

腸内菌酵素による生薬成分の代謝と活性化

赤尾 光昭,^{a)}服部 征雄,^{b)}難波 恒雄,^{c)}小橋 恭一^{a)}

^{a)}富山医科薬科大学薬学部衛生化学, ^{b)}富山医科薬科大学和漢薬研究所細胞資源工学,
^{c)}富山医科薬科大学和漢薬研究所資源開発

Metabolic activation of crude drug components by
intestinal bacterial enzymesTeruaki AKAO,^{a)} Masao HATTORI,^{b)} Tsuneo NAMBA^{c)} and Kyoichi KOBASHI^{a)}

^{a)}*Hygienic and Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical
and Pharmaceutical University*

^{b)}*Cell-resources Engineering, Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

^{c)}*Development for Natural Drug Resources, Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical
and Pharmaceutical University*

Abstract

We reviewed metabolism of the main constituents of crude drugs such as glycyrrhizin, sennosides, paeoniflorin, geniposide and barbaloin by the enzymes obtained from human intestinal bacteria. These components are all glycosides such as β -D-glucuronide, β -D-glucoside and C-glucoside, and are considered to be little absorbed or not absorbed from the intestine and to reach lower bowels abundant in intestinal bacteria. They are first hydrolyzed to give the respective aglycones by hydrolases of intestinal bacteria such as β -D-glucuronidase, β -D-glucosidase and C-glucosidase, though they are not metabolized by liver enzymes. Some aglycones are sequentially reduced by oxidoreductases of intestinal bacteria. Through our investigations we discovered new strains of bacteria from human feces and novel types of enzymes from intestinal bacteria, relating metabolism of the constituents of crude drugs. In conclusion, we found that the constituents were not active by themselves but transformed to active principles by bacterial enzymes in gut.

Key words intestinal bacterial enzyme, metabolism, glycyrrhizin, sennoside, paeoniflorin, geniposide, barbaloin, β -glycosidase.

はじめに

和漢薬の特徴は、「方剤(多成分)」を患者の「証」に応じて「経口服用」することである。しかしながら、これらについての科学的な裏付けはほとんどなされていない。これらの特徴の中で、私たちは和漢薬が「経口服用」されることに注目し、和漢薬に含まれる生薬成分の腸内細菌による代謝を研究課題として取り上げてきた。経口投与された生薬成分は消化管内に入れば必ず腸内細菌叢と接し、また、いっ

たん吸収されたとしても、そのまま、またはその代謝物の一部が胆汁排泄され、再び腸内細菌叢と遭遇する。したがって、これら生薬成分は腸内細菌叢により代謝を受けると考えられる。ところで、大部分の生薬成分について、その体内動態すなわち吸収、分布、代謝、排泄(ADME)などの研究は少なく、当然、多成分系の和漢薬を用いた場合、どの成分が作用しているのか(バイオアベイラビリティ)についての知見はほとんど無いに等しい。その上、体内動態に及ぼす腸内細菌の役割に関する研究はきわめて少ない(新薬でもあまり行なわれていない)。

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-01, Japan

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 9, 1-13, 1992

そこで私たちは、まず和漢薬方剤として汎用されている主要生薬中に含まれる主成分のうち、有効成分と考えられているが、未だその作用機構が完全には解明されていない成分（多成分系ではなく単一成分）について、ヒト腸内細菌による代謝研究を行ってきた。一連の研究から、これらの成分は腸内細菌、すなわち腸内細菌が産生する代謝酵素により変換され、初めて薬効を発現しているプロドラッグであることを示唆する結果を得ている。さらに、この天然のプロドラッグを活性化する酵素反応の多くが新しい酵素反応であることが見出されてきた。今回、ヒト腸内細菌由来の代謝酵素による生薬成分の変換、さらにこれら酵素の性質を中心に概説する。

1. グリチルリチンの代謝

甘草は漢方処方半数以上に含まれる代表的生薬で、グリチルリチンはその主有効成分である。その薬効は抗アレルギー、抗炎症、抗ウイルス、ステロイド様作用など多くの作用が知られており、現在治療薬として用いられている。また、しょ糖の150倍以上の甘味物質で、食品添加物としても大量に使用されている。

グリチルリチンの研究は数多くなされているにもかかわらず、*in vitro*での「ふりかけ実験」が大部分で、経口投与後の吸収排泄、体内代謝についての研究は少ない。最近になり、経口投与後グリチルリチンがほとんど吸収されないこと（バイオアベイラビリティは1%以下）が周知の事実となりつつある。また、グリチルリチン経口投与後アグリコンであるグリチルレチン酸が血中に出現することから、¹⁾腸内で代謝変換後、吸収されることが示唆され

る。一方、近年の*in vivo*, *in vitro*での多くの薬理作用実験から、グリチルリチンよりグリチルレチン酸にその直接作用があることが明らかになりつつある。また、よく知られているグリチルリチン投与による偽アルドステロン症もグリチルレチン酸によることが明らかとなっている。²⁾

私たちが、腸内細菌によるグリチルリチンの代謝研究を始めた頃は、グリチルリチンは胃で吸収され肝臓で代謝されるものと考えられていた。ところが、私たちが調べたところ、ラット肝臓でグリチルリチンはグルクロン酸が1つだけ外れたモノグルクロニド体に代謝されるが、グリチルレチン酸への代謝活性は非常に弱いものであった。さらに、ヒトの肝臓でも、モノグルクロニド体までの代謝活性は認められたがグリチルレチン酸までの活性は全く検出されなかった (Table I)³⁾。すなわち、動物のリゾソーム局在性の β -グルクロニダーゼにはグリチルリチンをそのモノグルクロニド体へ水解する活性を有するが、このモノグルクロニド体をさらにグリチルレチン酸へ水解する能力が無いまたは非常に弱いことが明らかとなった。

この肝臓での研究に先立ち、私たちはヒト腸内細菌叢によりグリチルリチンがグリチルレチン酸へ水解され、さらに3-ケト体を経て3-エピ体へ代謝変換されることを認めた (Fig. 1)⁴⁾。さらに、これら代謝に関わる腸内細菌種をヒト糞便より分離した。^{5,6)}

グリチルリチンをグリチルレチン酸へ代謝変換する菌種は、ヒト腸内で優性の偏性嫌気性菌属 *Eubacterium* (本菌を *Eubacterium* sp. GLH と名付けた) で、 β -グルクロニダーゼ活性を有してい

Table I GL-, GAMG- and pNPG-hydrolyzing activities of animal lysosomes.

Source of hepatic* lysosomes	Hydrolyzing activities (nmol/min/mg)			GL→GAMG/ pNPG→pNP
	GL→GAMG	GAMG→GA	pNPG→pNP	
Mouse	0.439±0.028**	0.055±0.009**	5.12±0.42**	0.086
Rat	0.607±0.068**	0.225±0.032**	24.3 ±3.99**	0.025
Cattle	0.075	0.055	5.05	0.015
Pig	0.863±0.119**	ND	1.20±0.09**	0.68
Human				
Male 1	1.52	ND	7.30	0.21
Male 2	1.54	ND	8.88	0.17
Female 1	0.96	ND	4.16	0.23

* Livers of three male mice (5 weeks old), six male rats (10 weeks old) and three male pigs (6 months old) and a liver of one adult cattle were homogenized individually, and each lysosomal fraction was prepared.

** Means±SD.

ND : not detected.

GL : glycyrrhizin, GAMG : glycyrrhetyl monoglucuronide, GA : glycyrrhetic acid, pNPG : *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide, pNP : *p*-nitrophenol.

