

胆汁酸の新規機能の解析：腸内細菌叢の組成および代謝制御因子としての役割

横田 篤
北海道大学大学院農学研究院 教授

緒言

近年、「腸内細菌叢が宿主の健康に大きな影響を与えている」という考え方が世間に広く浸透してきた。特にここ数年の米国における研究で、「西欧食あるいは高脂肪食の摂取に伴って腸内細菌叢のバランスが崩れる」ことが明らかになり、「このことが肥満や糖尿病等のメタボリックシンドロームの発症につながる」との可能性が欧米を中心に盛んに議論されている。このように、腸内細菌叢と健康の関係は、現在最も注目されている研究分野である。

これまでの研究は、高脂肪食によって、腸内細菌叢がどのように変化するのか、変化した腸内細菌叢がどのようにして疾病を発症するのか、の2点に集中している。現在のところ、腸内細菌叢の変化が疾病発症の原因なのか結果なのかについては明らかになっていない。

これらの議論で決定的に欠けているのは、「なぜ高脂肪食の摂取が腸内細菌叢のバランスを崩すのか」、そのメカニズムに関する研究である。すべての出発点となるこの機構が解明されなければ、「腸内細菌叢と健康の関係の理解」も進展しないと考えられる。その機構として、高脂肪食摂取により分泌量が増大する胆汁酸が関与しているのではないかと想定し、研究を進めてきた。その理由は、胆汁酸は脂質の消化を助ける働きに加えて、その界面活性作用により強い殺菌作用を示すからである。

胆汁（酸）が殺菌作用を示すことは極めて古く前世紀初頭から知られており、これまで胆汁酸の生育阻害作用に関して *in vitro* での分離菌株を用いた培養実験が数多く行われてきた。しかし、胆汁酸が腸内で細菌叢を実際にどのように制御しているかについての *in vivo* での作用については、今日に至るまで報告がない。

このような観点から、本研究では、これまで長期に亘って未検討であった胆汁酸による腸内細菌叢の制御の実体解明にメタゲノム解析の手法を用いて挑戦するとともに、高脂肪食の代わりに胆汁酸を投与するユニークな

実験型を採用して直接高脂肪食摂取の影響を検証する。

実験方法

本研究は北海道大学実験動物委員会の承認を受け、北海道大学の実験動物実施マニュアルに従って実施した。近交系ラット（WKAH/Hkm Slc, 3週齢、雄性）を日本エスエルシー株式会社から購入した。12時間毎の明暗サイクル（明期 8:00～20:00）、室温 22±2 °C、相対湿度 55±5 % に設定された飼育室で、底面がメッシュのステンレス製ゲージでラットを個別飼育した。基本飼料¹⁾で1週間自由摂取させた後、基本飼料および基本飼料にコール酸（CA, 0.05%）を添加した飼料（表1）を与える群に分け（n=10）、13週間の試験飼育を行った。

表1 飼料組成

	(g/kg 飼料)	
	対照飼料	CA 添加飼料
デキストリン	529.5	529.5
カゼイン	200.0	200.0
スクロース	100.0	90.0
大豆油	70.0	70.0
AIN-93G ミネラル混合物 ¹⁾	35.0	35.0
AIN-93 ビタミン混合物 ¹⁾	10.0	10.0
酒石酸コリン	2.5	2.5
L-シスチン	3.0	3.0
セルロース	50.0	50.0
コール酸混合物*	—	10.0

* 5 g コール酸をスクロースに混合して 100 g としたものの。

飼料と水道水については自由摂取とした。CA 負荷による胆汁酸代謝への長期的な影響を評価するため、試験期間中、糞中胆汁酸排出量を評価した。また、試験飼育最終日に解剖を行い、脂肪組織重量測定、血清成分測定、腸管内容物および糞中の胆汁酸組成、盲腸内容物中の有機酸組成を測定した。胆汁酸の測定には UPLC/MS による分析法²⁾を用いた。試験期間中経時的に糞、および解

