

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K20148

研究課題名（和文）腸管内胆汁酸代謝に影響を及ぼす食事・生活性因子の解明

研究課題名（英文）Effects of habitual dietary and life-style factors on bile acid metabolism in the intestinal tract

研究代表者

齋藤 瑛介 (Saito, Yosuke)

広島国際大学・健康科学部・講師

研究者番号：60760080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本横断研究は排便状況、腸内細菌叢、習慣的食事が便中胆汁酸（BA）組成に及ぼす影響について検討した。クラスター解析により、便中BAを4つのパターンに分類することができた。一次BAの高値は特異な腸内細菌叢と関連した。細胞毒性を持つ二次BAの高値は動物性脂質の増加と、排便頻度および不溶性繊維の減少と関連した。縮小ランク回帰分析により、便中BA濃度と関係する2つの食事パターンを生成した。葉物と根菜類の摂取は一次から二次BAへの微生物変換に影響を与える可能性が示された。エネルギー摂取源を洋菓、牛豚肉、卵などの脂質の多い食品から米などの低脂質穀類へシフトすることで、二次BA濃度が低下する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸管内胆汁酸代謝の制御を目指した。腸管内胆汁酸代謝は大腸癌、炎症性腸疾患、胆石症、肝臓癌の発症と進展に関与している。さらに胆汁酸はシグナル伝達としても作用しており、糖代謝と脂質代謝に関与している。腸管内胆汁酸代謝の制御が可能となればこれら疾患の予防と治療の戦略となる。大腸がんは世界で3番目に多い癌で、罹患率と死亡率は今後増加すると予想されている。さらに大腸がんの再発率は高く、外科治療は患者のQOLに悪影響を及ぼす。大腸がんの予防戦略を確立することは極めて重要で急務と言える。本研究結果は特に習慣的な食事を変更することで、腸管内胆汁酸代謝をコントロールできる可能性があることを示している。

研究成果の概要（英文）：This cross-sectional study in healthy young adults examined the effects of defecation status, intestinal microbiota, and habitual diet on fecal bile acid (BA) composition. Cluster analysis classified fecal BA into four patterns. High levels of primary BA were associated with distinctly different intestinal microbiota. High levels of cytotoxic secondary BA were associated with increased animal fats and decreased defecation frequency and insoluble fiber. Reduced-rank regression analysis generated two dietary patterns associated with fecal BA concentrations. Leafy and root vegetable intake could influence microbial conversion from primary to secondary BA. Shifting energy intake sources from fatty foods such as Western sweets, beef, pork, and eggs to low-fat cereals such as rice could decrease secondary BA concentrations.

研究分野：臨床栄養

キーワード：腸管内胆汁酸代謝 腸内細菌叢 排便頻度 動物性脂質 不溶性食物繊維 Clostridium cluster XIVa  
食事パターン 糞便中胆汁酸濃度

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は世界で3番目に多い癌であり、大腸癌の罹患率と死亡率は今後増加すると予想されている。さらに大腸癌の再発率は高く、大腸癌手術は患者のQOLに悪影響を及ぼす。したがって大腸癌の予防戦略を確立することは極めて重要かつ急務である。大腸癌の罹患率には顕著な地域差があり、それは食生活の違いによって説明できる。しかし、食事に含まれる栄養素のほとんどは小腸で吸収され、大腸には流れ込まない。胆汁酸(BA)は、食事と大腸癌リスクの関係を説明する有力な候補である。

肝臓でコレステロールから合成される一次BAであるコール酸(CA)およびケノデオキシコール酸(CDCA)は、グリシンまたはタウリンによって抱合された後腸管に分泌され、食事性脂質を可溶化する役割を果たす。腸管に分泌された抱合型一次BAの一部は、腸内細菌によって段階的に修飾されるが、多くは回腸末端で再吸収されて肝臓に戻る(腸肝循環)。まず抱合型一次BAは、微生物の胆汁酸加水分解酵素によって脱抱合され、遊離型になる。遊離型は疎水性であるため、回腸末端での再吸収率が低い。遊離型の一次BAは、微生物酵素によってさらに7 $\alpha$ -デヒドロキシル化され、CAとCDCAは、それぞれ二次BAであるデオキシコール酸(DCA)とリトコール酸(LCA)に変換される。LCAはほとんど再吸収されずに糞便中に排泄されるが、一部のDCAは再吸収されて肝臓に運ばれ、胆汁プールに蓄積される。