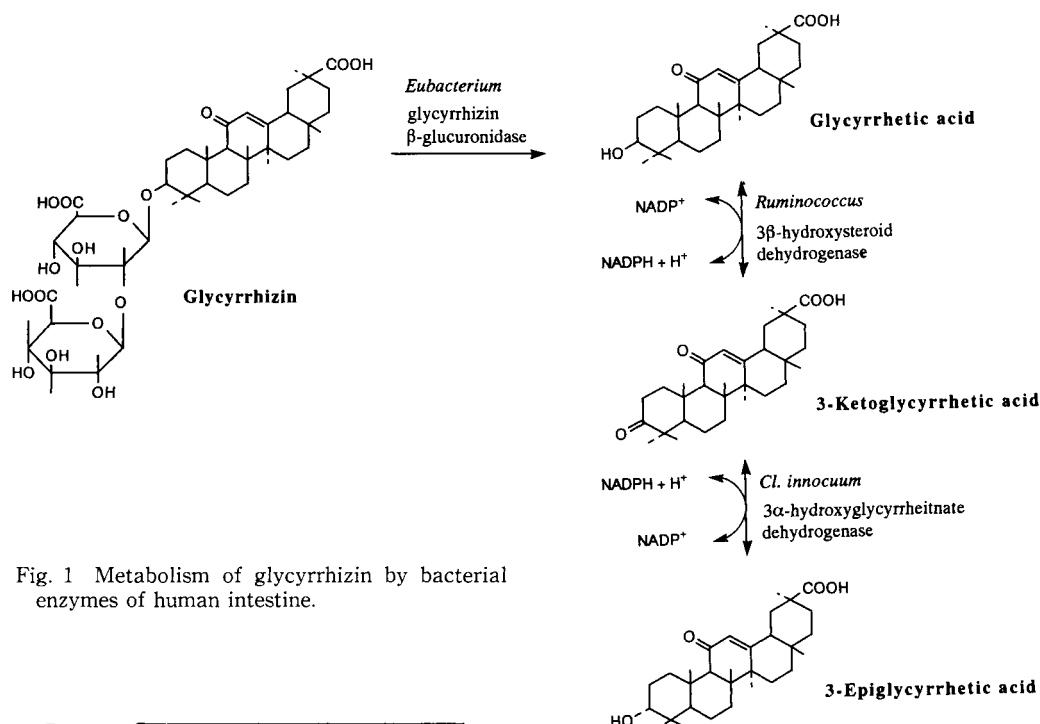


Fig. 1 Metabolism of glycyrrhizin by bacterial enzymes of human intestine.

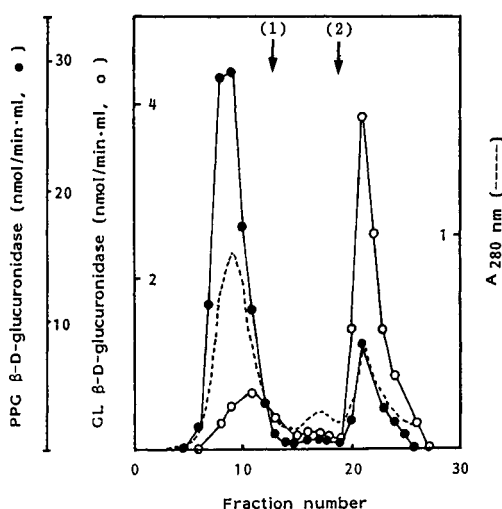


Fig. 2 Octyl-Sepharose column chromatography of β-D-glucuronidases for glycyrrhizin (GL) and phenolphthalein monoglucuronide (PPG).

A partially purified enzyme solution from *Eubacterium* sp. GLH was applied on an Octyl-Sepharose column. After being washed with 10 ml of 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.5) containing 50 mM NaCl, the column was eluted with 6 ml of 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.5) containing 10 mM NaCl (arrow 1) and then 20 ml of 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.5) (arrow 2).

た⁶⁾ *Escherichia coli* など他の腸内細菌種も β-グルクロニダーゼを持つことはよく知られているが、*E. coli* の β-グルクロニダーゼではグリチルリチンは水解されず、β-グルクロニダーゼ活性を有する他の多くの腸内細菌種でもグリチルリチンは代謝されなかった。*Eubacterium* sp. GLH より β-グルクロニダーゼを精製したところ、本菌には 2 種の β-グルクロニダーゼが存在し、そのうちの 1 つのみ、グリチルリチン水解活性が認められた (Fig. 2)。両酵素の分子量、等電点が同じであったことより、これら酵素は性質がよく類似しているが、基質特異性は異なっていた。グリチルリチンを水解する酵素は、グリチルリチン水解活性が高いことから、グリチルリチン β-グルクロニダーゼと名付けた。本酵素はその諸性質より新規酵素と考えられる。本酵素が腸内でのグリチルリチンのグリチルレチン酸への変換、その後の吸収に関わっていることが無菌ラットに *Eubacterium* sp. GLH を感染させ、常在化させることによって明らかにしている。

ところで興味深いことには、本菌の培養時にグリチルリチンを添加すると本酵素が誘導され、さらに本菌の増殖が促進されることがわかった⁷⁾。したがって、ヒト腸内細菌叢の培養時にグリチルリチンを添

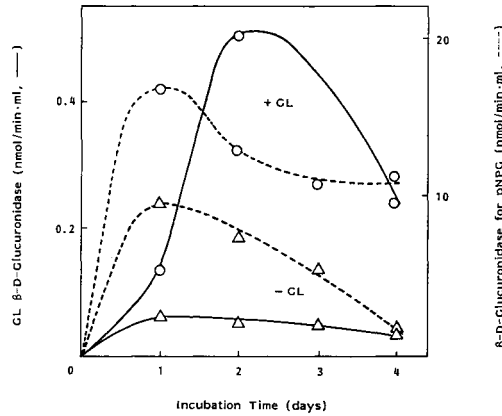


Fig. 3 Effects of glycyrrhizin (GL) on GL-hydrolyzing activities of human intestinal flora.

Human feces obtained were immediately diluted at 10-fold series, and then an aliquot (0.1 ml) of 10^3 -fold diluent was inoculated into 100 ml of GAM broth with (○) or without (△) 1.2 mM GL. pNPG: p-nitrophenyl β-D-glucuronide.

加すると著しくグリチルリチン水解活性が促進される (Fig. 3)。この事実はグリチルリチンを飲み続けるとグリチルリチン代謝菌および水解活性がヒト腸内で増大してくることを示唆している。

ついで、グリチルレチン酸の 3β-水酸基を 3-ケ

ト基に可逆的に変換できる *Ruminococcus* sp. POI-3 より、酸化還元酵素を精製した⁸⁾。本酵素は胆汁酸およびステロイド化合物の 3β-水酸基および 3-ケト基を酸化還元する 3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素で、弱いながらグリチルレチン酸およびその 3-ケト体を可逆的に酸化還元する。本酵素は 3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素群のうち、特に A 環に 2 重結合のない胆汁酸やステロイド化合物のみを基質とする新酵素である (Table II)。ところで、ラット肝ミクロソームにもグリチルレチン酸およびそのケト体を可逆的に酸化還元する活性が認められ、部分精製された⁹⁾。したがって、腸内においてグリチルリチンから生じたグリチルレチン酸は吸収前そして吸収後、さらに 3-ケト体へと代謝変換されることになる。しかしながら、両酵素とも還元活性の方が酸化活性より高いこと、腸内および肝とも還元状態であることを考えると、3-ケト体はすみやかにグリチルレチン酸に戻されることになる。ところで、ラット肝ミクロソームの酵素は雄特異的で、雌には検出されない¹⁰⁾。偽アルドステロン症は女性で現われやすい¹¹⁾ので、グリチルレチン酸代謝酵素に雌雄差が認められることは興味深い事実である。

3-ケトグリチルレチン酸を 3-エピ体へ代謝する *Clostridium innocum* ES24-06 から代謝酵素 3α-

Table II Properties of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase.

