

有機酸高速分析カラム Shim-pack™Fast-OA による腸内細菌叢研究の生産性向上

最近の研究により、腸管内に生育する菌叢、腸内細菌叢が宿主の健康維持や増進に寄与していることが示唆されています。腸内細菌叢の研究分野では代謝物を網羅的に測定するために、質量分析計が活用されていますが、ターゲットが明確である場合（例えば微生物代謝により生成された短鎖脂肪酸の定量）には HPLC が使用されます。

ここでは、サル糞便から代謝物を抽出し、糞便中に含まれる短鎖脂肪酸を有機酸高速分析カラムを用いて測定した例をご紹介します。

M. Nakashima, T. Hattori

■ 標準試料の分析例

Shim-pack Fast-OA はイオン排除モードのカラムで、短鎖脂肪酸をはじめとした酸性化合物を分離します。保持挙動は移動相濃度や温度によって変化するため、分析対象化合物によって、カラム温度を調整することで条件の最適化を行います。図 1 に 35～50℃における短鎖脂肪酸の保持時間を示します。温度による溶出順の変動はなく、温度を上げることで保持が弱くなることがわかります。本検討では分離を損なわずより短時間で分析可能な 50℃を採用しました。

同じくイオン排除モードカラムである Shim-pack SCR-102H と Shim-pack Fast-OA を用いて短鎖脂肪酸混合標準液 6 成分を分析した際の分析条件を表 1 に、クロマトグラムを図 2 に示します。Shim-pack SCR-102H を用いた場合、1 サイクルあたりの分析時間は 30 分程度要しましたが、Shim-pack Fast-OA では 10 分以内に保持の強い吉草酸ピークの溶出を確認しました。

Shim-pack SCR-102H は 300 mm のカラム長を活かした高分離が可能であるという特長を持ちますが、今回のように短鎖脂肪酸を対象とした場合は、分析時間が課題となります。イオン排除クロマトグラフィーでは分析条件等の変更による分析時間の大幅短縮が困難ですが、従来より粒子径が小さく、分析対象によりカラムの本数を選択できる Shim-pack Fast-OA により効果的に分析時間が短縮できます。

表 1 分析条件

Column	: Shim-pack Fast-OA (100 mm L. × 7.8 mm I.D., 5 μm) Shim-pack SCR-102H (300 mm L. × 8.0 mm I.D., 7 μm)
Guard column	: Shim-pack Fast-OA (G) Shim-pack SCR-102H (G)
Mobile phase	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid (有機酸分析移動相試薬セット 移動相)
Flow rate	: 0.8 mL/min
pH buffering solution	: 5 mmol/L p-toluenesulfonic acid 20 mmol/L Bis-Tris 0.1 mmol/L EDTA (有機酸分析移動相試薬セット pH 緩衝化試薬)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temperature	: 50℃
Detection	: Conductivity detector (CDD-10Avp)
Injection volume	: 10 μL

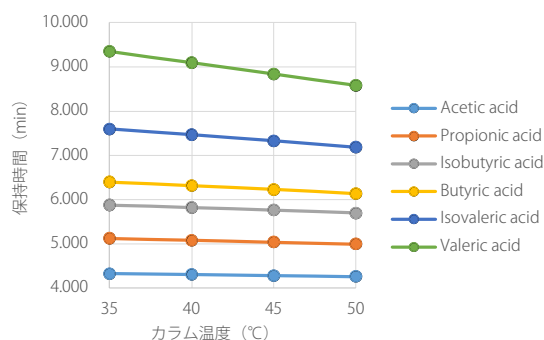


図 1 短鎖脂肪酸の保持挙動

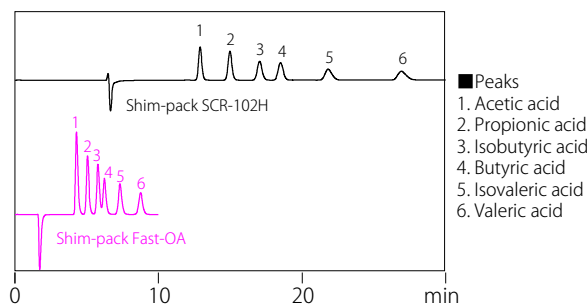


図 2 標準試料のクロマトグラム (各 500 mg/L)

■ 検量線

各短鎖脂肪酸について 5, 10, 50, 100, 500, 1000 (mg/L) の濃度範囲における検量線を作成しました。直線性寄与率と 5 mg/L における面積値再現性を評価した結果を表 2 に示します。寄与率 (r^2) は 0.999 以上、面積値再現性は 5% 以下と良好な結果が得られました。

表 2 直線性寄与率と面積値再現性

	Linearity (r^2)	Reproducibility (N=6, %RSD)
Acetic acid	0.9997	1.36
Propionic acid	0.9997	3.51
Isobutyric acid	0.9997	2.48
Butyric acid	0.9998	2.24
Isovaleric acid	0.9999	3.40
Valeric acid	0.9997	1.95

■ サンプルおよび前処理

試料として用いたサル糞便は、現場で凍結し、-80℃で冷凍保管しました。図 3 に前処理手順を示します。糞便 100 mg にりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) 700 μL を添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過したものを分析用サンプルとしました。