DCAとLCAは腫瘍促進作用があり、有害なBAと考えられている。大腸癌患者や大腸癌高リスク者では、糞便中のDCA濃度が上昇している。さらに、BAはシグナル伝達分子としても機能する。消化管内で発現するGタンパク質共役型BA受容体1であるTGR5は、DCAとLCAに強く反応し、BAの代謝と腸管運動調節に関与している。ファルネソイドX受容体(FXR)はCDCAに強く反応し、BA合成を調節する。TGR5とFXRの発現と活性化低下は、細胞毒性、炎症、二次BA産生の増加と関連している。腸管におけるBA組成の変化は、TGR5とFXRの活性化に影響を及ぼし、腸の炎症反応の調節不全を引き起こし、持続的な炎症が大腸癌の発生を誘発する可能性がある。したがって、腸管におけるBA代謝をコントロールすることは、大腸癌発生と再発予防が期待できる。

### 2. 研究の目的

食事は、排便状況、BA、腸内細菌叢に影響を及ぼすことができる修正可能な因子である。排便状況、BA、腸内細菌叢は複雑に相互作用している。私たちは食事、排便状況、BA、および腸内細菌叢間に存在する関係性を明らかにすることを研究目的とした。残念ながら、これらの因子をすべて調査した研究はほとんどない。さらに、動物モデルを用いたBAの研究には大きな限界がある。具体的には、ラットの主な一次BAはCAと $\beta$ -ムリコール酸であるが、ヒトの主な一次BAはCAとCDCAである。したがって、ヒトでの研究がより適切である。この横断研究は、地域在住の若い参加者の糞便中BA組成、排便状況、腸内細菌叢、習慣的な食事状況を調査し関連を明らかにした。

### 3. 研究の方法

研究参加者から次の4つのデータを収集した：(1)糞便採取前1週間の排便状況の記録、(2)糞便中BA濃度(3)腸内細菌叢、(4)習慣的な食事摂取状況。研究期間中は、身体活動や食事摂取に制限を加えず普通に生活するよう指示した。

#### (1) 排便状況の記録

参加者は、糞便採取の1週間前からブリストルスケール(BSFS)を用いて排便状況を記録した。BSFSは、便の形態を7つのカテゴリーに分類するためにデザインされたツールで、タイプ1と2は硬便、タイプ6と7は水様便で、臨床および研究分野で広く使用されている。被験者はBSFSについての詳しい教育を受け、排便直後の便の形態を自己評価し記録した。参加者は、糞便を採取するまでこの記録を続けた。

#### (2) 糞便中BA濃度分析

参加者は1週間の排便記録後、都合のよい時に糞便を採取した。排泄されたすべての糞便は、専用の糞便採取カップに一度集められ、スプーンで数回かき混ぜた後、糞便を容器に入れ、保冷剤と一緒に保冷バッグに入れ、できるだけ早く研究者に提出された。提出された糞便サンプルは、使用するまで-80°Cで保存された。糞便中のBA濃度は、ハイブリッド四重極型飛行時間型質量分析計と組み合わせた液体クロマトグラフィー(LC-QTOF-MS)を用いて、株式会社テクノスルガラボで分析した。

### (3) 腸内細菌叢分析

糞便微生物叢は、BA 濃度分析と同一の糞便を用いて、株式会社テクノスルガラボにて、細菌の 16S rDNA を標的とした末端制限断片長多型 (T-RFLP) を用いて分析した。

### (4) 習慣的な食事摂取状況

直近 1 ヶ月の習慣的な食事は、簡易型自記式食事履歴質問票 (BDHQ) を用いて評価された。BDHQ には 58 種類の食品および飲料の摂取頻度に関する質問が含まれ、栄養摂取量は主に日本食品標準成分表に基づく BDHQ 独自のコンピュータアルゴリズムを使用して算出された。BDHQ は多くの栄養素のエネルギー調整摂取量について満足のいくランキング能力を有している。したがって栄養素および食品の摂取量は、エネルギー密度モデルを用いてエネルギー調整し、密度 (エネルギー摂取量 1000kcal あたり) として表した。