Substrate specificity	
Oxidation	Glycyrrhetic acid (3β-(OH) GA) 3β-Hydroxyl groups of bile acids and steroids having no double bonds of A/B ring
Reduction	3-Ketoglycyrrhetic acid (3-ketoGA) 3-Ketonic groups of bile acids and steroids having no double bonds of A/B ring
Km	2.2×10^{-5} M for 3β-(OH) GA, 3.5×10^{-7} M for 3-ketoGA, 2.6×10^{-7} M for NADP ⁺ , 1.1×10^{-5} M for NADPH
pH optimum	8-9 for oxidation, 5-6 for reduction
Molecular weight	90000

Table III Properties of 3α-hydroxyglycyrrhetinate dehydrogenase.

Substrate specificity	Oxidation of 3α-hydroxyglycyrrhetic acid (3α-(OH) GA) Reduction of 3-ketoglycyrrhetic acid (3-ketoGA) No other substrates
Km	2.2×10^{-7} M for 3α-(OH) GA, 1.0×10^{-7} M for 3-ketoGA, 2.7×10^{-7} M for NADP ⁺ , 2.4×10^{-5} M for NADPH
pH optimum	8-9 for oxidation, 6 for reduction
Molecular weight	53000 (subunit : 30000)
Isoelectric point	5.2

ヒドロキシグリチルレチン酸脱水素酵素を均一にまで精製した¹²⁾。本酵素は3-エピグリチルレチン酸および3-ケト体を可逆的に酸化還元する酵素であるが、現在まで、これ以外の基質は見つかっておらず (Table III), 新酵素である。一方、土壌細菌 *Pseudomonas testosteroni* の3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が3-エピグリチルレチン酸と3-ケト体との酸化還元反応を触媒する。しかし、ラット肝臓には3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素が存在するにもかかわらず、3-エピグリチルレチン酸と3-ケト体との可逆的反応は認められなかった。一方、ラット肝ミクロソームには3-エピグリチルレチン酸を3-ケト体に酸化する活性が存在し、この反応はシトクローム P-450 によると考えられる。¹³⁾したがって、腸内でグリチルリチンからグリチルレチン酸を経て産生された3-エピグリチルレチン酸は吸収後、3-ケト体を経て再びグリチルレチン酸に戻るようになる。ところで、吸収後肝へ入ったグリチルレチン酸はミクロソームのシトクローム P-450 により水酸化される。ラットでは2種類の代謝物が明らかにされていて、22 α -および24-水酸化物である。¹⁴⁾さらに、3-ケト体および3-エピ体も水酸化される。これら反応は、グリチルレチン酸の排泄、不活性化に関与しているものと考えられる。

以上、グリチルリチンの代謝変換には、まず腸内細菌酵素によるグリチルレチン酸への水解が必須で、

続いて吸収前に腸内細菌酵素により、さらに吸収後、肝臓の酵素により種々の反応が進行するが、グリチルレチン酸が体内で主要な薬理作用を発揮することが示唆される。はじめに述べたように、グリチルリチンの作用として明らかにされている抗炎症および偽アルドステロン症がいずれもグリチルレチン酸によることが明らかになりつつある現在、ますます腸内細菌 (酵素) の重要性が認識される。

2. センノサイドの代謝

大黃およびセンナの主瀉下成分センノサイドは静注では効果がなく、経口投与して初めて作用が発現すること、さらに、腸内細菌を持たない無菌動物では、センノサイドを経口投与しても下痢しないことから、センノサイド自身には瀉下作用はなく、腸内細菌による代謝産物が活性本体であると考えられてきた。

私たちは、ラットおよびヒト糞便由来の腸内細菌叢により、Fig. 4 に示すように、センノサイドはアグリコンであるセニジンを経てレインアンスロンに代謝変換されることを明らかにした。^{15,16)}事実、腸内細菌の代謝産物レインアンスロンに直接の瀉下作用があることが証明されている。¹⁷⁾センノサイドは β -グルコサイド (配糖体) であるので、当然、腸内細菌由来の β -グルコシダーゼにより水解されセニジンを生じると考えられた。しかしながら、センノサイドはアーモンドの β -グルコシダーゼ、さらに私

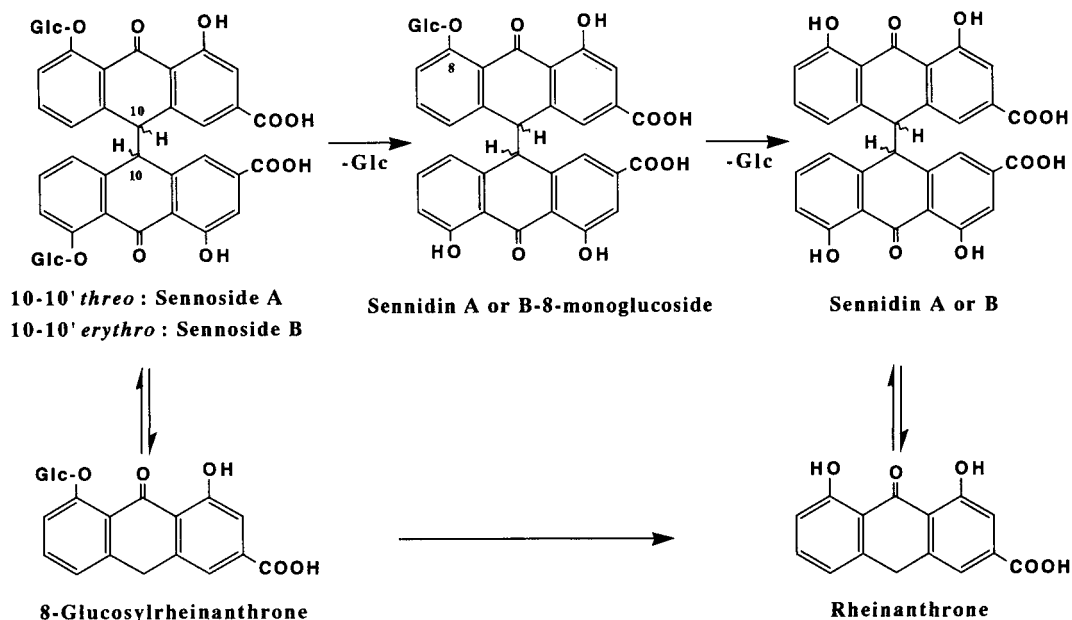


Fig. 4 Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria.

