

GCMS™およびGC-SCDを使用した腸内微生物が生成する揮発性ガス分析への新しいアプローチ

腸内細菌叢は様々な揮発性物質を生成しており、健康や病気に関連していると考えられています。また、揮発性物質を解析しバイオマーカー探索等の研究も行われています。

今回、無菌マウスおよび通常菌叢定着マウスの糞便サンプルから発生するガスを分析し、比較検討を行いました。発生ガスを網羅的に分析するために GCMS を、硫黄系ガスを分析するために GC-SCD を使用しました。

Y. Takemori

■ 試料と分析条件

無菌および通常菌叢定着マウスの新鮮糞便を、そのままヘッドスペースバイアルに入れ、嫌気性ガスを噴入後に密封して、24 時間培養しました。その後、ヘッドスペースサンプルにセットし、発生ガスを GCMS、GC-SCD により分析を行いました。

本実験の GCMS 装置構成および分析条件を表 1 に、GC-SCD 装置構成および分析条件を表 2 に示します。

表 1 GCMS 装置構成および分析条件

Model	: HS-20 Trap / GCMS-QP™2020 NX
HS-20 Trap	
Mode	: トラップ (トラップ管: Tenax®GR)
Multi Injection Times	: 5 回
Oven Temperature	: 37 °C
Sample Line Temperature	: 80 °C
Transfer Line Temperature	: 90 °C
Trap Cooling Temperature	: -10 °C
Trap Heating Temperature	: 280 °C
Trap Waiting Temperature	: 25 °C
Vial Pressure	: 60 kPa
Dry Purge Pressure	: 60 kPa
Vial Heat-retention Time	: 180 min
Vial Pressurization Time	: 1 min
Vial Pressurization	: 0.1 min
Equilibrating Time	
Loading Time	: 1 min
Loading Pressurization Time	: 0.1 min
Dry Purge Time	: 10 min
Injection Time	: 1 min
Needle Flush Time	: 5 min
GC	
Injection Mode	: スプリット
Split Ratio	: 1 : 3
Carrier Gas	: He
Carrier Gas Control	: 線速度モード (25.5 cm/秒)
Column	: DB-WAXetr (60 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
Column Temp	: 40 °C (5 min) - 3 °C/min - 240 °C (15 min)
MS	
Ion Source Temp.	: 200 °C
Interface Temp.	: 200 °C
Ionization Mode	: EI
Measurement Mode	: Scan (m/z 10~350)
Event Time	: 0.3 秒

表 2 GC-SCD 装置構成および分析条件

Model	: HS-20 / Nexis™ GC-2030 / SCD-2030
HS-20	
Mode	: ループ
Oven Temperature	: 37 °C
Sample Line Temperature	: 80 °C
Transfer Line Temperature	: 90 °C
Vial Pressure	: 60 kPa
Vial Heat-retention Time	: 180 min
Vial Pressurization Time	: 1 min
Vial Pressurization	: 0.1 min
Equilibrating Time	
Loading Time	: 1 min
Loading Pressurization Time	: 0.1 min
Injection Time	: 1 min
Needle Flush Time	: 5 min
GC	
Injection Mode	: スプリット
Split Ratio	: 1 : 3
Carrier Gas	: He
Carrier Gas Control	: 線速度モード (25.5 cm/秒)
Column	: DB-WAXetr (60 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
Column Temp	: 40 °C (5 min) - 3 °C/min - 240 °C (15 min)
Detector	: 化学発光硫黄検出器 (SCD)
Interface Temp.	: 200 °C
Electric Furnace Temp.	: 850 °C
Detector Gas	: H ₂ 100.0 mL/min N ₂ 10.0 mL/min O ₂ 12.0 mL/min O ₃ 25.0 mL/min



HS-20 Trap / GCMS-QP™2020 NX (網羅的分析)



HS-20 / Nexis™ GC-2030 / SCD-2030 (硫黄分析)

■分析結果①（無菌マウスと通常菌叢定着マウスの比較）

図1にGCMSのトータルイオンクロマトグラム（TIC）、図2にGC-SCDのクロマトグラムを示します。

網羅的に揮発性物質を分析したTIC（図1）、硫黄系揮発性物質を分析したクロマトグラム（図2）ともに、無菌マウス由来サンプルより、菌叢定着マウス由来サンプルの方が、揮発性物質の検出数および発生量（ピーク面積値が大きい）が多いことが確認できました。これにより、腸内細菌が多数の揮発性物質の生成に深く関与していることが示唆されます。

