を行うことで議論できる可能性があると考えられる。さらに、黄芩が *Clostridium* 属に対して増殖抑制活性を示す一方で、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の一部の菌に対しては増殖促進活性を示すことに関して、同一の成分が菌の種類により相反する作用を発揮するのか、あるいは異なる成分がそれぞれの活性に寄与するのかにも興味を持たれる。

E. 結論

一般用漢方処方の有効性及び安全性に関する研究の一環として、本研究では、乙字湯が 7 種の腸内細菌 (*Clostridium* 属 2 種、*Lactobacillus* 属 2 種、*Bifidobacterium* 属 3 種) の増殖に与える影響を調べた。その結果、乙字湯は、*Clostridium* 属、特に *C. difficile* (抗生物質投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属及び

Bifidobacterium 属の一部に対しては増殖促進活性を示すことが明らかとなった。また、*C. difficile* に対する増殖抑制活性を担う構成生薬は、大黄、黄芩、甘草であり、これらは大黄を中心として協調して活性を示すことが判明した。以上のことから、乙字湯が便秘や痔に対する効能を発揮する機序の一つとして、腸内細菌叢のバランスの乱れを改善することが考えられる。また、*Clostridium* 属の中でも *C. difficile* に対して特に強い増殖抑制活性がみられたことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

桑田幸恵、勢ノ康代、袴塚高志、合田幸広、新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討 (15) 腸内細菌 *Clostridium difficile* の増殖を抑制する漢方処方について、日本生薬学会第 60 回年会、2013 年 9 月 (当別)

2. 誌上発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) Khalif, I.L., Quigley, E.M.M., Konovitch, E.A., Maximova, I.D.: Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Digest. Liver Dis.*, **37**, 838-849 (2005)
- 2) Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Pecere, S., Forte, F., Gasbarrini, A.: Bacterial flora as a cause or treatment of chronic diarrhea. *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, **41**, 581-602 (2012)
- 3) Hattori, M.: Metabolism of crude drug components by intestinal flora. *Bifidus*, **5**, 27-40 (1991)
- 4) Hattori, M.: Intestinal bacteria play a significant role in the medicinal effects of Kampo medicines. *J. Intestinal. Microbiol.*, **26**, 159-169 (2012)
- 5) Wang, J., Zhao, H., Kong, W., Jin, C., Zhao, Y., Qu, Y., Xiao, X.: Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum Palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis*. *Phytomedicine*, **17**, 684-689 (2010)
- 6) Kuibing, G., Lihua, S., Weining, L., Chuangang, L., Yan, W.: Four compounds of anthraquinone in *Rheum officinale* on *Helicobacter pylori* inhibition. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **32**, 278-280 (1997)
- 7) Babu, K.S., Srinivas, P.V., Praveen, B., Kishore, K.H., Murty, U.S., Rao, J.M.: Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*, **62**, 203-207 (2003)
- 8) Lu, C., Wang, H., Lv, W., Xu, P., Zhu, J., Xie, J., Liu, B., Lou, Z.: Antibacterial properties of anthraquinones extracted from rhubarb against *Aeromonas hydrophila*. *Fish. Sci.*, **77**, 375-384 (2011)
- 9) Cyong, J., Matsumoto, T., Arakawa, K., Kiyohara, H., Yamada, H., Otsuka, Y.: Anti-*Bacteroides fragilis* substance from rhubarb. *J. Ethnopharmacol.*, **19**, 279-283 (1987)
- 10) Ng, T.B., Ling, J.M.L., Wang, Z.T., Cai, J.N., Xu, G.J.: Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *General Pharmacol.*

- 27, 1237-1240 (1996)
- 11) Wu, J., Hu, D., Wang, K.X.: Study of *Scutellaria baicalensis* and baicalin against antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains *in vitro*. *Zhong. Yao. Cai.*, **31**, 707-710 (2008)
- 12) Lu, Y., Joerger, R., Wu C., Study of the chemical composition and antimicrobial activities of ethanolic extracts from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 10934-10942 (2011)
- 13) Demizu, S., Kajiyama, K., Takahashi, K., Hiraga, Y., Yamamoto, S., Tamura, Y., Okada, K., Kinoshita, T.: Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: Isolation and structure elucidation of a new benzofran derivative. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3474-3479 (1998)
- 14) Okada, K., Tamura, Y., Yamamoto, M., Inoue, Y., Takagaki, R., Takahashi, K., Demizu, S., Kajiyama, K., Hiraga, Y., Kinoshita, T.: Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjiang origin. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2528-2530 (1989)
- 15) Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T.: Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sci.*, **71**, 1449-1463 (2002)
- 16) Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T.: Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, **73**, 536-539 (2002)
- 17) Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T.: Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**, 2047-2055 (2005)
- 18) He, J., Chen, L., Heber, D., Shi, W., Lu, Q.Y.: Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *J. Nat. Prod.*, **69**, 121-124 (2006)

Table 1 Yields of extracts of Otsujito and its component herbs.