たちが腸内菌より分離した β -グルコシダーゼで全く水解されず、その上強力な β -グルコシダーゼ活性を有する多くの腸内分離株でもセンノサイドはセニジンへ代謝されなかった。¹⁸⁾ 一方、先程述べたように、腸内細菌叢によりセンノサイドがセニジンに変換することから、センノサイドを水解するユニークな β -グルコシダーゼを産生する腸内細菌種が存在するはずである。最近、私たちはヒト糞便よりセンノサイド代謝菌を分離し、本菌が *Bifidobacterium* 属 (*Bifidobacterium* sp. SEN と名付けた) で、センノサイドをセニジンモノグルコシドを経てセニジンへ水解することを見出した。¹⁹⁾ まだ酵素レベルでの研究は進んでいないが、本菌が新規な β -グルコシダーゼを産生し、本酵素がセンノサイドの活性化に必須であると考えている。センノサイドが吸収されにくいこと、さらに、ラット肝の β -グルコシダーゼはセンノサイドを水解しないことも腸内細菌 (酵素) の重要性を示唆している。また、本酵素反応は律速反応であり、したがってヒトにおけるセンノサイドの下剤活性の個体差は *Bifidobacterium* sp. SEN の腸内菌数とその本酵素活性に基づくものと推定される。それではセニジンから真の瀉下成分レインアンスロンへの変換はどうなっているのだろうか。この代謝変換は、先のセンノサイドからセニジンへの代謝とは異なり、大多数の腸内細菌種に認められる。¹⁵⁾ 代謝能の強い *Peptostreptococcus intermedius* から代謝酵素を精製したところ、本酵素によるセニジン還元活性は電子供与体として NADH を、さらに FAD や FMN を要求した (Table IV)。すなわち、

Table IV Reduction of sennidin A and sennidin B by the purified enzyme.

Addition	Reduction rate(nmol/min·ml)	
	Sennidin A	Sennidin B
None	0	—
FAD (80 μ M)	150	160
FMN (80 μ M)	120	110
Benzyl viologen(8 mM)	1230	1420

The reaction mixture contained 4 mM NADH, enzyme, one of 2 mM substrates indicated above and none or one of the additives listed in the first column. The enzyme preparation, which was purified by Sephadex G-200 Column chromatography and DEAE-cellulose column chromatography steps, contained 1.7 mg of protein per ml of the reaction mixture.

本酵素は NADH-フラビン還元酵素であった。²⁰⁾ その後の研究で、セニジンは NADH 存在下本酵素により生じた還元型フラビンにより非酵素的にレインアンスロンへ還元されることが明らかとなった (Fig. 5)。²¹⁾ ところで、センノサイドも弱いながら腸内細菌または還元型フラビンにより 8-グルコシルレインアンスロンへ還元されることから、センノサイドが 8-グルコシルレインアンスロンを経てレインアンスロンへ代謝変換される経路も存在すると思われる (Fig. 4)。セニジンからレインアンスロンへの還元反応は酸素により強く阻害されることから、本反応は嫌気条件下の消化管下部においてのみ進行するものと考えられる。したがって、胃や小腸で吸収されず、酸および消化酵素に耐性で消化管下部に到達したセンノサイドは、センノサイド水解菌

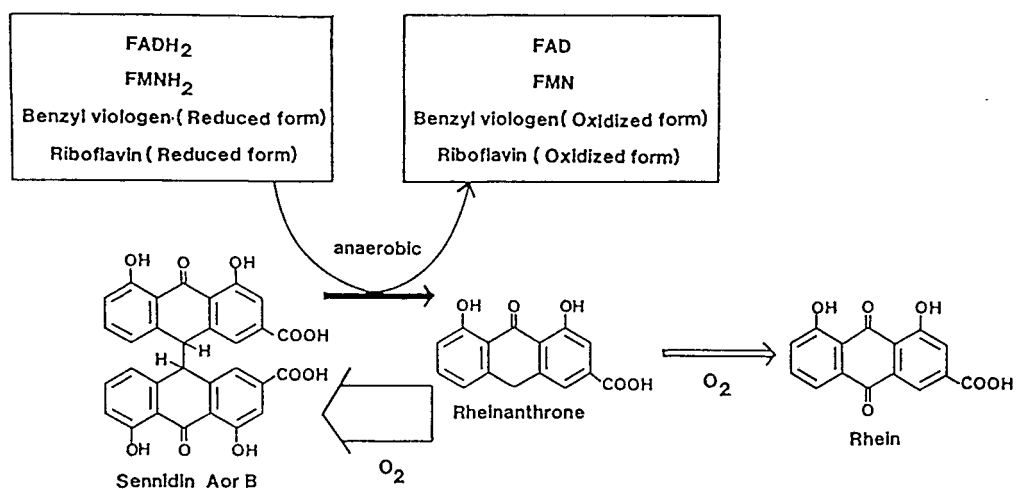


Fig. 5 Non-enzymic reactions of sennidins.

Bifidobacterium やフラビン還元酵素産生菌である偏性嫌気性菌により真の瀉下活性本体レインアンソロンへ変換される。すなわち、代謝活性化が作用部位で進行することを考えると、センノサイドはターゲティングを兼ね備えている巧妙に作られた天然のプロドラッグと言える。

3. ペオニフロリンの代謝

芍薬は収斂、鎮痙、緩和薬として使用され、その主成分としてモノテルペン配糖体であるペオニフロリンが含まれている。しかし、いまだに芍薬の薬効について成分を用いての薬理作用からの説明は不十分である。

センノサイド同様ペオニフロリンも β -グルコサイドであるが、やはりアーモンドの β -グルコシダーゼで水解されない。しかしながら、私たちの研究

から、ペオニフロリンはヒト腸内細菌叢、さらに多数の腸内分離菌株により容易に代謝されることが判明した。²²⁾ ペオニフロリンの腸内細菌による主代謝産物(ペオニメタボリンIおよびII)は、その構造解析より Fig.6 のように決定され、それぞれ7S体と7R体の混合物であった。これらの代謝物の生成機構は、まず β -グルコシダーゼによりグルコースが外れる反応が第一段階と考えられる (Fig.6)。²³⁾ 事実、グルコシダーゼの特異的阻害剤ノジリマイシンで腸内細菌の β -グルコシダーゼを阻害すると、ペオニフロリンの代謝は完全に抑制された。この際、 β -グルコシダーゼが阻害されてもエステラーゼ活性は保たれていたこと、また、私たちが腸内細菌より精製したエステラーゼでペオニフロリンが水解されなかったことより、ペオニフロリン中のベンゾイ