GCMS（揮発性物質の網羅的分析）

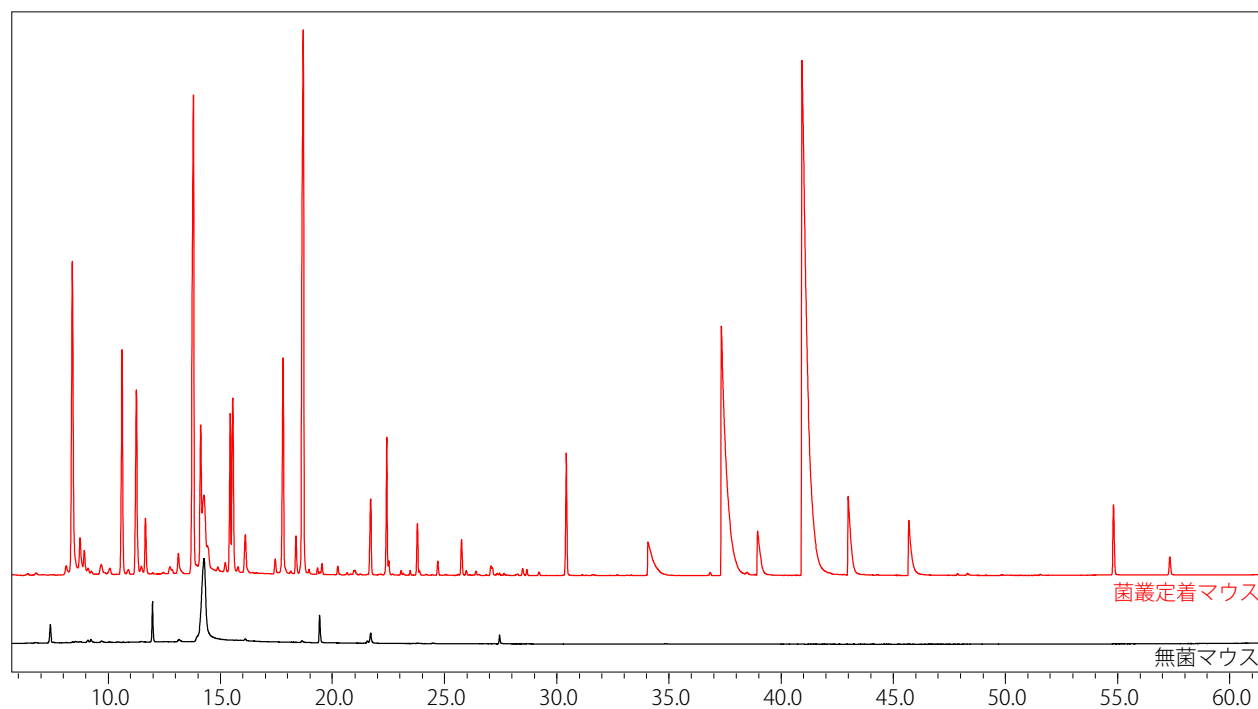


図1 GCMSのトータルイオンクロマトグラム

GC-SCD（硫黄系揮発性物質の選択的分析）

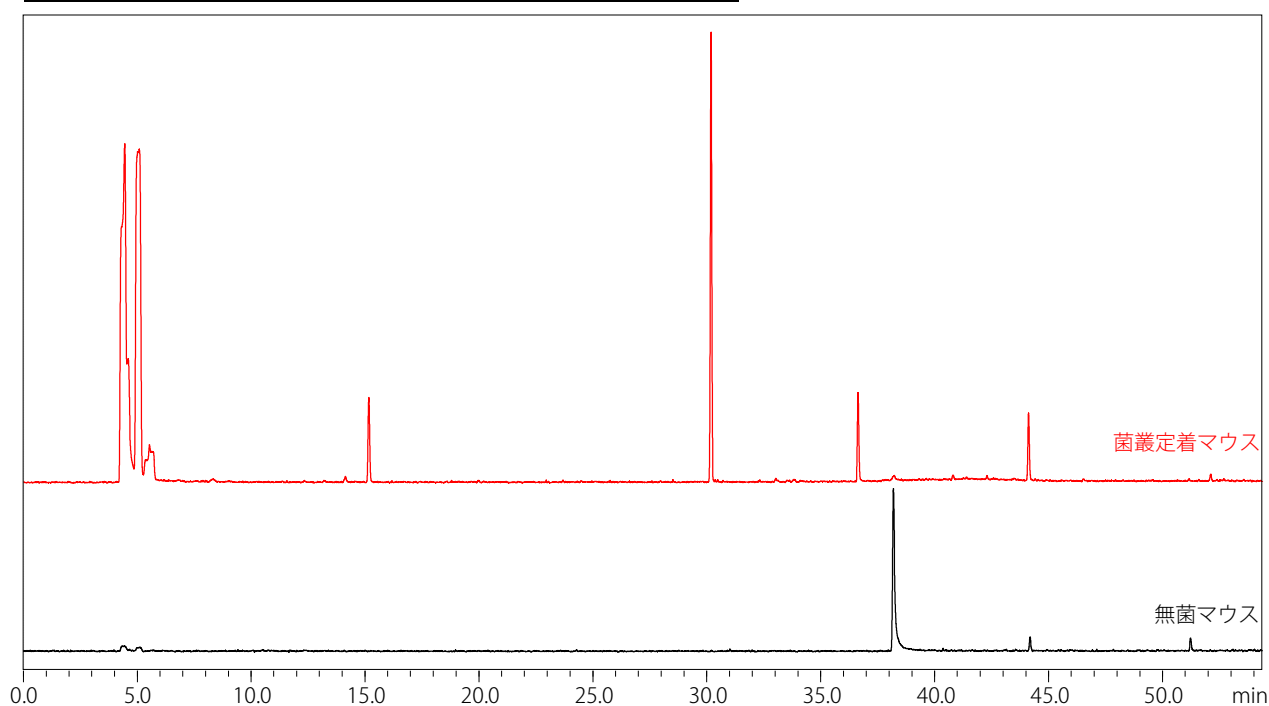
