

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17956

研究課題名（和文）メタボローム解析に用いる糞便の最適な採取・保存方法の検討と網羅的な代謝産物の測定

研究課題名（英文）Optimized fecal sample handling and comprehensive analysis of metabolite

研究代表者

盛 喜久江（mori, kikue）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10805956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：糞便中には夾雑物が多く、代謝産物は外部環境の影響を受けやすいため、サンプルの採取方法や保管方法は重要である。そこで本研究では糞便中の代謝産物の測定において適切な精度管理を行うために、採取方法や保存方法が脂肪酸と胆汁酸の種類やその濃度に与える影響を検討した。種々の短鎖脂肪酸と胆汁酸濃度において、コントロールサンプルとの有意な差は認められなかった。また、常温に暴露している時間による濃度変化は、一部の短鎖脂肪酸において示唆されたが、有意差は認められなかった。サンプルの数および量を増やし、検討する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まであまり配慮されていなかった採便方法や保存方法など前処理によってどのように代謝産物が温度や湿度の影響を受けるのかを詳細に検討し、どのような条件が代謝産物の測定に影響を与えるのかが明らかとなれば、採取・保存状況の違いを考慮した考察ができる。研究間同士の真の比較検討が可能となれば、腸内細菌の研究を発展させるうえで基礎的なデータとなり得る。

研究成果の概要（英文）：Fecal metabolites are easily affected by temperature and humidity, so the way of sampling is important. The purpose of this study was to evaluate the effects of varying locations of collection and storage conditions on metabolite profiles such as short-chain fatty acid and bile acid levels. Samples obtained from healthy individuals were analyzed. There were no significant differences in the location and storage conditions between control and other conditions in neither short chain fatty acid nor bile acid. It seemed that the metabolite profiles were stable in this study. However, it appears that some short-chain fatty acid levels increased with increasing the duration time of room temperature. The further study using larger samples is needed.

研究分野：健康科学

キーワード：糞便 代謝産物

1．研究開始当初の背景

近年は、食事によってその組成が大きく変わる腸内細菌が宿主の健康に与える影響について関心が集まっており、特に腸内細菌の代謝産物が宿主に対してもつ生理活性が注目されている。腸内細菌の代謝産物は宿主の単なるエネルギー源として考えられていたが、宿主の恒常性維持に深く関わっていることが明らかとなってきた（Gilbert et al. Nature 2016）。従って糞便中の代謝産物を測定することが疾患の発症メカニズムの解明に必須と考えられるが、糞便中には夾雑物が多く、また代謝産物は温度や湿度などの外部環境の影響を受けやすいため、サンプルの採取方法、保存方法、抽出方法、の仕方は非常に重要である。

これまでに多くの糞便中の代謝産物について報告されているが、サンプルの採取方法、保存方法、抽出方法は一定でないため、研究チームによって測定結果が異なっている可能性がある。実際に、大腸がん患者と健常人の総胆汁酸量を比較した研究では、同じ測定機器を用いたにもかかわらず、大腸がん患者の総胆汁酸量は多いという報告（Reddy et al. Cancer, 1977）がある一方で、Hikasa らの研究では少ないという報告（Hikasa et al. Gut, 1984）がある。この原因として、採取方法や温度条件が一致していなかったことが考えられた。そこで本研究では、採取方法や保存方法が脂肪酸と胆汁酸の種類やその濃度に与える影響を検討し、糞便中の代謝産物の測定において適切な精度管理方法を行うことを目的とした。

2．研究の目的

LC-MS/MS や GC-MS/MS の向上により、低分子を含めて多様な代謝産物や短鎖脂肪酸など揮発性物質の測定が可能となり、これまで未解明だった代謝産物の同定が進んできたが、糞便中における代謝産物の測定については一般化された最適な方法が確立されていない。これまでに多くの糞便中の代謝産物について報告されているが、サンプルの採取方法、保存方法、抽出方法は一定でないため、研究チームによって測定結果が異なっている可能性がある。実際に、同じ測定機器を用いたにもかかわらず、全く異なる結果となった報告もある。この原因として、採取方法や温度条件が一致していなかったことが考えられた。そこで本研究では、糞便中の代謝産物の測定において適切な精度管理方法を行うために、採取方法や保存方法が脂肪酸と胆汁酸の種類やその濃度に与える影響を検討した。