## 4. 研究成果

### (1) 糞便中胆汁酸と食事、排便状況、腸内細菌叢との関係性 (Saito et al. *Eur J Nutr* 62, 2023)

糞便中 BA 組成に基づいたクラスター解析により、参加者を 4 つに分類した。(Figure 1) CA と CDCA の濃度が高いクラスターを high-priBA とした。他の 3 つのクラスターは、DCA と LCA の濃度に基づいてそれぞれ low-secBA、medium-secBA、high-secBA とした。

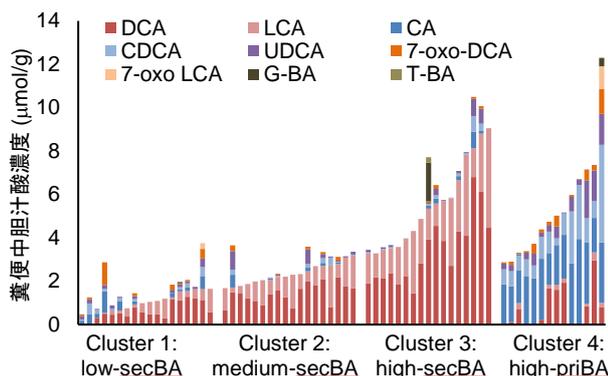


Figure 1. 参加者の糞便中胆汁酸のプロファイリング

#### ① 排便状況のクラスター間の比較

普通便の頻度は、low-secBA と high-priBA クラスターが、high-secBA クラスターよりも有意に高かった (Tukey's post hoc test,  $p = 0.015$ ,  $p = 0.011$ )。

#### ② 腸内細菌叢のクラスター間の比較

high-priBA クラスターにおける *Bacteroides* の相対存在量は、他の 3 つのクラスターよりも有意に低かった (Tukey's post hoc test,  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p = 0.003$ )。high-priBA クラスターでは、high-secBA クラスターよりも *Clostridium* cluster IV が有意に少なかった (Tukey's post hoc test,  $p = 0.009$ )。さらに、low-secBA クラスターと比較して、high-priBA クラスターでは *Clostridium* subcluster XIVa が有意に多かった (Games-Howell test,  $p = 0.029$ )。

#### ③ 習慣的な食事状況のクラスター間の比較

動物性タンパク質および動物性脂肪の摂取量は、low-secBA クラスター有意に少なかった。(ANOVA,  $p = 0.012$ ,  $p = 0.002$ ) 不溶性食物繊維の摂取量は high-priBA クラスターで有意に多かった (ANOVA,  $p = 0.022$ )。

#### ④ 糞便中胆汁酸と食事、排便状況、腸内細菌叢との関係性 (多変量解析)

排便状態、腸内細菌叢、習慣的な食事状況と糞便中 BA 組成との関連をよりよく解釈するために、BA クラスター間で有意差を示した 6 つの変数

(*Clostridium* cluster IV, *Bacteroides*, *Clostridium* subcluster XIVa, 普通便頻度、不溶性食物繊維、動物性脂肪) について主成分分析 (PCA) による次元削減を行った。動物性タンパク質は、その摂取が動物性脂肪の摂取と関連すると想定されたため除外した。PCA の結果、第 1 主成分 (PC1) は分散の 27.8% を説明し、第 2 主成分 (PC2) は 22.8% を説明した。PC1 の主要変数は *Clostridium* cluster IV、*Bacteroides*、*Clostridium* subcluster XIVa であり、PC1 は腸内細菌叢の構成要素と考えられた (Figure 2)。PC2 の主要変数は、正常な排便回数、動物性