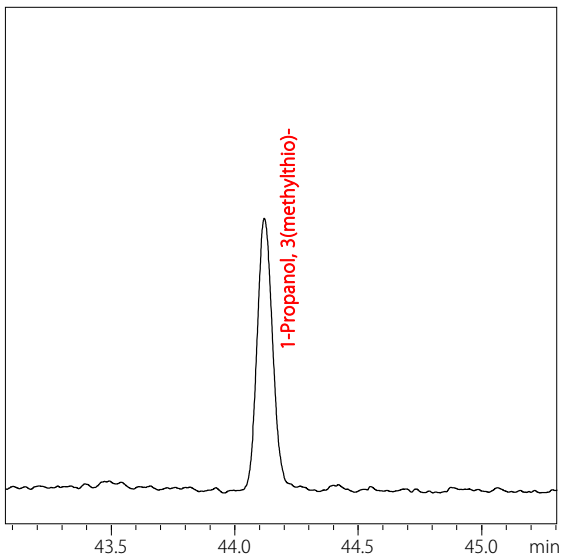
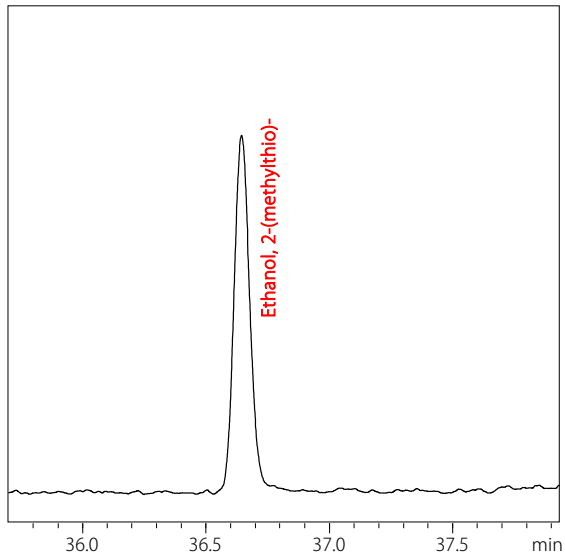
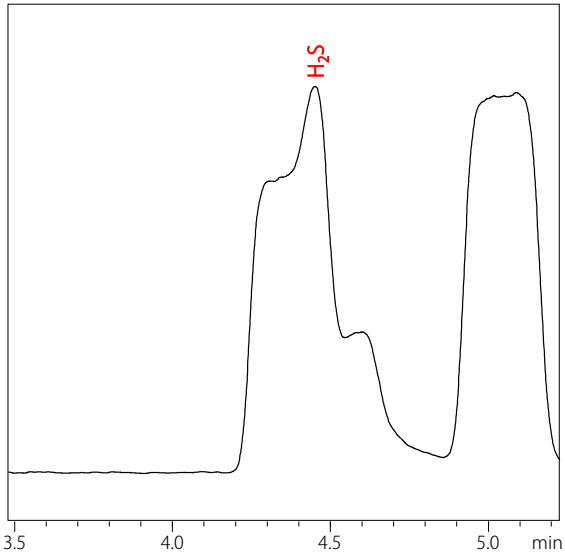