剖時に盲腸内容物を採取し、腸内細菌叢解析用のサンプルとした。

結 果

試験期間全体にわたって、体重増加と総摂食量のどちらにおいても、有意な差は見られなかったが、CA を摂取した群で減少傾向が見られた。解剖時体重および各種脂肪組織重量、解剖時血清中コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度に CA 負荷による有意な差は見られなかった (表2)。糞重量は週を経るごとに徐々に増加したが、CA 摂取による有意な影響は見られなかった。

表 2 CA 添加飼料 13 週間摂取後の体重、臓器重量、血清成分

	対照群	CA 添加食群
総摂食量 (g)	1546 ± 22	1504 ± 16
解剖時体重 (g)	374 ± 9	367 ± 6
組織重量 (g/100 g 体重)		
腸間膜脂肪組織	1.49 ± 0.04	1.61 ± 0.05
副睾丸脂肪組織	2.09 ± 0.06	1.93 ± 0.08
後腹膜脂肪組織	2.97 ± 0.10	2.89 ± 0.08
肝臓	3.18 ± 0.06	3.20 ± 0.05
盲腸内容物	0.55 ± 0.03	0.50 ± 0.06
血清成分		
コレステロール(mg/dL)	91.7 ± 3.7	92.9 ± 2.9
中性脂質 (mg/dL)	52.9 ± 2.4	57.8 ± 4.2
遊離脂肪酸 (mmol/L)	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.05

平均値 ±SEM として表記 (n=10)。

表 3 CA 添加飼料 13 週間摂取後のラット糞中における胆汁酸組成

	(μmol/g wet feces)	
	対照群	CA 添加食群
コール酸	0.07 ± 0.02	0.49 ± 0.40
α ミュリコール酸	0.08 ± 0.01	0.20 ± 0.02 *
β ミュリコール酸	0.94 ± 0.16	1.89 ± 0.12 *
ω ミュリコール酸	1.24 ± 0.19	1.69 ± 0.09 *
ヒオデオキシコール酸	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01 *
ウルソデオキシコール酸	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ケノデオキシコール酸	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01 *
デオキシコール酸	1.20 ± 0.17	8.37 ± 1.05 *
リトコール酸	0.48 ± 0.05	0.52 ± 0.08
ヒオコール酸	ND	ND
ウルソコール酸	0.03 ± 0.02	0.19 ± 0.02
総胆汁酸	4.48 ± 0.55	15.37 ± 0.75 *
一次胆汁酸	1.12 ± 0.21	2.58 ± 0.43 *
二次胆汁酸	3.36 ± 0.37	12.78 ± 0.97 *

平均値 ±SEM として表記 (n=10, *P < 0.05)。

試験飼育 13 週間後の糞中胆汁酸組成は CA 摂取により変動した (表3)。CA 添加食摂取により最も大きく増加したのはデオキシコール酸 (DCA) であり、対照群の約7倍程度増加した。

一方、DCA ほどでないが、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、ミュリコール酸 (MCA)、ヒオデオキシコール酸も CA 添加食摂取により増加した。これらの組成変動に伴い、CA 摂取群では総胆汁酸量、一次胆汁酸量、二次胆汁酸量が軒並み増加した。また、盲腸内容物中の有機酸濃度は CA 添加食摂取により影響を受けなかった (表4)。

表 4 CA 添加飼料 13 週間摂取後のラット盲腸内容物 pH 及び有機酸濃度

	対照群	CA 添加食群
pH	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.1
有機酸濃度 (μmol/g cecal contents)		
コハク酸	38.7 ± 3.3	41.8 ± 2.9
乳酸	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
酢酸	25.0 ± 2.2	27.6 ± 1.8
プロピオン酸	4.6 ± 0.3	3.5 ± 0.5
イソ酪酸	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
酪酸	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3
イソ吉草酸	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
吉草酸	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1

平均値 ±SEM として表記 (n=10)。

考 察

本研究により、試料中 0.05% 程度の CA を長期摂取させる事により、糞中の CA や抱合型胆汁酸を増やさずに DCA を増加させる実験系を確立することができた。長期間にわたり高濃度の CA (0.5%) 添加食を摂取させた場合、エネルギー代謝の亢進に伴う脂肪組織の重量減少が引き起こされることが報告されている³⁾。また、以前実施した 0.2%CA 添加飼料を摂取させた実験⁴⁾では、エネルギー代謝の亢進と考えられる脂肪組織重量の減少がみられた。しかしながら、0.05%CA 添加飼料を長期で摂取させても、脂肪組織のエネルギー代謝亢進は起こらない実験系であることが確認できた。

