様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　６ 月　８ 日現在

機関番号：２３８０３
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：２５５６００５７

研究課題名（和文）生体試料揮発成分を分析し生活習慣病を診断する

研究課題名（英文）Analysis of volatile organic compounds in feces for the development of diagnostic biomarkers of lifestyle-related diseases

研究代表者
三好　規之（MIYOSHI, Noriyuki）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：７０４３８１９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢が様々な生体調節機能の中心的役割を担っていることが明らかになりつつあり、加齢やストレス、食習慣による腸内細菌叢の変化が、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症に強く関連する低レベルの持続的な炎症誘導の引き金となることが報告されている。本研究では、腸管内の揮発性有機化合物（volatile organic compounds, VOCs）による生活習慣病の病態制御の解明を目的として、headspace sampler-GC-MSを用いた生活習慣病モデル動物の糞便に含まれるVOCsの網羅的分析を行い、病態に依存して有意な変動を示すVOCsの探索・同定・炎症誘導活性を検討した。

研究成果の概要（英文）：It is strongly suggested that intestinal microflora is playing pivotal roles in metabolic homeostasis. However some factors, stress, aging, and dietary pattern, possibly influence the intestinal microflora, which deteriorated composition possibly triggers the low-level but chronic inflammation associated with several lifestyle-related diseases including obesity and diabetic mellitus. In this study, to evaluate the possible association between the pathogenesis of lifestyle-related diseases and volatile organic compounds (VOCs) in intestinal tract, VOCs in feces derived from obese and diabetic model mice KK-Ay and their control (C57BL/6J mice) fed with normal or high fat diet were analyzed using a headspace sampler-GC-MS. We found that several VOCs were significantly increased in KK-Ay and/or high-fat diet fed mice, which were then identified acetone, phenol, and nonanal.

研究分野：食品分析化学

キーワード：揮発性有機化合物　腸内細菌叢　メタボローム解析

１．研究開始当初の背景

腸内細菌叢が腸管内における自然免疫系で重要な働きをしていることは言うまでもなく、最近では肥満･インスリン抵抗性･血圧の制御など生活習慣病の諸症状や、不安や鬱など情動反応にまで影響を及ぼしていることが明らかになりつつあり、宿主との相互作用や外的要因（食事や運動など）によって変動する腸内細菌叢が宿主のgenotypeに依存しない生理的･病理的表現型を決定･誘導する最も重要な要素の一つであることが強く示唆されている。それゆえ、腸内環境を分子レベルで理解することができれば、日常的な食事や栄養指導、機能性食品成分によるプロ･プレ･シンバイオティックスによる人類のQOL向上効果が期待できる。生理的･病理的条件下で変動する腸内細菌叢については、次世代シークエンサーを駆使したメタゲノム解析により、表現型を誘導する原因菌種がある程度は絞り込まれてきている。さらに、表現型を誘導する原因分子としてPSAなどの糖鎖が想定されており、腸内常在菌の PSA が Th1/Th2 バランスを整えることや、大腸炎に対する保護作用を示すことが確認されているが、病態モデル共生菌に特異的な分子群の詳細な構造解析は行われていない。

一方、揮発性化合物解析分野における最近の新しい知見を眺めてみると、硫化水素や一酸化炭素など幾つかのガス状分子については心筋梗塞保護作用や血管拡張･収縮作用など生体制御機構における役割が明らかになってきた。また、生体にとって臭い分子など揮発性分子の受容は、フェロモンの作用や精子の走化性に重要であるように、生体内の様々なイベントを制御している。さらに、腸管粘膜組織における腸クロム親和性細胞に嗅覚･味覚受容体が存在することが明らかになっており、腸内細菌が産生する揮発成分が生体の生理･病理的状態を反映するバイオマーカーとなりえるだけでなく、肥満や脂質代謝など上述の様々な表現型を決定する重要な分子として作用していることは容易に想像がつく。しかしながら限られた化合物については各病態における生体応答などの表現型や臓器間でのクロストーク･シグナル伝達等、詳細な解析が進められているが、分析化学的解析の欠如により、揮発性分子の生理活性については大部分が不明なままである。ヒト糞便を GC-MS で分析すると約 300 の揮発性分子が検出･同定されることが報告されているが、糞便揮発性分子のメタボローム解析による病態バイオマーカー探索や新規のシグナル伝達機構解析に関する報告は無い。本申請研究では非侵襲的に大量にサンプリングすることが可能であり、呼気や体臭に比べ純度の高いサンプル調製が可能な糞便の分析を行い、治療･予防戦略に有効になる病態の抑制と促進の新規メカニズムを明らかにすることを目的とする。