3．研究の方法

糞便の測定において最適な採取・保存方法を樹立するために、採取位置や保管までの時間や温度、保存温度による脂肪酸や胆汁酸への影響を検討した。検体到着後 30 分以内に-80℃で保存したものをコントロールとして、各条件と比較し脂肪酸や胆汁酸の種類や濃度がどのように変化するのかを検討した。

糞便中には多くの腸内細菌や各種プロテアーゼなど夾雑物が多く、採便時から時間とともに分解や変性が起こるため、代謝産物に大きな影響を及ぼすと考えられる。まずは、図 1 のように、採取位置の違いにおける影響を検討した。採取位置は、便が先に出た側を前方とし、後に出た側を後方とした。前方、外側、内側、後方の 4 か所について検討した。また、保存条件（図 2）については採取位置の検討で用いた残りの便を用いた。全量の提供が難しい場合は、採便容器を用いて一部の便を使用し、温度による条件のみ検討した。

採取後の保管までの時間や温度、その後の保存温度による影響を検討した。採取後の処理などの時間も勘案して冷蔵または冷凍までの最短時間は 30 分以内と考えた。「30 分以内に-80 保存」をコントロールとして各条件と比較することで代謝産物の変化を確認した。抽出・解析までは-80 にて保存し、短鎖脂肪酸および胆汁酸を測定した。短鎖脂肪酸は、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-吉草酸、n-吉草酸の 9 物質の測定を行った。胆汁酸については、主に非抱合型胆汁酸であるコール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、リトコール酸、7-ケトデオキシコール酸を測定した。

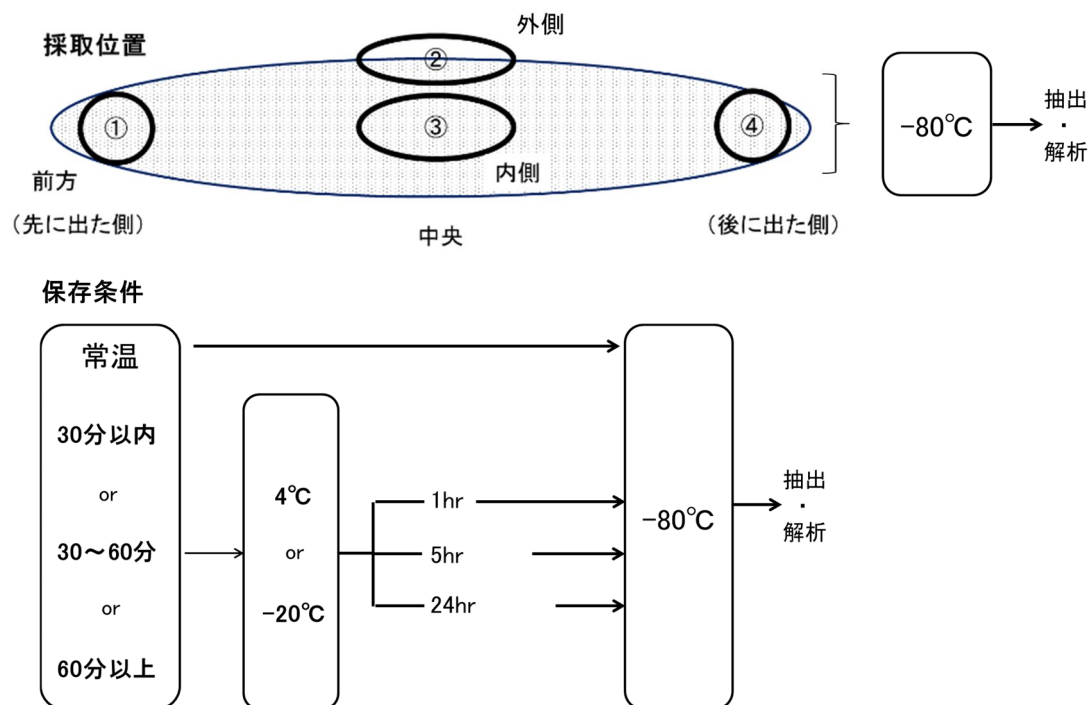


図 1. 採取方法および保存条件

4 . 研究成果

コントロールである 30 分以内に-80 保存をしたサンプルとの比較では、いずれの項目にも有意な差は認められなかった。しかし、常温暴露時間による変化を示す可能性が見られた。条件 1～7 は常温暴露時間が 30 分以内、条件 8～14 は 30 分～60 分以内、条件 15～21 は 60 分以上とし、乳酸は常温暴露時間が長いほど濃度が低下、酢酸・プロピオン酸は濃度が上昇している傾向が示唆された（図 2）。