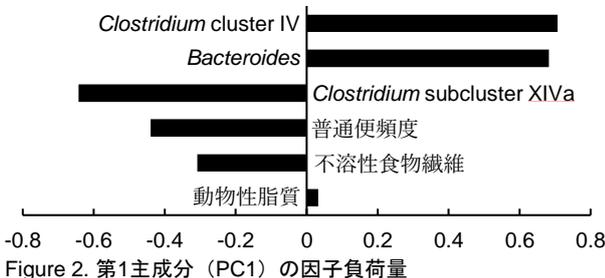


Figure 2. 第1主成分 (PC1) の因子負荷量

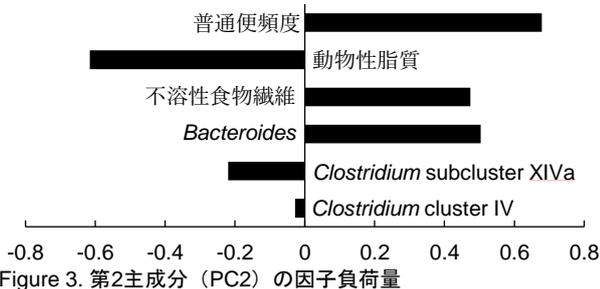


Figure 3. 第2主成分 (PC2) の因子負荷量

脂肪、不溶性食物繊維であったので、PC2は排便および食事状態の構成要素と考えられた (Figure 3)。

参加者のPC1とPC2の分布をBAクラスター別にプロットした図をFigure 4に示す。PC1のhigh-priBAクラスターは、他の3つのクラスターよりも有意に低かった (Tukey's post hoc test; high-priBA vs. low-secBA,  $p < 0.001$ ; high-priBA vs. medium-secBA,  $p < 0.001$ ; high-priBA vs. high-secBA,  $p < 0.001$ )。PC2のlow-secBAクラスターはhigh-secBAクラスターよりも有意に高かった (Tukey's post hoc test, low-priBA vs. high-secBA,  $p < 0.001$ )。

結論として、糞便中の一次BA濃度が高いことは、*Clostridium cluster IV*と*Bacteroides*の相対存在量が低いこと、*Clostridium subcluster XIVa*の相対存在量が高いこと、普通便頻度が多いことと関連していた。糞便中の一次BAや各*Clostridium cluster*が高いことの健康への影響はまだ不明であるが、今回の結果は腸内BA代謝の制御に関する重要な知見を提供するものである。一方で、細胞毒性二次BAの高値は、普通便頻度が少ないこと、不溶性食物繊維の摂取量が少ないこと、動物性脂肪の摂取量が多いことと関連していた。これらの結果は、地域居住の若年成人において、二次BA産生は食事と生活習慣の両方の要因に影響されることを示している。これらの結果は、大腸がんおよび胆石症を予防するための新たな戦略に役立つ可能性がある。

## (2) 糞便中胆汁酸濃度に関する食事パターンの探索 (in submission)

長期的な食生活の変化は、大腸がんリスク低減のための有望な戦略である。脂質と食物繊維が腸管BA代謝に影響を及ぼすことが(1)の解析で示された。しかし脂質と食物繊維は、摂取源によって腸管BA代謝への影響は異なる可能性がある。さらに魚に含まれる多価不飽和脂肪酸の摂取は大腸がんリスクを低下させる可能性が示されている。したがって、腸内BA代謝に対する食事の影響は、栄養素ベースではなく食品ベースで評価すべきである。

最近の栄養疫学研究では、疾病リスクと食事摂取量の関係が非常に複雑であるため、単一の栄養素ではなく食事パターンに焦点が当てられている。縮小ランク回帰 (RRR) は、食事パターン分析の1つであり、中間応答変数として疾患関連変数 (バイオマーカーまたは栄養素) を使用し、この変数をできるだけよく説明する食事パターンスコアを生成する。RRRは、疾患リスクをよりよく予測する食事パターンを探索することができ、疾患予防戦略に必要な情報を提供する可能性がある。さらに、極端に異なる食習慣の違いは、腸内BA代謝に顕著な差をもたらしているが、食習慣がある程度類似した集団 (同じ地域、年齢、性別) で、腸内BA代謝に違いがあるかは不明である。比較的小さな食事の変化が腸管におけるBA代謝を変化させるかどうかは不明である。RRRを用いて腸管BA代謝に影響を及ぼす食事パターンを探索することを2つ目の研究目的とした。

本研究集団の糞便中BAは、主に一次BA (CAとCDCA) および二次BA (DCAとLCA) で構成されていた (Figure 1)。したがって、一次BAと二次BAそれぞれに関連する食事パターン