また、CA 飼料摂取群ですべての MCA が増加した理由として、添加した CA の排泄経路として利用された可能性が考えられる。すなわち、げっ歯類に存在するもう一つの代謝系であるケノデオキシコール酸からミュリコール酸を合成する経路に余分な CA を流し、胆汁酸

排泄を総量として亢進させていた可能性が考えられる。ミュリコール酸は DCA に比べて親水性であるため、細菌に対する毒性は極めて低いものと考えられる。

加齢に伴って CA / CDCA 比が増加するとともに一次胆汁酸の分泌量も増加する。また、高脂肪食摂取では胆汁酸分泌量が增大することが知られている。したがって、この CA 添加系は加齢及び高脂肪食摂取に伴う胆汁酸組成の変動を模倣した系と考えることも可能である。CA 添加食摂取では糞中 DCA 濃度の著しい増加がみられた。本研究と同様な実験系で短期間での CA 添加でも腸内細菌叢の変動が既に観察されている⁴⁾。腸内細菌叢解析は現在進行中であり、胆汁酸組成と腸内細菌叢変動の関連が明らかになるものと期待される。

CA が DCA に変換されるためには、腸内細菌の作用が必須である。高脂肪食を摂取した場合の胆汁酸代謝変動には胆汁酸の分泌増加と腸内細菌叢の変動が関与することから、高脂肪食摂取による明確な胆汁酸代謝の変動が見られるまでには時間を要するものと推察される。さらに、加齢に伴い胆汁酸の組成変動および分泌量の増大がおこることから、腸内細菌叢に及ぼす胆汁酸の作用を考慮するためには、長期的な胆汁酸と腸内細菌叢の変動を精密に解析することが必要である。

要 約

胆汁酸は脂質や脂溶性ビタミンの消化と吸収に必要な物質であり、高脂肪食摂取時にその分泌は増大する。一方、高脂肪食摂取時に腸内細菌叢が変化することが報告されており、高脂肪食摂取から波及する疾患・症状と体内の胆汁酸代謝の関連が考えられる。本研究では、高脂肪食摂取時を想定し、主要な胆汁酸の一つであるコール酸 (CA) を経口負荷した場合の、胆汁酸代謝の

網羅的解析を行うとともに、宿主および腸内細菌叢への影響を検討した。3 週齢の WKAH/Hkm Slc 雄ラットを用い、予備飼育後に 13 週間の試験飼育を行った。試験飼育開始時に、基本飼料を摂取させた群と、CA を重量比で 0.05% 添加した飼料を摂取させた群に分け、試験飼育を行った。腸内細菌叢解析用の糞試料を経時的に回収するとともに、試験飼育最終日には解剖を行い、脂肪組織重量測定、血清成分測定、盲腸内容物有機酸組成、および糞中胆汁酸組成を測定した。本研究で用いた胆汁酸添加量では、エネルギー代謝の亢進を伴わずに糞中デオキシコール酸 (DCA) 濃度の増加が可能である事を見出した。試験飼育 13 週間後の糞中胆汁酸組成は CA 摂取により大きく変動し、中でも DCA 濃度の著しい増加をもたらした。さらに、ケノデオキシコール酸、ミュリコール酸、ヒオデオキシコール酸も CA 添加食摂取により増加した結果、CA 摂取群では総胆汁酸量、一次胆汁酸量、二次胆汁酸量が軒並み増加した。腸内細菌叢解析は現在進行中であり、CA 摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響は少なからずあるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より平成 23 年度学術研究奨励金を賜りました。関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) P. G. Reeves et al. : *J. Nutr.*, 123, 1939-1951, 1993.
- 2) M. Hagio et al. : *J. Lipid Res.*, 50, 173-180, 2009.
- 3) M. Watanabe et al. : *Nature*, 439, 484-489, 2006.
- 4) K. B. M. S. Islam et al. : *Gastroenterology*, 141, 1773-1781, 2011.