

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410161

研究課題名(和文) 便中有機酸メタボロミクスによる腸内細菌叢の機能解析法の開発

研究課題名(英文) Development of an analytical method for metabolomics of fecal organic acid in intestinal flora

研究代表者

小谷 明 (KOTANI, Akira)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40318184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 便中有機酸のメタボローム分析を実践できる計測システムとして、キノンの還元前置波に基づく電気化学検出-高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)を開発した。本システムは、ラット便中有機酸(乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸、吉草酸)を定量でき、抗菌薬および漢方薬投与後のラット便中有機酸の経時変化を追跡することができた。本システムは、食品や薬物が腸内細菌叢の生物活性に及ぼす影響を明らかにできる分析法として有用であった。

研究成果の概要(英文)： A high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD) system based on a voltammetric reduction of quinone was developed to perform the metabolomics of fecal organic acids in intestinal flora. The present HPLC-ECD system performed the determination of fecal organic acids (lactic, acetic, propionic, butyric, isovaleric, and valeric acids) in rats. Moreover, a change of fecal organic acids in rats after ingestion of an antimicrobial agent and a Kampo medicine was monitored by the present HPLC-ECD system. It was shown that the present HPLC-ECD system was useful to examine the effect of foods and medicines on bioactivities of intestinal flora.

研究分野：分析化学

キーワード：有機酸 電気分析化学 液体クロマトグラフィー 糞便 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内は複雑な微生物生態系を構成しており、腸内細菌叢とよばれる腸内細菌群集が存在している。腸内細菌叢の構成は、食生活や健康状態の影響を大きく受けることが知られている。近年、感染症の治療に健常人の糞便を用いる糞便注入療法が報告されるなど、腸内細菌叢を難治性疾患の治療に利用する試みがある。医療における腸内細菌叢の応用範囲を拡張するには、腸内細菌叢の代謝物である便中有機酸を指標にしたメタボローム分析を行い、腸内細菌叢の生体内における機能の詳細を明らかにすることが重要である。しかし、便中有機酸のメタボローム分析を従前の分析法で実践することは困難であったため、実用性と汎用性に優れた便中有機酸の新規定量分析法を開発することとした。

2. 研究の目的

腸内細菌叢を利用する創薬研究や臨床研究を行うには、便中有機酸のメタボローム分析が必要不可欠である。従来、有機酸の分離定量にはガスクロマトグラフィー (GC)、紫外吸光検出・高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、蛍光検出 HPLC、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (MS) が用いられている。酸に特異的な検出法としてキノンの還元前置波に基づく電流計測法がある。この検出様式が、有機酸の HPLC に活用できれば、有機酸の高感度定量のための誘導体化操作、便試料由来のマトリックスに対する厳重なクリーンアップ操作を回避できるうえに、MS ではイオン化が困難であった有機酸も検出可能となる。従って、キノンの還元前置波を利用した電気化学検出 HPLC は便中有機酸のメタボローム分析を行う上で、多くの利点があると考えた。

本研究では、便中有機酸のメタボローム分析を実践するための新規計測システムとして、便中有機酸の電気化学検出 HPLC を開発する。さらに、実験動物の便を試料とした応用研究を実施し、本計測システムが便中有機酸メタボロミクスにおいて実用性に優れ、腸内細菌叢の機能を的確に把握できる分析手法であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 有機酸の電気化学検出 HPLC システム

移動相とカラムからなる分離系にキノンの送液系を合流させるポストカラム方式の電気化学検出 HPLC システムを構築した (図 1)。

作用電極はグラッシーカーボン電極、参照電極は Ag/AgCl 電極、対極はステンレススチールからなる三電極式の電解フローセルを用いた。移動相は 0.1 mmol/L HClO₄ 水溶液、キノンの試液は 6 mM DBBQ と 20 mM LiClO₄ を含むエタノール溶液、印加電位は

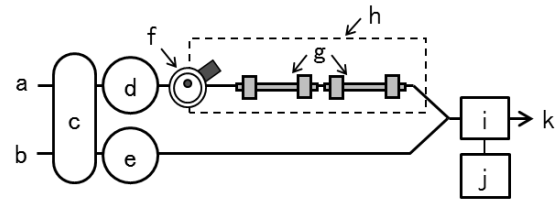


図 1 電気化学検出 HPLC システムの概略図
a, 移動相; b, キノン試液; c, 脱気装置 (DG-2080-53, 日本分光 製); d, e, ポンプ (301M, フロム 製); f, サンプルインジェクター (7125, レオダイン 製); g, イオン排除型カラム (KC811-1E: 250 mm×1.0 mm, i.d., Shodex 製); h, カラムオーブン (CTO-10AS VP, 島津製作所 製); i, 電気化学検出器 (LC-4C, ビーエーエス 製); j, 記録計 (807-IT, 日本分光 製); k, 廃液