２．研究の目的

腸内細菌叢が様々な生体調節機能の中心的役割を担っていることが明らかになりつつあり、加齢やストレス、食習慣による腸内細菌叢の変化が、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症に強く関連する低レベルの持続的な炎症誘導の引き金となることが報告されている。本研究では、腸管内の揮発性有機化合物（volatile organic compounds, VOCs）**による生活習慣病の病態制御の解明を目的として、**headspace sampler-GC-MS（HSS-GC-MS）**を用いた生活習慣病モデル動物の糞便に含まれる** VOCs **の網羅的分析を行い、病態に依存して有意な変動を示す** VOCs **の探索・同定・炎症誘導活性を検討した。**

３．研究の方法

本研究で行った全ての動物実験は静岡県立大学における動物実験に関する指針に従い静岡県立大学倫理委員会の承認を得て行った。

まず高脂肪食負荷および糖尿病態による腸管内容物の変動を捉えることを目的として、5 **週齢雄性** KK-A^y/TaJcl **マウス及び、対照群** C57BL/6J **マウスを日本クレア社から納入し単独ケージ飼育した。飼育条件は、温度** 23 ±1°C、**湿度** 55±5%**の空調、照明時間は** 7 **時から** 19 **時、消灯時間は** 19 **時から** 7 **時とした。** 1 **週間普通食**（AIN76**：オリエンタル酵母工業）で予備飼育をおこなった後、**C57BL/6J **および** KK-A^y **マウスをそれぞれ、**Normal Fat Diet (AIN76 **摂取** n=5)**群、**High Fat Diet (HFD32 **摂取** n=6) **群に群分けした。本飼育開始** 0 **週目から** 4 **週毎に採血を行い、**1 **週目から** 4 **週毎に代謝ケージを用いて糞の採取を行った。採取した糞便を** 100 mg **測りとりバイアル瓶に入れ密封し、**HSS-GC-MS **にて測定した。**

HSS 装置は Agilent 7697 (Agilent Technologies) を使用し、試料を 100ºC **で** 60 **分間加温し、**50 ml/min **で** 1 **分間** VOCs **を** GC **装置に注入した。**GC装置はAgilent 7890 (Agilent Technologies) を使用し、フロント注入口は、250°C で、スプリット比 5：1 で試料を注入した。キャリアガスはヘリウム（1.1 ml/min）。カラムは、DB-WAX (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) を使用した。カラムオーブン温度は初期温度35°Cで1分間保持後 120°C まで昇温させ (5°C/min)、250°C で 10 分間保持した。質量分析 (MS) 装置は Agilent 5975 (Agilent Technologies) を用い、スキャン範囲（m/z=14～500）、MSイオン源はEI モードで230°Cおよび四重極は150°Cで分析を行った。分析データはAMDISによりピーク抽出を行い、多変量解析ソフトウェア MassProfilerProfessional (Agilent Technologies) により統計解析を行った。

高脂肪食群および疾患群で有意な変動が認められた VOCs については、マウスマクロファージ様 RAW264 細胞への曝露し、リアルタイム RT-PCR 法を用いた TNF-α **の** mRNA 発現量を指標に生理活性を評価した。