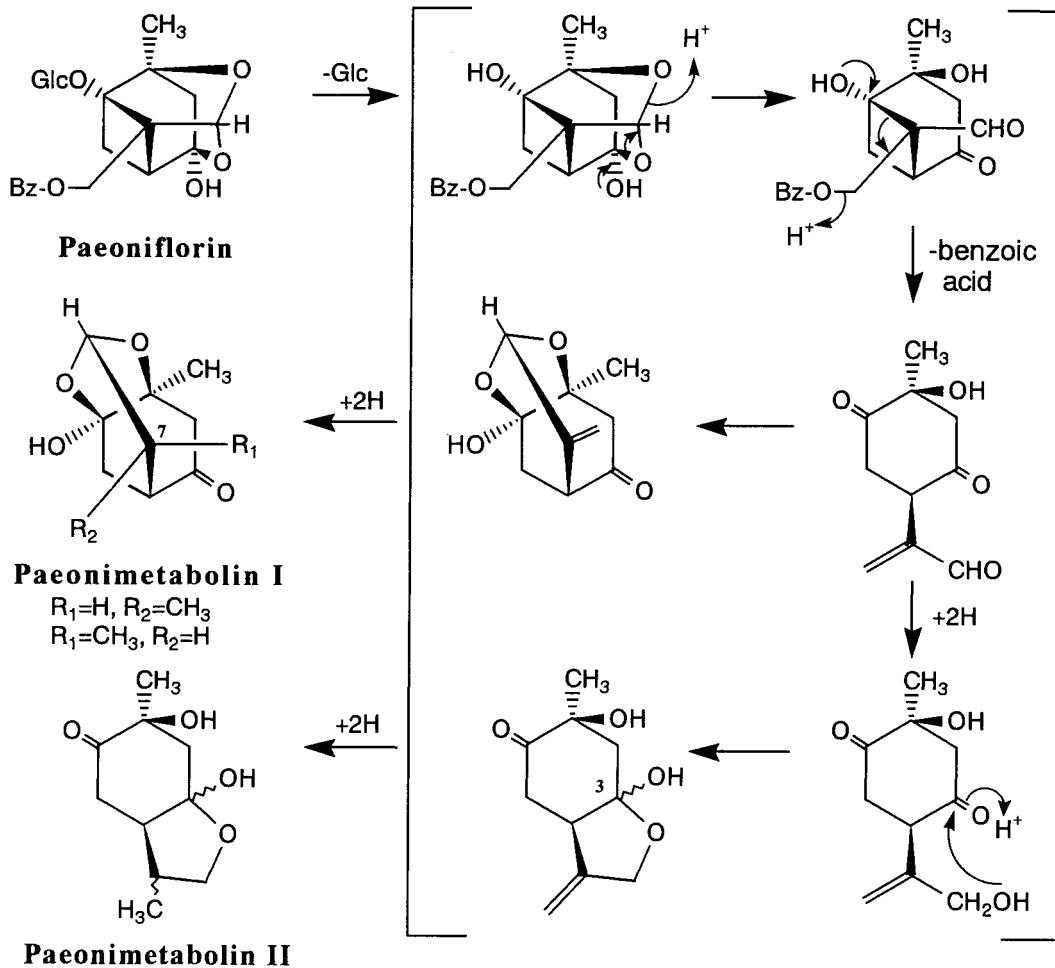


Fig. 6 Metabolism of paeoniflorin by human intestinal bacteria.

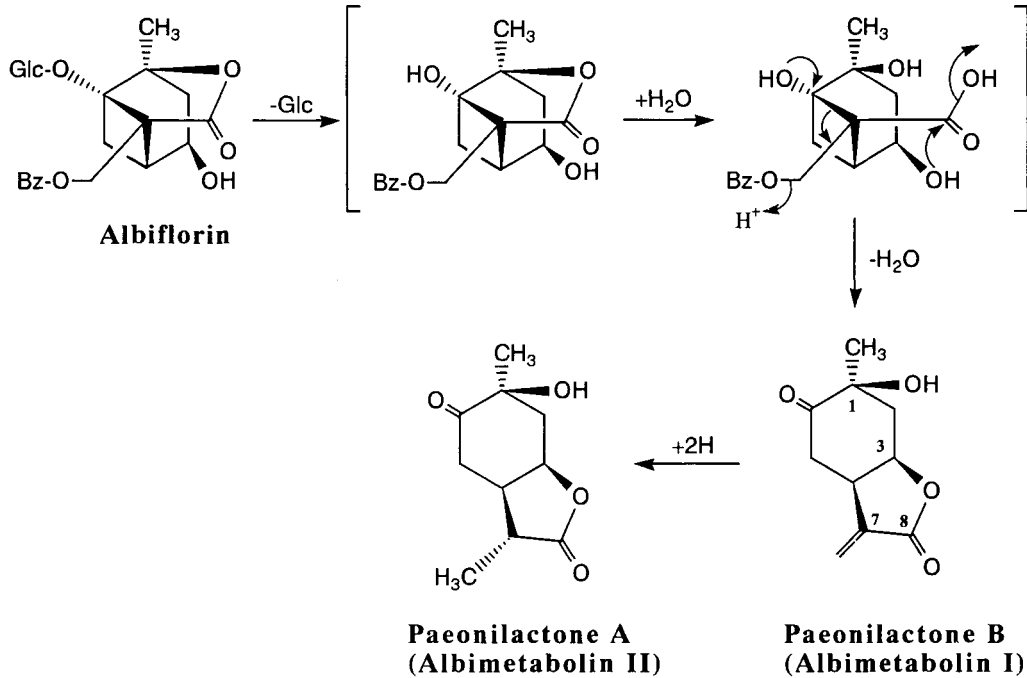


Fig. 7 Metabolism of albiflorin by human intestinal bacteria.

ルエステルは、脱グルコシル化後はじめて水解されることが示唆される。未だこの腸内細菌中の β -グルコシダーゼの精製ができていないが、その理由として、ペオニフロリンの水解能を有する β -グルコシダーゼが膜結合型で遊離され難いことに起因している。

いずれにしても、ペオニフロリンがラット肝の β -グルコシダーゼで水解されないことから、ペオニフロリンの代謝についても、腸内細菌酵素が重要な役割を演じていることは明白である。さらに、先のセノサイドの結果からも、腸内細菌叢には複数のユニークな β -グルコシダーゼを含む、多種類の β -グルコシダーゼが存在することが示唆される。

次に、脱ベンゾイル化反応の後、ペオニメタボリン I および II への代謝変換に還元反応が起こっているものと考えられる。しかし、中間体を SH 化合物の付加物として取ることに成功したが²⁴⁾、真の中間体を得ていないので、酵素レベルでの研究は行なっていない。興味深いことは、主な腸内細菌代謝物、(7S)-ペオニメタボリン I に、ペンチレンテトラゾールによる遺伝性癲癇マウス (E1 マウス) の痙攣性強直の拮抗作用 ($ED_{50}=41.3 \text{ mg/}\mu\text{g i.v.}$) が認められ、その作用がペオニフロリン ($ED_{50}=100 \text{ mg/}$

kg 以上, i. v.) より強かったこと、さらに、本代謝物の十二指腸内および脳室内投与、いずれにおいても痙攣脳波を抑制したことである。

ところで、芍薬のもう一つの主要なモノテルペン配糖体であるアルビフロリンも、ペオニフロリン同様 β -グルコシダーゼによる水解、ついでエステル水解さらに還元反応が進行することを明らかにしている (Fig. 7)²⁵⁾。

4. ゲニポサイドの代謝

イリドイドおよびセコイリド配糖体は、山梔子、竜胆、センブリなどの各種生薬中に主成分として含まれている。山梔子に含まれるゲニポサイドは利胆作用、抗肝炎作用などが知られていて、その利胆作用は経口では認められるが静注しても効果がなく、アグリコンであるゲニピンの静注により利胆作用が認められることから、本作用はゲニポサイド自身ではなく、腸内細菌による代謝物ゲニピンによる²⁶⁾と考えられている。

ゲニポサイドは他のイリドイドおよびセコイリド配糖体同様、アーモンドの β -グルコシダーゼにより容易に水解され、アグリコンであるゲニピンに変換する。また、腸内細菌叢、大多数の腸内細菌種によっても容易にゲニピンを生じる (Fig. 8)。

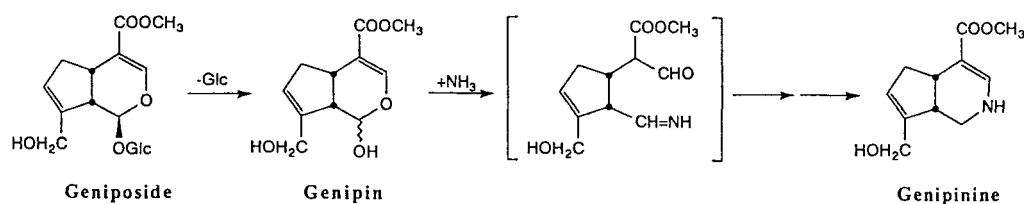
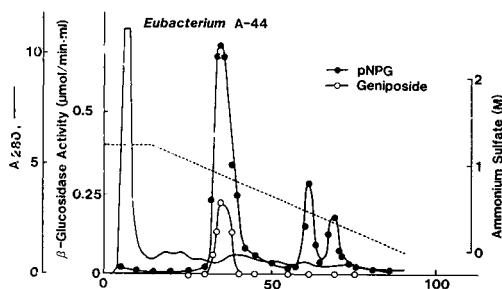


Fig. 8 Metabolism of geniposide by human intestinal bacteria.