採取位置の検討については、端と中央からの採取によって違いが見られる可能性が示唆されたが、サンプル数を増やし、さらなる検討が必要と考えられる。胆汁酸については採取位置による差は認められなかった（図 2）。

今回の結果からは、採取方法や保存温度の違いによる糞便中の代謝産物の濃度に差がなかったことから、詳細な条件設定は必要がないことが示唆された。しかしながら、今回のサンプル数や、サンプル量が十分ではなかったため、サンプル収集方法や測定方法の改善を要すると考えられた。条件による代謝産物の濃度変化には、有意ではないが一部の代謝産物において増減の傾向が示唆されたことから、サンプル数・量を増やした上で、再度検討が必要と考えられる。

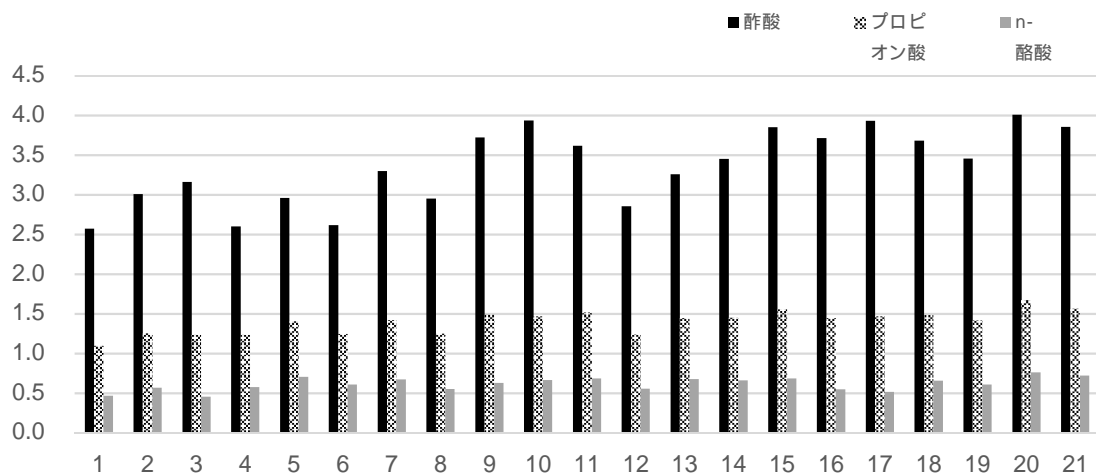


図 2. 条件 1~21 において検出された短鎖脂肪酸濃度

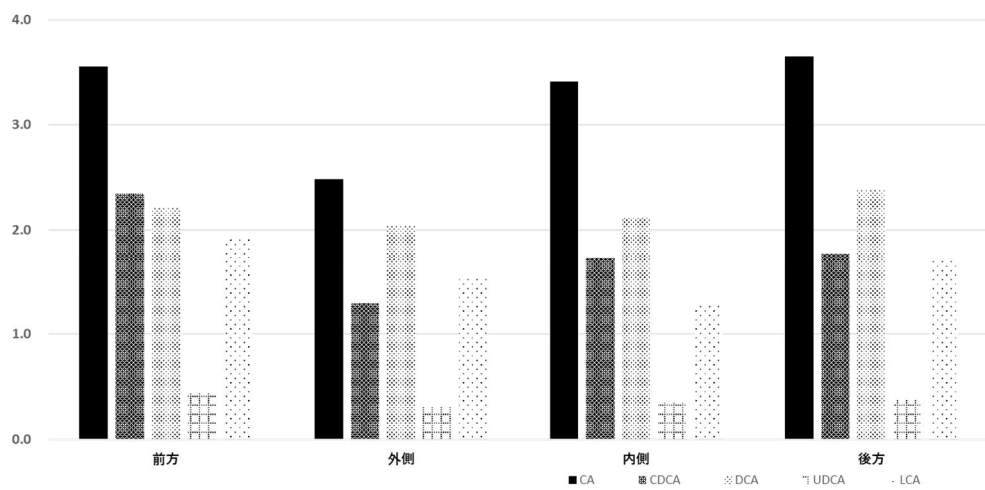


図 3. 採取位置による胆汁酸濃度

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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