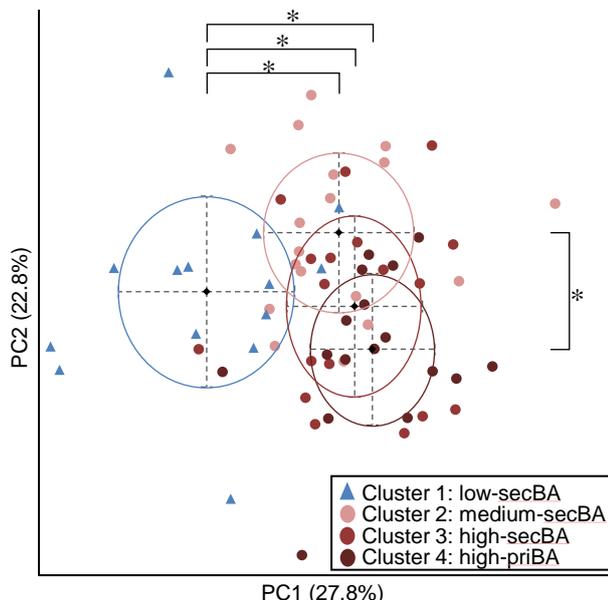


Figure 4. 参加者のPC1とPC2のプロット  
楕円の中心はBAクラスター別のPC1とPC2の平均値を、半径は標準偏差を示している。PC1とPC2は一元配置分散分析とTukey's post hoc testを用いてBAクラスター間で比較された。

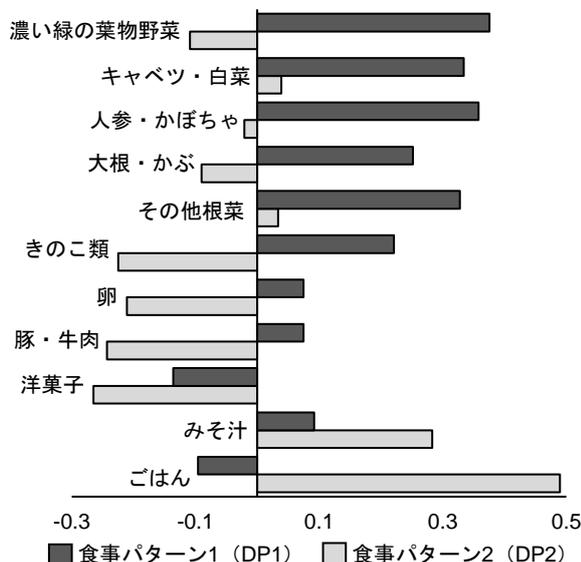


Figure 5. RRRから得られた食事パターンスコアの主要食品項目の因子負荷量

を RRR によって探索した。一次 BA 濃度と有意に相関していた不溶性食物繊維を、一次 BA に関連する食事パターンを探索するための応答変数として使用した。不溶性食物繊維、水溶性食物繊維、ビタミン K、葉酸、銅、マンガン、炭水化物、および飽和脂肪酸は、二次的 BA 濃度と有意に相関しており、二次的 BA に関連する食事パターンを探索するための応答変数として使用された。RRR の結果、有意な食事パターンを 2 つ生成することができた (DP-1 と DP-2)。

DP-1 と DP-2 のスコアに対する主な食品の因子負荷量を Figure 5 に示す。DP-1 は、濃い緑色の葉野菜、キャベツ、白菜、ニンジン、カボチャ、ダイコン、カブ、その他の根菜類、キノコ類全般の摂取量の多さと関連しており、野菜関連の食事パターンスコアと関連していた。DP-3 は、米、味噌汁の摂取量の多さ、洋菓子、豚肉、牛肉、卵、きのこ類の摂取量の少なさと関連しており、特に米の摂取量の多さが寄与していた。

DP-1 および DP-3 三分位群間の糞便中胆汁酸値の差を Figure 6 に示した。糞便中の CA および CDCA レベルは DP-1 スコアが高くなるにつれて有意に高くなり、逆に DCA および LCA は有意に低かった。さらに、DP-3 の Tertile 3 (high) の糞便中 DCA レベルは、Tertile 1 (low) および 2 よりも有意に低かった。