しかしながら、ラット肝の β -グルコシダーゼでは水解されないことから、動物体内におけるゲニポサイドの代謝、すなわち活性化には腸内細菌酵素が重要な役割を演じていることは明らかである。ゲニポサイドの β -グルコサイドは水解されやすいことから、各種腸内細菌中に含まれる多くの β -グルコシダーゼがゲニポサイドを水解すると思われる。事実、ゲニポサイドは先のペオニフロリンを水解する膜結合型酵素の他に、細胞質に局在する β -グルコシダーゼ(センノサイドおよびペオニフロリンを水解できない)によっても水解される。

ヒト腸内優性菌 *Eubacterium* 属の細胞質内には3種類の β -グルコシダーゼが存在したが、そのうち2種にはゲニポサイド水解活性がほとんど認められず、1種類のみ強い水解が認められた (Fig. 9).²⁷⁾

Fig. 9 Butyl-Toyopearl column chromatography of β -glucosidase.

Extract from *Eubacterium* sp. A-44 was adjusted to 1.2 M ammonium sulfate and then applied on a Butyl-Toyopearl column. After being washed with 1.2 M ammonium sulfate in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), the column was eluted with a gradient from 1.2 to 0 M ammonium sulfate.

したがって、先に述べたように腸内細菌中には多種類の異なる基質特異性を有する β -グルコシダーゼが存在し、経口服用した生薬配糖体を水解し、それぞれ対応するアグリコンを生成する。逆に、腸内細

菌の立場としては、多くの生薬配糖体の β -グルコサイドは、動物の消化酵素で水解されずそのまま腸内細菌の棲みかである消化管下部にまで到着し、栄養源として糖部をお互いに取り合いしているものと思われる。

ところで、ゲニピンは腸内細菌叢とのインキュベーションにより、さらにアルカロイド(ゲニピニン)へ変換される。²⁸⁾これは酵素反応というより、ゲニピンのアセタール部分の開裂、次いでジアルデヒドとアンモニア分子(腸内細菌由来)とのシッフ塩基の生成後、環化により形成されたものと思われる (Fig. 8)。このような腸内細菌による新しいアルカロイド生成は、ゲニポサイド以外にアウクピン、ガルテノサイドなどのイリド配糖体でも観察され、ヒト腸内においても新規アルカロイドが生成されているものと考えられることから、これら新規アルカロイドの薬理作用に興味もたれる。

5. バルバロインの代謝

アロエ中に含まれる瀉下成分バルバロインは、アロエエモジンアンスロンにグルコースがC-C結合しているC-配糖体である。センノサイドと比べ、小動物での瀉下作用が弱く、ヒトで強く現われるといわれている。その作用機構はいまだ不明であるが、動物種による瀉下力価の著しい差異、さらにアグリコンであるアロエエモジンアンスロンに直接的な瀉下作用が知られていることから、その作用発現にはセンノサイド同様、腸内細菌叢によるバルバロインのアロエエモジンアンスロンへの活性化が必要であると考えられる。

バルバロインのC-グルコサイドは、通常の β -グルコサイドであるO-グルコサイドに比べ、酸、アルカリに耐性で、アーモンドおよび先に述べた腸内細菌由来の β -グルコシダーゼで全く水解されない。しかし、ラットやマウスの腸内細菌叢でのバルバロイン代謝活性は弱かったが、ヒト腸内細菌叢によりアロエエモジンアンスロンに変換され (Fig. 10)、腸内細菌中にC-グルコサイドのC-C結合を

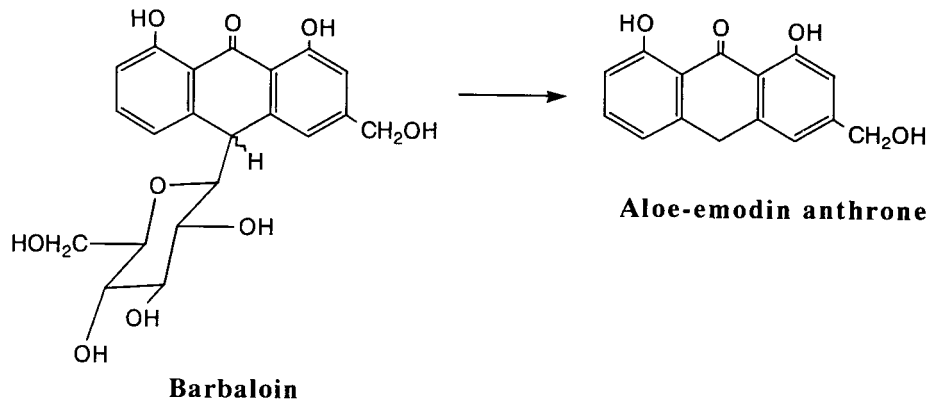


Fig. 10 Bacterial cleavage of C-glucosyl bond of barbaloin.

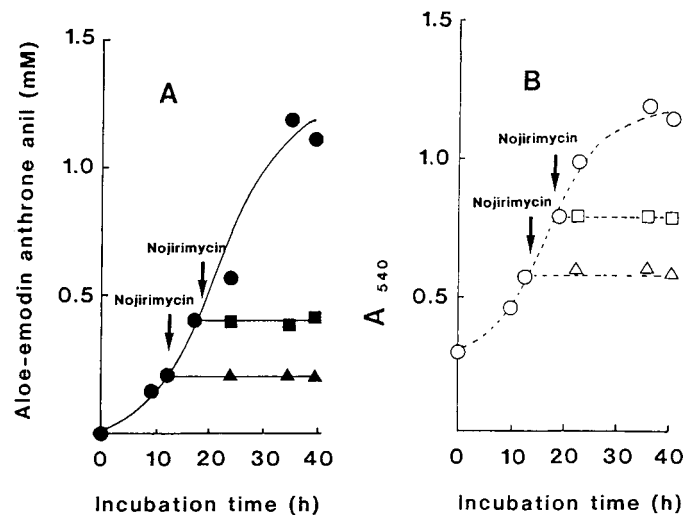


Fig. 11 Correlation between barbaloin cleavage and bacterial growth.

Eubacterium sp. BAR was cultured in PYF broth containing 0.5 mg/ml barbaloin. After cultivation for 11 h and 17 h (arrows), 2×10^{-4} mM nojirimycin bisulfate was added to the medium. Amounts of aloe-emodin anthrone (A) were determined as adducts (anil) with N, N'-dimethyl-*p*-nitrosoaniline and bacterial growth (B) was measured as turbidity at 540 nm.