-0.5 V vs. Ag/AgCl、移動相の流速は 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、キノンの流速は 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、カラム温度は 45°C、試料注入量は 5 μL とした。

(2) 実験動物

Wistar 系ラット (7 週齢、雄) をヨーグルト投与群、バナナ投与群、セフェム系抗菌薬投与群、セフェム系抗菌薬と補中益気湯投与群、対照群に分けて飼育した。

ヨーグルトは 50%懸濁液約 30 mL/day を自由飲用、バナナは約 80 g/day を食餌として与えた。CFDN は 0.90 g/kg、補中益気湯は 0.75 g/kg を経口投与した。

(3) 試料溶液の調製

自然排便により得た便試料に 3%フェノールを含む 0.1 mmol/L HClO₄ 水溶液を加えて 5 倍に希釈した。タッチミキサーで 5 分間攪拌後、10 分間の超音波処理をした。遠心分離 (9,000 g, 10 min, 4°C) を行って得た上清を、0.45 μm 孔のメンブレンフィルター (クロマトディスク 13A, クラボウ 製) でろ過し、検液とした。検液 5 μL を HPLC に注入し、クロマトグラムを測定した。

4. 研究成果

(1) 電気化学検出 HPLC システムの構築と分析法バリデーション

便中有機酸の HPLC に適した分離モードを選択するために、逆相、イオン排除、あるいは親水性相互作用クロマトグラフィーについて検討した。各有機酸の良好な分離分析を比較的短時間に達成できる点から、イオン排除クロマトグラフィーを選定した。測定条件を最適化し、有機酸の標準溶液についてクロマトグラムを測定した (図 2)。

クロマトグラム上に乳酸、酢酸、プロピオ

ン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸および吉草酸のピークを40分以内に観察できた。それらのピーク高さはいずれも1.0~75 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲でよい直線性 ($r > 0.999$)を示した。6回の繰り返し測定を行って求めたピーク高さのRSDは4.9%以下(50 $\mu\text{mol/L}$)、検出限界 ($S/N = 3$)は1.5 pmol であった。本法は、内径7.8 mm, i.d.のイオン排除型カラムを用いた電気化学検出HPLCと比較して25倍の高感度化を達成できた。

本計測システムは、便中有機酸を定量する上で十分な感度、特異性、定量範囲、精度を有することを明らかにした。

(2) ラット便中有機酸の定量

本計測システムをラット便中有機酸の定量へ応用した。3(3)に記した前処理方法で調製した検液をHPLCに注入し、クロマトグラムを測定した(図3)。試料としたラットの便中には、22.6 $\mu\text{mol/g}$ の乳酸、300.5 $\mu\text{mol/g}$ の酢酸、62.9 $\mu\text{mol/g}$ のプロピオン酸、118.4 $\mu\text{mol/g}$ の酪酸、3.7 $\mu\text{mol/g}$ のイソ吉草酸、19.9 $\mu\text{mol/g}$ の吉草酸が含まれていた。

繰り返し測定を行い、定量値の併行精度を評価したところRSD ($n = 6$)は4.6%以下であり、添加回収試験を行ったところ回収率は84~95%であった。本法は、ラット便中有機酸の定量において真度と精度に優れた分析法であることを明らかにした。

(3) 便中有機酸モニタリングの実践と腸内細菌叢の機能把握への応用

本計測システムが、便中有機酸メタボローム分析において実用性に優れること、腸内細菌叢の機能を的確に把握できることを示す

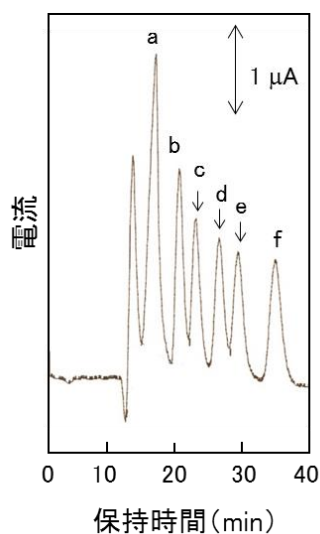


図2 有機酸の標準溶液のクロマトグラム
ピーク：a, 乳酸；b, 酢酸；c, プロピオン酸；d, 酪酸；e, イソ吉草酸；f, 吉草酸

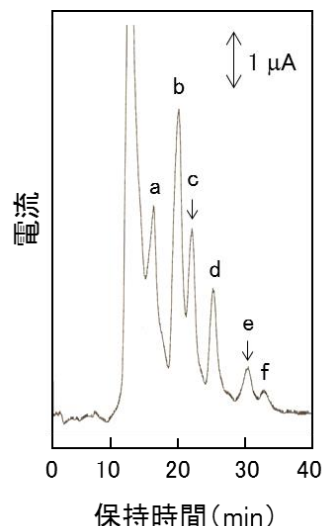


図3 ラット便のクロマトグラム
ピーク：a, 乳酸；b, 酢酸；c, プロピオン酸；d, 酪酸；e, イソ吉草酸；f, 吉草酸

ために、ラットの便中有機酸モニタリングを実践した。

① 便中有機酸組成に及ぼすバナナとヨーグルトの影響

バナナとヨーグルトは、免疫機能を改善して花粉症などのアレルギー症状を軽減する効果があるといわれている。これらの食品の摂取が、腸内細菌叢の生物活性変化に及ぼす影響を明らかにすることとした。