図2 GC-SCDのクロマトグラム

SCD および GCMS のクロマトグラムの比較を図 3 に示します。データ解析の中で、GC-SCD のクロマトグラムから、GCMS の TIC では他の化合物と重なり見逃されていた H₂S を検出・同定することができました。更に、GC-SCD において、GCMS ではピーク強度が小さく見逃す可能性が高い硫黄化合物：Ethanol, 2-(methylthio)- および 1-Propanol, 3-(methylthio)- も検出・同定することができました。

GC-SCD と GCMS のデータを組み合わせることにより、硫黄化合物同定が容易になりました。

GC-SCD



GCMS

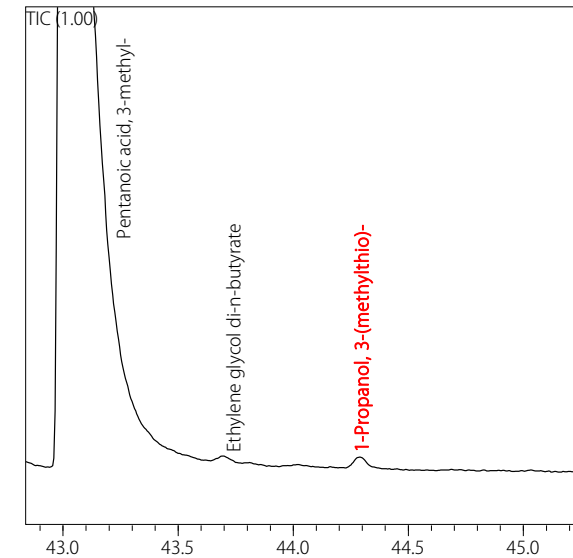
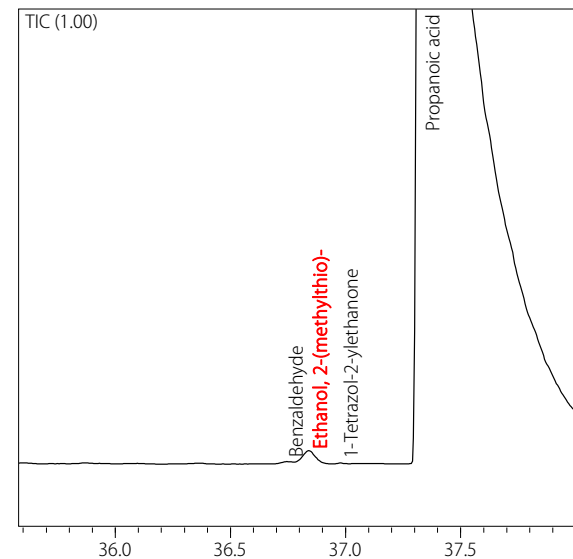
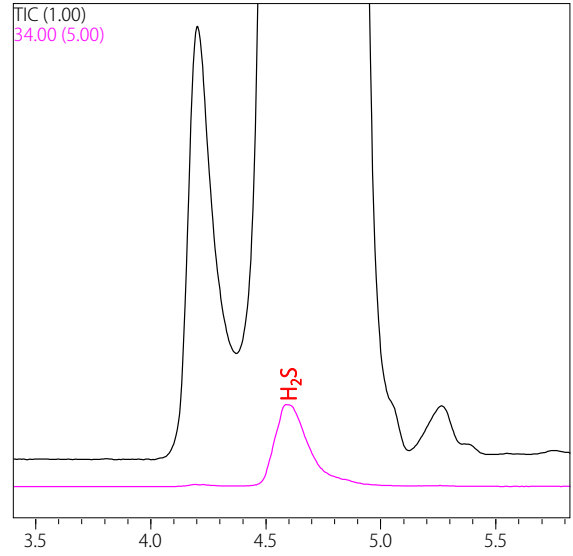


図 3 SCD および GCMS のクロマトグラム (赤字が硫黄化合物)

■分析結果②（通常菌叢定着マウスにおける個体差の比較）

菌叢定着マウス6匹において、2回ずつサンプルを回収しGCMS分析で得られたトータルイオンクロマトグラムを図4に示します。

更に、それから得られた合計121種類の化合物データを用いて、多変量解析ソフトウェア：SIMCA® 15（インフォコム社）により主成分分析を行いました。その結果のスコアプロットを図5に示します。スコアプロット上で、同一個体由来サンプルが最小クラスターを形成し、個体間では別れる傾向が認められました。これらの結果より、本解析は、腸内細菌由来の揮発性物質の個体差が検出できることが明らかになり、疾病モデルマウスなどを用いることで、新たなバイオマーカーの探索等への応用が期待されます。