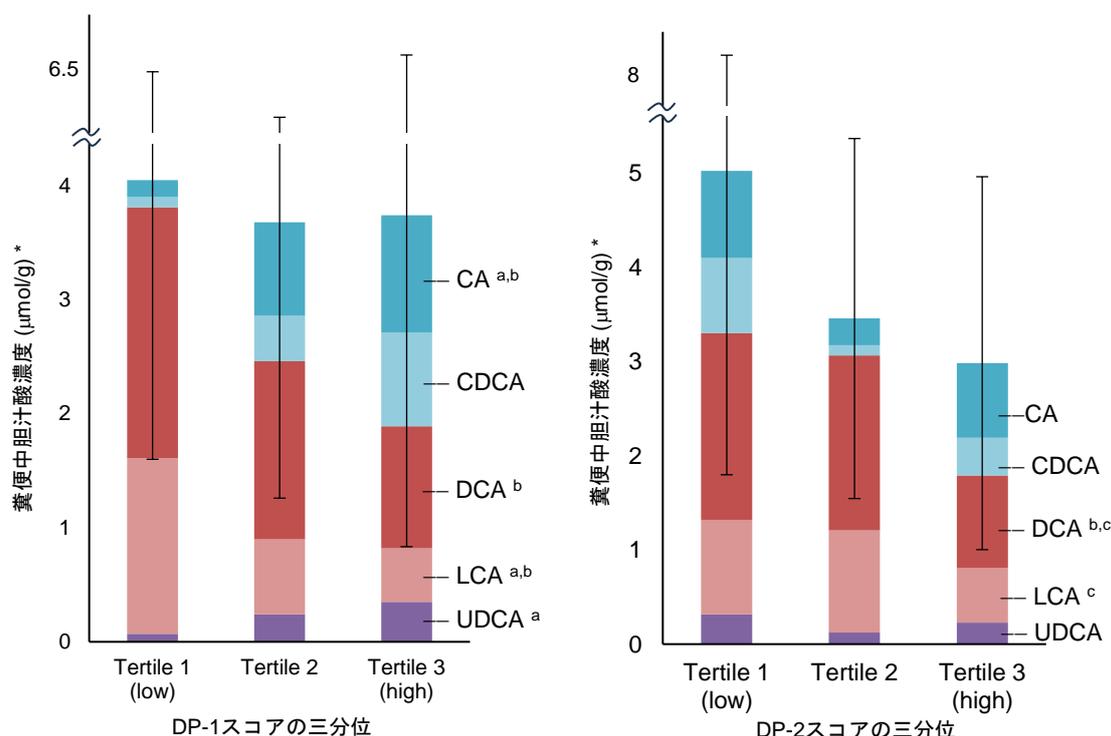


Figure 6. 食事パターン 1 (左) と 2 (右) のスコアにしたがった三分位別の、糞便中胆汁酸濃度の比較

a Tukey's post hoc test または Games-Howell test,  $p < 0.05$ , Tertile 1 vs 2

b Tukey's post hoc test または Games-Howell test,  $p < 0.05$ , Tertile 1 vs 3

c Tukey's post hoc test または Games-Howell test,  $p < 0.05$ , Tertile 2 vs 3

食事パターンスコアの 3 分位間の糞便中 BA 濃度の差を、ANCOVA を用いて排便状態および腸内細菌叢の変数で調整した。便中一次 BA 濃度は、排便状態および腸内細菌叢で調整した後でも、DP-1 の Tertile 3 (high) で Tertile 1 (low) より有意に高かった。便中二次 BA 濃度は、DP-1、DP-3 とともに、排便状況や腸内細菌叢で調整した後でも、Tertile 1 (low) よりターティル 3 (high) で有意に低かった。

結論として、本研究は糞便中胆汁酸濃度と関連する 2 つの食事パターンを見出した。葉物野菜や根菜類を多く摂取する食事パターンは、糞便中の DCA および LCA 濃度が低く、CA、CDCA および UDCA 濃度が高いことと関連していた。さらに、エネルギー摂取源として、肉や洋菓子などの高脂肪食品から米などの低脂肪穀類食品へのシフトは、糞便中の DCA および LCA レベルの低下と関連していた。本研究の結果は、比較的小さな食生活の変化が腸内胆汁酸代謝を制御できる可能性を示している。

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 Saito Yosuke, Sagae Toyooki	4. 巻 62
2. 論文標題 Defecation status, intestinal microbiota, and habitual diet are associated with the fecal bile acid composition: a cross-sectional study in community-dwelling young participants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 2015 ~ 2026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00394-023-03126-8	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤瑛介, 寒河江豊昭
2. 発表標題 糞便中胆汁酸組成と、食事、排便状況および腸内細菌叢との関係性
3. 学会等名 第26回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	寒河江 豊昭  (Sagae Toyooki)	米沢栄養大学・健康栄養学部・教授	

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
---------	---------