開裂する酵素の存在が示唆された。²⁹⁾さらに私たちは、ヒト糞便よりバルバロインのC-C結合を開裂する代謝菌 *Eubacterium* 属 (*Eubacterium* sp. BAR と名付けた) を単離することに成功した。³⁰⁾多くのヒト腸内分離菌株、さらにヒト糞便由来の多数のコロニーには、バルバロイン代謝能が認められなかったことは、本代謝菌は珍しい菌種と思われる。本菌の代謝能は、培養液中へのグルコース添加で抑制されることから、バルバロイン代謝酵素は誘導酵素で、その誘導がグルコースで抑制されたものと考えられ

る。³¹⁾また、本代謝活性がグルコシダーゼの阻害剤ノジリマイシンで阻害されることから (Fig. 11)、本代謝酵素がC-C結合を水解する新規なグルコシダーゼである可能性が高い。この際、ノジリマイシンにより本菌の増殖も強く阻害されたことから、本菌はバルバロインの糖部を栄養源として増殖していると考えられる。本酵素は菌体より抽出可溶化できないことから、膜結合型であると考えられる。

バルバロインの他にも、生薬成分中に多くのC-配糖体が知られていて、センブリのフラボノイドC-

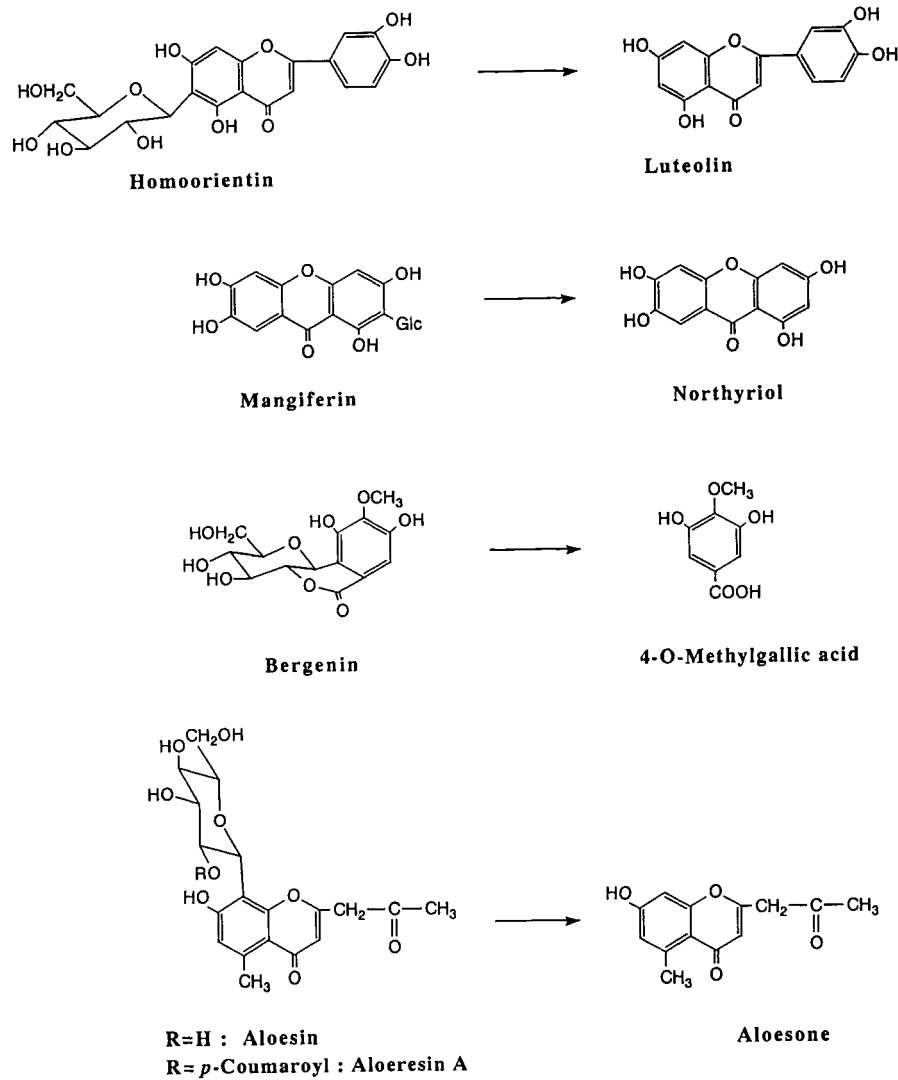


Fig. 12 Metabolism of other C-glycosides by human intestinal bacteria.

グルコサイドであるホモオリエンチン、チレッタ草のキサントン C-グルコサイドであるマンギフェリン、赤升麻の没食子酸 C-グルコサイドであるベルゲニン、アロエのクロモン C-グルコサイドであるアロエシンおよびアロエレシン A のいずれもが、ヒト腸内細菌叢によりそれらの C-C 結合が開裂することを見出している (Fig. 12)³²⁻³⁴⁾ これらの代謝酵素についての研究は、いまだ代謝菌が単離されていないことから、今後の課題である。

おわりに

和漢薬方剤に汎用されている主要生薬 (甘草, 大黃, 芍薬, 山梔子, アロエ) に含まれる主成分 (グリチルリチン, センノサイド, ペオニフロリン, ゲニポサイド, バルバロイン) のヒト腸内細菌, すなわち腸内細菌が産生する酵素による代謝について述べた。これら成分は糖部がグルクロン酸またはグルコースであったり, または, グルコースが C-C 結合していたりと異なるが, すべて配糖体である。水

に溶けやすい配糖体は一般に吸収されにくく（パイオアベイラビリティが低い）、また、糖の結合が β 結合であるため、ヒトの消化酵素による攻撃も受けない。したがって、そのまま消化管下部にまで到達し、必然的に腸内細菌と遭遇することになる。腸内細菌にとって美味しい（貴重な）栄養物であるこれら β -配糖体からアグリコンを除き糖部分を食べるために、腸内細菌は β -グルコシダーゼや β -グルクロニダーゼなどの加水分解酵素を産生している。人間にとっては、アグリコンが薬理作用を持てば有効物質となり、副作用を示せば有害物質（発癌作用など）となる。すなわち、これら β -配糖体は、これら自身には直接的な薬理作用があるとは考えにくく、プロドラッグと考える方が妥当である。興味あることは、これら β -配糖体がユニークな構造（アグリコン部）を持つことから、その加水分解にユニークな酵素が必要で、そのことが私たちに新規酵素の発見に導いたものと思われる。さらに、これらユニークな酵素を産生する腸内細菌の棲息の有無が和漢薬の薬効発現の個人差「証」と結び付けば、和漢薬のもう一つの特徴に科学的に攻め込めるのではと考えている。加水分解酵素である β -グルコシダーゼや β -グルクロニダーゼは発見が最も古い酵素群であるため、現在あまり研究されていないが、生薬成分の代謝酵素としては古くて新しい酵素群と考えられる。ところで、私たちは水解産物であるアグリコンが引き続き還元を受ける反応を見出し、これら酸化還元酵素も扱うことになった。消化管下部は嫌気状態で、棲息しているのは嫌気性菌であるため、還元反応が主要な反応の一つで、すなわち（酸化）還元酵素がこれら反応を触媒している。セニジン還元酵素は瀉下活性本体レインアンスロンを生成し、薬物の活性化に関わっていた。

結局、私たちは腸内細菌に特徴的な酵素を扱ってきたことになる。このような腸内細菌に特徴ある酵素により、生薬成分（プロドラッグ）が活性化され薬効を表わすという知見は、数千年にわたって使用されてきた和漢薬の奥の深さを知らされたように思われる。