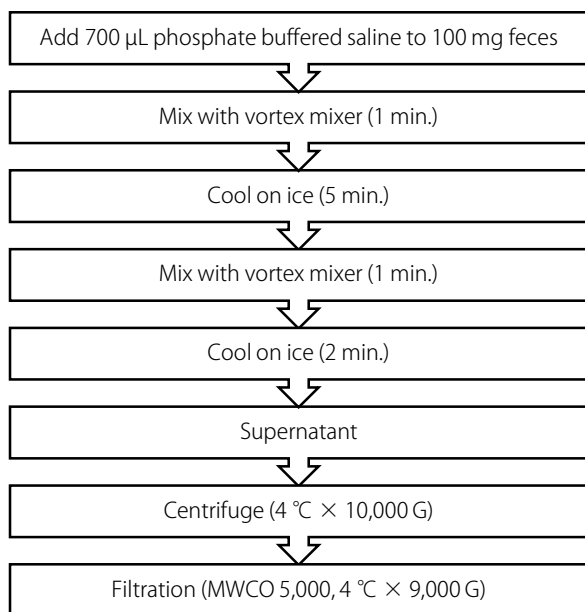


図3 サル糞便の前処理方法

■ 実試料の分析例

試料であるサル糞便はそれぞれ A 地点、B 地点、C 地点から、計 5 頭分を採取しました。試料の詳細を表 3 に、採取地点の概略図を図 4 に示します。

表 3 試料の詳細

サンプル名	採取場所	サル	凍結処理までの経過
1	A 地点	不明	半日～1 日経過
2	B 地点	4 歳 オス	排泄直後
3	B 地点	2 歳 オス	排泄直後
4	C 地点	大人 メス	排泄直後
5	C 地点	大人 メス	排泄直後

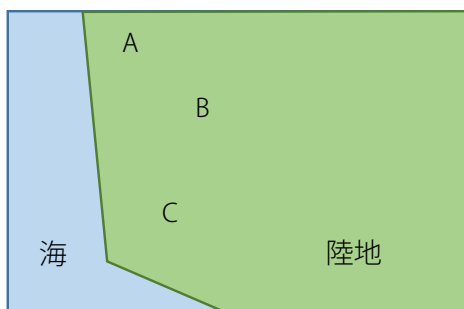


図 4 採取地点の概略図

上記 5 つのサンプルについて、図 3 の手順で前処理後、表 1 の条件 (Shim-pack Fast-OA を使用) にて、HPLC 分析に供しました。図 5 にサンプル 2 のクロマトグラムを示します。t₀ 付近 (2.5 min 付近) に前処理で使用したりん酸を含む緩衝液由来の大きなピークが観察されましたが、腸内細菌叢の研究分野で特に重要な酢酸以降に溶出する短鎖脂肪酸のピーク (図 5、4 min 以降) については、問題なく定量することができました。

本アプリケーションニュース作成にあたり、サル糞便のご提供並びにご指導を中部大学 創発学術院の牛田一成教授にご協力頂きました。Shim-pack は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

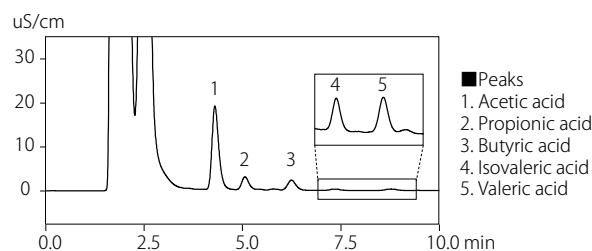


図 5 サンプル 2 のクロマトグラム

表 4 にはサンプル 1～5 までの各短鎖脂肪酸含有量を示します。サンプル 1 については排泄から採取までに一定時間が経過していたこともあり、短鎖脂肪酸がほとんど存在しませんでした。これは排泄から採取までの間に、短鎖脂肪酸が揮発したか、糞便中の微生物により、代謝されたことによると考えられます。このことから、腸内細菌叢の影響を糞便から正しく測定するためには排泄後なるべく短い時間でサンプルを採取し、微生物代謝や揮発を防ぐ条件で保管することが重要と言えます。

表 4 各サンプルの短鎖脂肪酸含有量

	Amount of compounds ($\times 10^{-2}$ mol/kg)					
	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid
Sample 1	0.042	-----	-----	-----	-----	-----
Sample 2	5.6	0.99	-----	1.0	0.16	0.23
Sample 3	5.5	0.96	-----	0.90	0.19	0.34
Sample 4	5.8	1.3	-----	1.2	-----	0.25
Sample 5	6.3	0.88	-----	0.84	-----	0.23

■ まとめ

Shim-pack Fast-OA を用いて、腸内細菌叢の研究分野で対象とされる短鎖脂肪酸の分析を行った結果、10 分以内で夾雑成分の影響を受けることなく、対象化合物の定量を行うことができました。5 匹のサルの糞便中の短鎖脂肪酸含有量を測定した結果、排泄後、半日以上経過した検体については、短鎖脂肪酸がほとんど存在せず、排泄直後に凍結処理を施した検体については短鎖脂肪酸の有無を十分な感度で測定することができました。