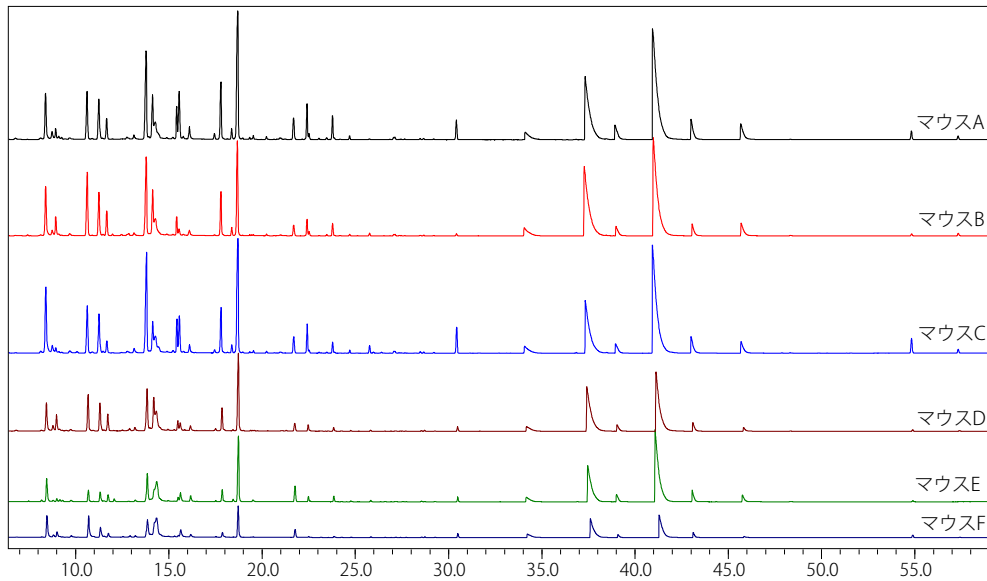


図4 菌叢定着マウスサンプルのトータルイオンクロマトグラム

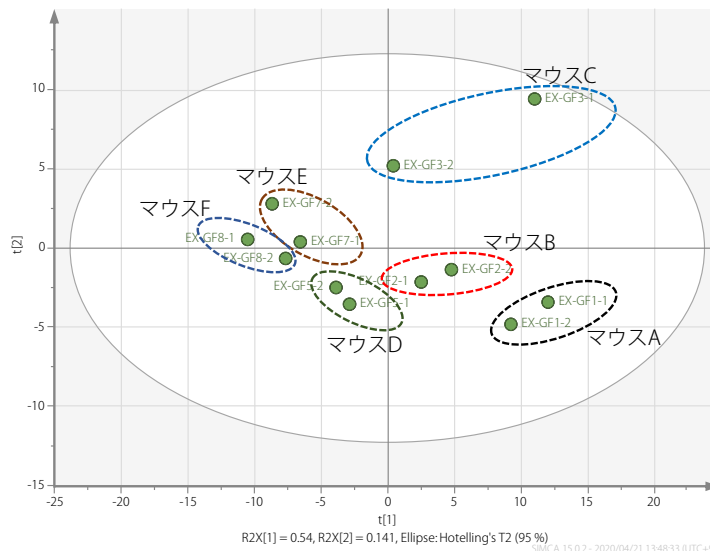


図5 菌叢定着マウス分析結果の多変量解析結果（スコアプロット）

■まとめ

GCMSとGC-SCDを使用し、前処理不要で腸内細菌生成の揮発性ガスを分析することができました。GCMSでは網羅的な分析、GC-SCDではGCMSでは検出が難しい硫黄系成分の分析ができました。更に、通常菌叢定着マウスのサンプルから発生する揮発成分には個体差があることが確認でき、バイオマーカー探索等の可能性を確認することができました。

<謝辞>

本測定を行うにあたり、サンプル供給等のご協力いただいた協同乳業株式会社の松本光晴 主幹研究員に感謝いたします。

GCMS、GCMS-QP、および Nexis 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。

Tenax は、Buchem B.V.の登録商標です。

SIMCA は、Sartorius Stedim Data Analytics AB の登録商標です。

その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。

本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年6月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。