４．研究成果

特餌開始 1 週より採取した糞便の HSS-GC-MS 分析データトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示す。

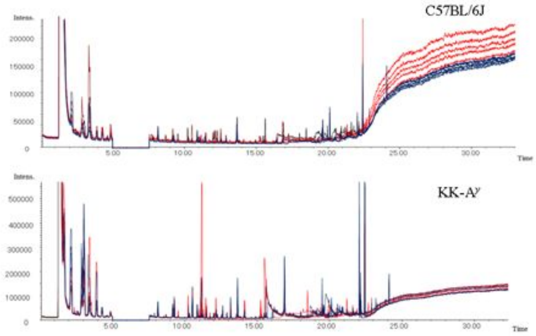

図 1 HSS-GC-MS トータルイオンクロマトグラム C57BL/6J（上段）および KK-A^y（下段）マウス糞便（特餌開始 1 週目）の HSS-GC-MS 分析より得られたトータルイオンクロマトグラムを NFD 群(青)、HFD 群(赤)で示す。

質量分析より得られたデータの主成分分析では、食餌およびマウス系統に依存した明確な主成分軸分離を示し（図 2）、マウス系統に相関する第 1 主成分軸分離に最も強く寄与する分子として、acetone を同定した（図 3）。

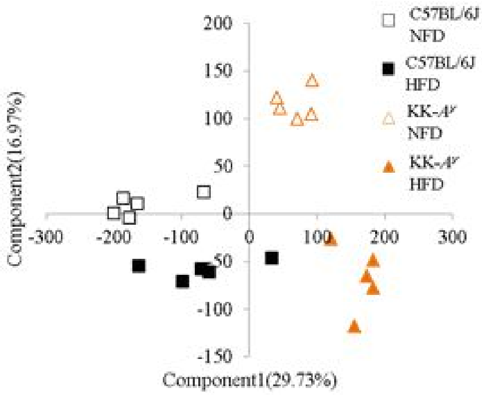

図 2 主成分分析 score plot

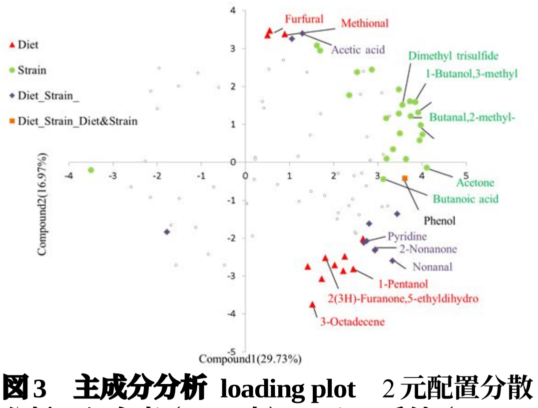

図 3 主成分分析 loading plot 2 元配置分散分析より食事（diet：赤)、マウス系統（strain：緑)、食事とマウス系統の両方（紫）で有意差が認められた VOCs、および食事とマウス系統の相互作用（橙）が認められた VOCs を示す。

同様に食餌内容（NFD 群と HFD 群）と相関する第 2 主成分軸分離に強く寄与する分子の一つとして nonanal を同定し、マウス系統と食餌の有意な相互作用（二元分散分析）を示す分子として phenol を同定した（図 3)。

また、飼育 9・17 週に採取した糞便の解析では、飼育期間依存的に血糖値の上昇を示した C57BL/6J の HFD 群が、KK-A^y 群と同様の病態に依存した VOCs プロファイルを示す傾向が認められた。さらに、acetone、nonanal、phenol は、RAW264 細胞において炎症性サイトカインの一つである TNF-α の有意な発現誘導活性を示した（図 4)。