ラットをバナナ投与群、ヨーグルト投与群、対照群に分け、本計測システムで各群の便中有機酸量およびその組成を定量した。

便中有機酸量は便中の水分含量の影響を受けるので、各群内において日ごとの変動が大きかった。よって、便中有機酸組成について各群のデータを対比した。バナナ投与群、ヨーグルト投与群において吉草酸が増加し、腸内環境の改善に寄与する腸内細菌叢の代謝物が増加傾向にあることが分かった。

以上のように、本計測システムは、食事内容と腸内細菌叢の生物活性の関連性を明らかにできる分析法であると考えられた。

② 便中有機酸組成に及ぼす抗菌薬と漢方薬の影響

感染症の薬物治療において抗菌薬と漢方薬が併用処方されることがあり、中でもセフェム系抗菌薬と補中益気湯を併用する処方方は、臨床において多用されている。これは、セフェム系抗菌薬の抗菌作用と、補中益気湯の細菌に対する宿主抵抗性増強作用を期待してのものと考えられるが、腸内細菌叢の代謝物である便中有機酸に及ぼす影響については、不明である。

セフェム系抗菌薬が腸内細菌叢へ及ぼす

影響を明らかにするために、CFDN を投与したラットの便中有機酸組成の経時変化をモニタリングし、対照群と対比した。CFDN 投与群では、便中酢酸が顕著に低下した。この結果は、抗菌薬の投与によって酢酸を産生する *Bifidobacterium* が減少するという報告を支持するものであった。

さらに、CFDN と併用投与される漢方薬補中益気湯が腸内細菌叢へ及ぼす影響について検討した。補中益気湯と CFDN をラットに経口投与したところ、CFDN だけを投与した群に比べ、便中酢酸の低下が抑制された。酢酸は、腸内環境の改善に寄与する腸内細菌叢の代謝物であるので、この結果は免疫機能と腸内細菌叢の関連性を示唆するものと考えられた。

以上のように、本計測システムは腸内細菌叢が関わる薬物相互作用のメカニズム解明において有用な分析法であることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① L. Chen, A. Kotani, F. Kusu, Z. Wang, J. Zhu, H. Hakamata, Quantitative comparison of caffeoylquinic acids and flavonoids in chrysanthemum morifolium flowers and their sulfur-fumigated products by three-channel liquid chromatography with electrochemical detection, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 63(1), 25-32 (2015).
DIO: 10.1248/cpb.c14-00515
- ② L. Chen, A. Kotani, H. Hakamata, R. Tsutsumi, Y. Hayashi, Z. Wang, F. Kusu, Repeatability assessment by ISO 11843-7 in quantitative HPLC for herbal medicines, *Anal. Sci.*, 査読有, 31(9), 903-909 (2015).
DIO: 10.2116/analsci.31.903
- ③ A. Kotani, M. Watanabe, K. Yamamoto, F. Kusu, H. Hakamata, Determination of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and arachidonic acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Sci.*, 査読有, 32(9), 1011-1014 (2016).
DIO: 10.2116/analsci.32.1011

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小谷 明、渡邊瑞貴、楠 文代、袴田秀樹、血中多価不飽和脂肪酸定量のための電気化学検出 HPLC、2014 年電気化学秋季大会、2014 年 9 月 28 日、北海道大学高等教育推進機構 (北海道・札幌市)
- ② 宮本友貴、小谷 明、楠 文代、袴田秀

樹、キノンの還元前置波に基づくミコフェノール酸の電気化学検出 HPLC、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月 4 日、昭和薬科大学 (東京都・町田市)

- ③ 小谷 明、渡邊瑞貴、山本法央、楠 文代、袴田秀樹、電気化学検出 HPLC による多価不飽和脂肪酸のヒト血中動態分析、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)
- ④ A. Kotani, M. Watanabe, K. Yamamoto, F. Kusu, H. Hakamata, High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determining a ratio of eicosapentaenoic acid to arachidonic acid in human plasma, The 66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2015), 2015 年 10 月 5 日、台北、(台湾)
- ⑤ 宮本友貴、山本法央、袴田秀樹、小谷 明、血中ミコフェノール酸測定のための電気化学検出 HPLC の開発、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ 大嶋龍誠、小谷 明、黒田明平、山本法央、三巻祥浩、袴田秀樹、五味子中の有機酸の UV 検出 HPLC による定量、第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日、東京大学 (東京都・文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 明 (KOTANI, Akira)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：40318184