	Amount of herb(s) (a daily dose) (g)	Amount of extract (a daily dose) (g)	Final concentration for assay (mg/mL)
Otsujito (OTT)	18.5	4.84	10.00
Angelicae Radix (AR)	6.0	2.11	4.14*
Bupleuri Radix (BR)	5.0	0.67	1.32*
Schtellariae Radix (SR)	3.0	1.33	2.60*
Glycyrrhizae Radix (GR)	2.0	0.43	0.83*
Cimicifugae Rhizoma (CR)	1.5	0.33	0.64*
Rhei Rhizoma (RR)	1.0	0.24	0.47*
Otsujito without AR (NAR)	12.5	2.93	6.05
Otsujito without BR (NBR)	13.5	4.29	8.86
Otsujito without SR (NSR)	15.5	3.64	7.52
Otsujito without GR (NGR)	16.5	4.49	9.28
Otsujito without CR (NCR)	17.0	4.46	9.21
Otsujito without RR (NRR)	17.5	4.66	9.62

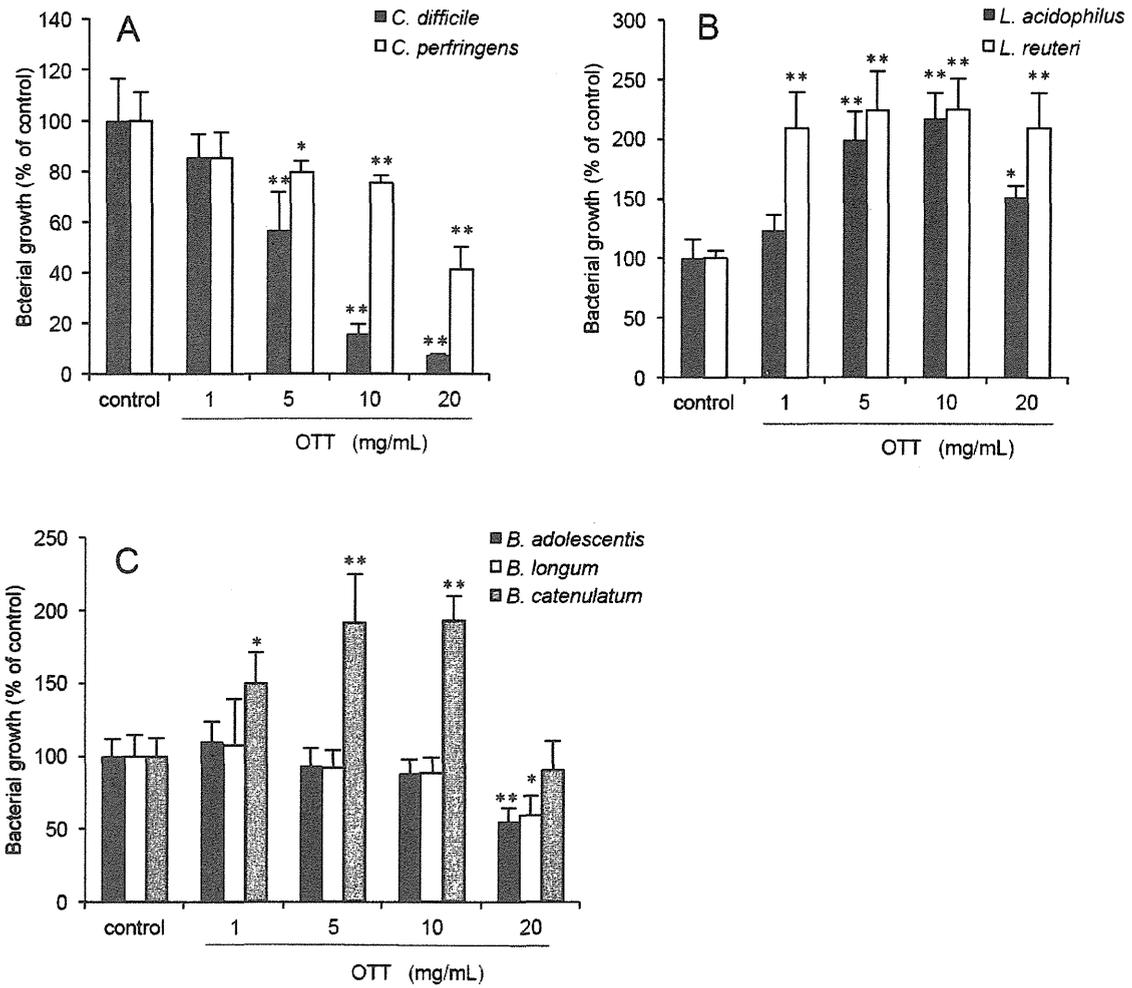


Figure 1 Effects of Otsujito (OTT) on the growth of intestinal bacterium. Bacterium used in this assay was (A) *Clostridium*, (B) *Lactobacillus*, and (C) *Bifidobacterium*. Each alue represents the means \pm SD (n=4). The statistical significance was determined by Dunnett's test. $P < 0.05$, $**P < 0.01$ versus control, which was normalized to 100%.

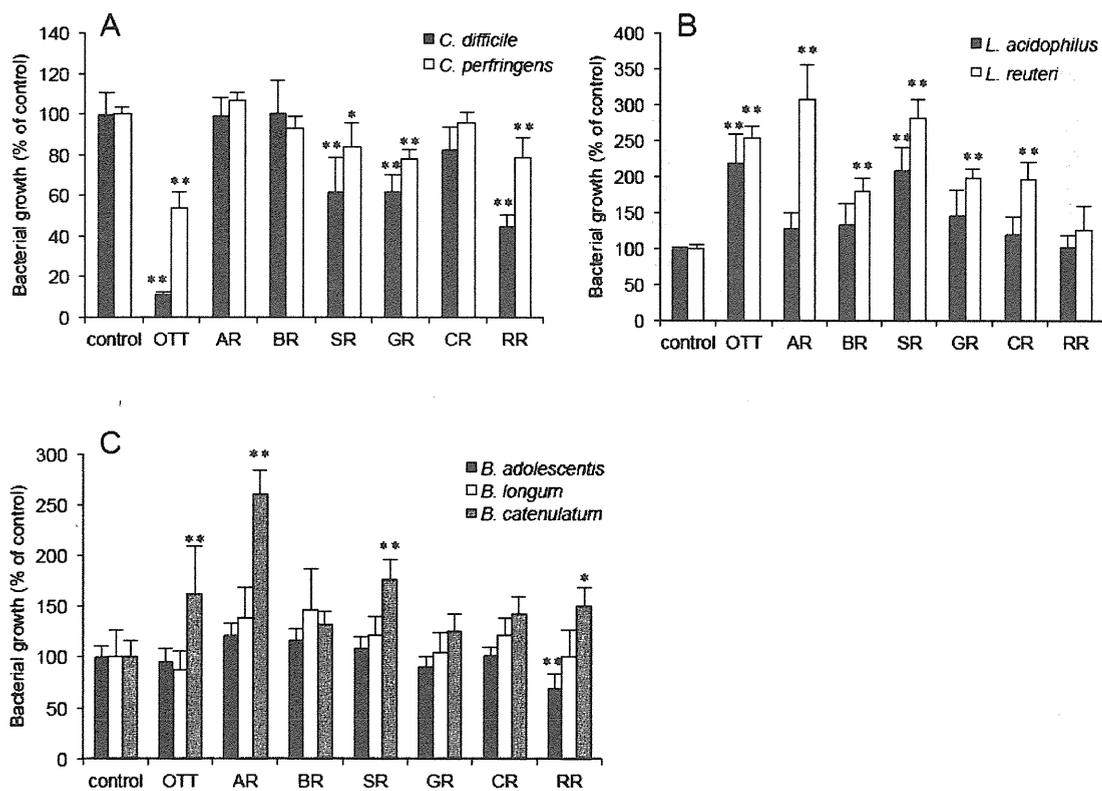


Figure 2 Effects of component crude drugs of Otsujito (OTT) on the growth of intestinal bacterium. Each concentration of Angelicae Radix (AR), Bupleuri Radix (BR), Schtellariae Radix (SR), Glycyrrhizae Radix (GR), Cimicifugae Rhizoma (CR), and Rhei Rhizoma (RR) is shown in Table 1. Bacterium used in this assay was (A) *Clostridium*, (B) *Lactobacillus*, and (C) *Bifidobacterium*. Each value represents the means \pm SD (n=4). The statistical significance was determined by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control, which was normalized to 100%.