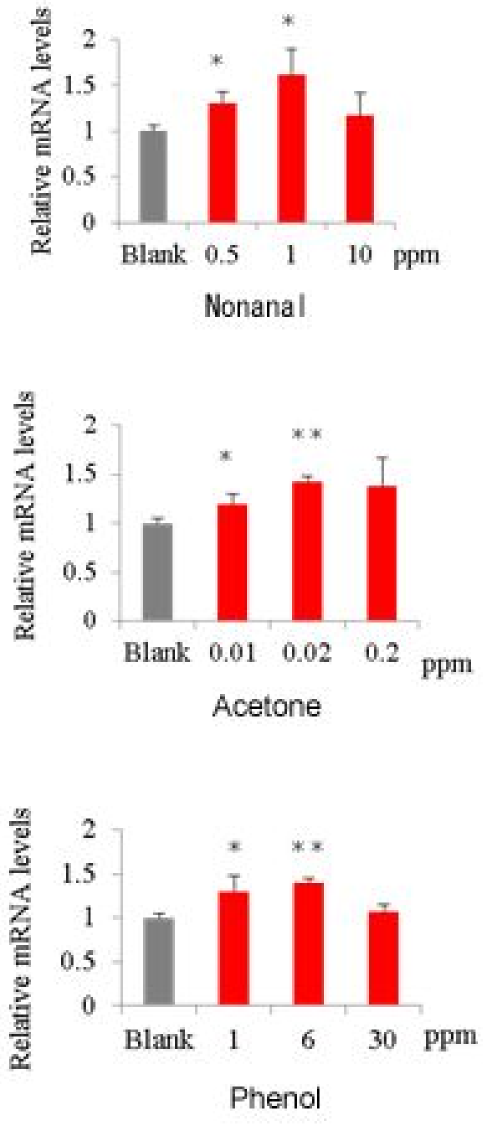

図 4 Real-time RT-PCR Nonanal、acetone、phenol の各標準品をマウスマクロファージ様 RAW264 細胞に 6 時間曝露し、Real-time RT-PCR 方により TNF-α の遺伝子発現変化を解析した。

本研究で病態に依存して有意に変動する VOCs として同定した nonanal、acetone、phenol が、インスリン抵抗性などと強く関連する TNF-α の顕著な発現誘導活性を示したことか

ら生活習慣病発症への関与が示唆された。特に acetone は早期から病態に依存した顕著な変化を示し、バイオマーカーとしての有用性が強く示唆された。今後は同定した VOCs の炎症誘導メカニズムや生成機序などを検討し、食習慣などの影響による生活習慣病発症との関連を明らかにしていく必要がある。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　6　件）

Tomono S, Yasue Y, Miyoshi N, Ohshima H. Cytotoxic effects of secosterols and their derivatives on several cultured cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2013) **77**, 651-3.

Miyoshi N, Iwasaki N, Tomono S, Higashi T, Ohshima H. Occurrence of cytotoxic 9-oxononanoyl secosterol aldehydes in human low density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.*, (2013) **60**, 73-9.

〔学会発表〕（計　28　件）

ob/ob マウス糞便に含まれる起炎性分子の探索、眞田峻佑、大島寛史、三好規之、日本農芸化学会 2014、2014.3/27-30、東京

Lipopolysaccharide 構成分子 lipid A の LC-MS 分析、大石美月、大島寛史、三好規之、第 86 回日本生化学会、2014.10/15-18、京都

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスにおけるトマトサポニンの抗炎症効果、吉川悠子、片柳悠紀、三好規之、福富竜太、大橋典男、第 19 回日本フードファクター学会、2014.11/8-9、鹿児島

〔その他〕
ホームページ等
http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/

６．研究組織
(1)研究代表者
　三好規之（MIYOSHI, Noriyuki）
　静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
　研究者番号：70438191

(2)研究分担者
　吉川悠子（YOSHIKAWA, Yuko）
　静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
　研究者番号： 00580523

　伴野勧（TOMONO, Susumu）
　静岡県立大学・食品栄養科学部・客員共同研究員
　研究者番号：60554011