文 献

- 1) 中野直子, 加藤弘巳, 鈴木英彦, 中尾皖英, 矢野三郎, 金岡又雄: グリチルレチン酸およびグリチルリチンの酵素免疫測定法 (第2報) - 血中グリチルレチン酸, グリチルリチンの測定 - 薬理と治療 8, 4171-4174, 1980.
- 2) Monder, C., Stewart, P.M., Lakshmi, V., Valentino, R., Burt, D. and Edwards, C.R.W.: Licorice inhibits corticosteroid 11 β -dehydrogenase of rat kidney and liver: *in vivo* and *in vitro* studies. *Endocrinology* 125, 1046-1052, 1989.
- 3) Akao, T., Akao, T., Hattori, M., Kanaoka, M., Yamamoto, K., Namba, T. and Kobashi, K.: Hydrolysis of glycyrrhizin to 18 β -glycyrrhetyl monoglucuronide by lysosomal β -D-glucuronidase of animal liver. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1025-1029, 1991.
- 4) Hattori, M., Sakamoto, T., Kobashi, K. and Namba, T.: Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora. *Planta Med.* 48, 38-42, 1983.
- 5) Akao, T., Akao, T. and Kobashi, K.: Glycyrrhizin β -D-glucuronidase of *Eubacterium* sp. from human intestinal flora. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 705-710, 1987.
- 6) Hattori, M., Sakamoto, T., Yamagishi, T., Sakamoto, K., Konishi, K., Kobashi, K. and Namba, T.: Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora. II. Isolation and characterization of human intestinal bacterium capable of metabolizing glycyrrhizin and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 210-217, 1985.
- 7) Akao, T., Akao, T. and Kobashi, K.: Glycyrrhizin stimulates the growth of *Eubacterium* sp. strain GLH, a human intestinal anaerobe. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2027-2030, 1988.
- 8) Akao, T., Akao, T., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K.: 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase of *Ruminococcus* sp. from human intestinal bacteria. *J. Biochem.* 99, 1425-1431, 1986.
- 9) Akao, T., Akao, T. and Kobashi, K.: Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes; glycyrrhetinate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1042, 241-246, 1990.
- 10) Akao, T., Akao, T., Aoyama, M. and Kobashi, K.: Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes-III. Male-specific glycyrrhetinate dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 42, 103-107, 1991.
- 11) Horwich, L. and Galloway, R.: Treatment of gastric ulceration with carbenoxolone sodium: clinical and radiological evaluation. *Br. Med. J.* 2, 1274-1277, 1965.
- 12) Akao, T., Akao, T., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K.: Purification and properties of 3 α -hydroxyglycyrrhetinate dehydrogenase of *Clostridium innocuum* from human intestine. *J. Biochem.* 103, 504-507, 1988.
- 13) 青山宗夫, 赤尾光昭, 金岡又雄, 森佳洋, 小橋恭一: ラット肝臓によるグリチルレチン酸代謝 V. 3-エピグリチルレチン酸の3-ケトグリチルレチン酸への変換. 日本薬学会第110年会, 講演要旨集 3, p.17, 1990.
- 14) Akao, T., Aoyama, M., Akao, T., Hattori, M., Imai, Y., Namba, T., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Kobashi, K.: Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes. II. 22 α - and 24-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 40, 291-296, 1990.
- 15) Hattori, M., Kim, G., Motoike, S., Kobashi, K. and Namba, T.: Metabolism of sennoside by intestinal flora. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 1338-1346, 1982.

- 16) Hattori, M., Namba, T., Akao, T. and Kobashi, K. : Metabolism of sennoside by human intestinal bacteria. *Pharmacology* **36**, Suppl. 1, 172-179, 1988.
- 17) Sasaki, K., Yamauchi, K. and Kuwano, S. : Metabolic activation of sennoside A in mice. *Planta Med.* **37**, 370-378, 1979.
- 18) Kobashi, K., Nishimura, T., Kusaka, M., Hattori, M. and Namba T. : Metabolism of sennoside by human intestinal bacteria. *Planta Med.* **40**, 225-236, 1980.
- 19) 赤尾光昭, 楊 凌, 小橋恭一, 車 慶明, 服部征雄, 難波恒雄: ヒト腸内センノサイド代謝菌の分離. 日本薬学会第112年会, 講演要旨集 2, p.11, 1991.
- 20) Akao, T., Akao, T., Mibu, K., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K. : Enzymic reduction of sennidin and sennoside in *Peptostreptococcus intermedius*. *J. Pharmaco-bio Dyn.* **8**, 800-807, 1985.
- 21) Akao, T., Mibu, K., Erabi, T., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K. : Non-enzymatic reduction of sennidins and sennosides by reduced flavin. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1998-2003, 1987.
- 22) Hattori, M., Shu, Y. -Z., Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kobashi, K., Xu, G. and Namba, T. : Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3838-3846, 1985.
- 23) Shu, Y. -Z., Hattori, M., Akao, T., Kobashi, K., Kakei, K., Fukuyama, K., Tsukihara, T., Namba, T. : Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria. II. Structures of 7S- and 7R-paeonimetabolins I and II formed by *Bacteroides fragilis* and *Lactobacillus brevis*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3726-3733, 1987.
- 24) Akao, T., Shu, Y. -Z., Matsuda, Y., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K. : Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria, IV. Formation and structures of adducts of a metabolic intermediate with sulfhydryl compounds by *Lactobacillus brevis*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3043-3048, 1988.
- 25) Hattori, M., Shu, Y. -Z., Kobashi, K. and Namba, T. : Metabolism of albiflorin by human intestinal bacteria. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* **2**, 398-404, 1985.
- 26) Aburada, M., Takeda, S., Shibata, Y. and Harada M. : Pharmacological studies of *Gardenia* fruit. III. Relationship between *in vivo* hydrolysis of geniposide and its choleric effect in rats. *J. Pharmaco-bio Dyn.* **1**, 81-88, 1978.
- 27) 小橋恭一, 赤尾光昭, 油田正樹: 腸内細菌によるゲニボサイドの代謝 - β -グルコシダーゼによる水解-. 和漢医薬学会誌 **5**, 400-401, 1988.
- 28) Kawata, Y., Hattori, M., Akao, T., Kobashi, K. and Namba, T. : Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta Med.* **57**, 536-542, 1991.
- 29) Hattori, M., Kanda, T., Shu, Y. -Z., Akao, T., Kobashi, K. and Namba, T. : Metabolism of barbaloin by intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 4462-4465, 1988.
- 30) Che, Q. -M., Akao, T., Hattori, M., Kobashi, K. and Namba, T. : Isolation of a human intestinal bacterium capable of transforming barbaloin to aloe-emodin anthrone. *Planta Med.* **57**, 15-19, 1991.
- 31) Che, Q. -M., Akao, T., Hattori, M., Tsuda, Y., Namba, T. and Kobashi, K. : Barbaloin stimulates growth of *Eubacterium* sp. strain BAR, a barbaloin-metabolizing bacterium from human feces. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 757-760, 1991.
- 32) Hattori, M., Shu, Y. -Z., El-Sedawy, A. I., Namba, T., Kobashi, K. and Tomimori, T. : Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.* **51**, 874-878, 1988.
- 33) Hattori, M., Shu, Y. -Z., Tomimori, T., Kobashi, K. and Namba, T. : A bacterial cleavage of the C-glycosyl bond of mangiferin and bergenin. *Phytochemistry* **28**, 1289-1290, 1989.
- 34) Che, Q. -M., Akao, T., Hattori, M., Kobashi, K. and Namba, T. : Metabolism of aloesin and related compounds by human intestinal bacteria : A bacterial cleavage of the C-glycosyl bond and the subsequent reduction of the acetyl side chain. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 704-708, 1991.